

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: Marzo 2017

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>	MMAB35-FiPS4F4	
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 de paciente, obtenidos de la pierna izquierda. Patients-derived fibroblasts, isolated from left leg.	
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino Female	4 años 4 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO ☐ SÍ ☒ (especificar) Aciduria metilmalónica tipo cblB <i>No Yes (specify) Methylmalonic aciduria cblB type</i>	
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO ☐ SÍ ☒ (especificar) Mutaciones en el gen MMAB <i>No Yes (specify) Mutations in MMAB gene</i>	

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco ☒ <i>Fresh</i> Crioconservado ☐ <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 18.11.2003
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Cultivo primario de fibroblastos. Los fibroblastos se han mantenido en MEM 10% suero, glutamina y antibióticos. Fibroblasts primary culture. Fibroblasts were maintained in MEM 10% serum, glutamine and antibiotics.
¿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, pases 3 y 6. Yes, passages 3 and 6.
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 integrativa. Virus Sendai (CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming Kit, Invitrogen). Se han usado 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 and 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>	El protocolo que se ha seguido para cultivar y mantener las células iPS de la línea generada ha sido el descrito en la publicación: "A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells". Angel Raya et al. Nature protocols vol5, no 4, 2010 647-660. Culture conditions are described in "A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells". Angel Raya et al. Nature protocols vol5, no 4, 2010 647-660.
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 características morfológicas de la línea generada son las características típicas de las células iPS. Borde muy bien definido, ratio/núcleo/citoplasma grande, prominentes nucleolos. The generated iPSCs present a typical ES cell colony morphology (high ratio nucleus/cytoplasm, prominent nucleoli).

Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	El método de congelación/descongelación es el detallado en el kit CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming Kit. Para la congelación, se pican las colonias y se añaden en un tubo con medio de iPSC, se centrifuga y el pellet de cells se resuspende en primer lugar en medio/suero, y posteriormente en medio/DMSO. Se congelan con la ayuda de Mr. Frosty o/n y al día siguiente se llevan al nitrógeno. Para descongelar se usa el medio de iPSC que contiene Rho/Rock pathway inhibitor para prevenir la apoptosis. For cryopreserving the iPSC, the protocol described in the manual of the CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit has been followed.
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>	Hay iPSC congeladas en distintos tiempos (Pase 8) Several iPSC stocks freezed at different moments and passages are available (passage 8).
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes ☐ No No ☒ Comentarios/ Comments:	¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes ☐ No ☒ Resultado / Result

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

Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i>	Método	Marcador	Nº pase	Resultado	
	Comentarios <i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n.</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Oct 4	RNA/protein	10	+	
	Nanog	RNA/protein	10	+	
	Sox 2	RNA/protein	10	+	
	SSEA3	RNA/protein	10	+	
	SSEA4	RNA/protein	10	+	
	TRA-1-60	RNA/protein	10	+	
	TRA-1-81	RNA/protein	10	+	
	Fosfatasa. Alk	Protein	10	+	
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</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>	Protein	TUJ1	13	+
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Protein	SMA	13	+
	Endodermo <i>Endoderm</i>	Protein	AFP	13	+
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i>	Diferenciación in vitro espontánea. Formación de cuerpos embrionarios a partir de las células IPS. Diferenciación de los cuerpos embrionarios a las 3 capas de la línea germinal con distintos medios. Endodermo: medio con suero; mesodermo: medio con ácido ascórbico y ectodermo: medio con factores N2 y B27. La diferenciación se obtiene tras 20 días de cultivo.				
	Spontaneous differentiation into the three germ layers. Embryonary bodies formation from iPSC. Differentiation into the three germ layers with different mediums. Endoderm: medium with serum. Mesoderm: medium with ascorbic acid. Ectoderm: medium with N2 and B27 factors. Differentiation is finished after 20 days.				

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table><tr><th>Comentarios</th><th>Método</th><th>Marcador</th><th>Nº pase</th><th>Resultado</th><th></th></tr><tr><td></td><td><i>Method</i></td><td><i>Marker</i></td><td><i>Passage n</i></td><td><i>Results</i></td><td><i>Comments</i></td></tr><tr><td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Endodermo <i>Endoderm</i></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	Comentarios	Método	Marcador	Nº pase	Resultado			<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>					
Comentarios	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																											
	<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>																															
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	No se ha llevado a cabo por ser un ensayo que ya no es necesario.																														
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	El análisis del cariotipo se ha llevado a cabo en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) de La Paz. Convencional por bandas G. Fórmula cariotípica: 46XX. Pase 15 Passage 15, karyotype 46 XX																														
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>	El análisis de microsatélites se realizó mediante el kit AmpFI STR Identifiler Plus PCR Amplification Kit. Y las muestras se analizaron en el parque científico de Moncloa (Madrid). Se utilizó un secuenciador Applied Biosystems (ABI3730 DNA Analyzer). La identificación celular fue positiva. To confirm the cell identity a DNA fingerprinting assay has been carried out using kit AmpFI STR Identifiler Plus PCR Amplification Kit.																														
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	No se ha hecho, ya que el Virus Sendai no es integrativo. Genes do not integrate. A non-integrative methodology that involves the use of Sendai virus has been used.																														

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	Se analizó la eliminación de los vectores y factores de reprogramación exógenos por RT-PCR We confirmed the clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes by RT-PCR
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>	Las mutaciones identificadas en los fibroblastos del paciente se han comprobado en las células IPS mediante secuenciación Sanger, identificándose los mismos cambios c.584G>A (p.Ser174fs) y c.287T>C (p.Ile96Thr). The presence of the mutations in the iPSC was evaluated and confirmed by Sanger sequencing
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo. Negative

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> BELÉN PÉREZ	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> C/ NICOLÁS CABRERA 1. 28049. MADRID
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID. CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA	Teléfono (phone): 91-1964566 Fax: E-mail: bperez@cbm.csic.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.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre  Fecha / Date: 07/04/2017	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator  Fecha / Date: 06/04/2017
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Rafael Garesse Alarcón. Vicerrector de Investigación e Innovación	
Dirección Postal: Postal Address: Edificio del Rectorado. C/ Einstein, número 1 Ctra. Colmenar Viejo Km. 15,500 Ciudad Universitaria de Cantoblanco Universidad Autónoma de Madrid 28049 Madrid (España)	Teléfono / Telephone: 91 497 42 34 / 39 00 Fax: E-mail: vicerrectorado.investigacion@uam.es