# 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**: 17/07/2018

## 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**<br>*Name of the iPS line:* | IC-AD2-F-iPS-4F-1 |
| **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**<br>*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.* | Biopsia cutánea de la cara ventral del brazo (diámetro 4-6 mm)<br>Fibroblastos de la dermis<br><br>Skin biopsy from the ventral side of the arm (4-6 mm diameter)<br>Demal fibroblasts |
| **Sexo y edad del donante.**<br>*Sex and age of the donor* | Mujer 66<br>Female 66 |
| **¿El donante tiene alguna patología?**<br>*Has the donor any pathological condition?* | **NO** ☐ **SÍ** ☒ (especificar) Alzheimer<br>*No* *Yes* *(specify)* |
| **¿La patología es de origen genético?**<br>*Is the pathological condition of genetic origin?* | **NO** ☐ **SÍ** ☒ (especificar) APOE-epsilon4 (APOE-4) es un factor de riesgo genético de sufrir Alzheimer/ APOE-epsilon4 (APOE-4) is a risk factor for AD.<br>*No* *Yes* *(specify)* |

| | |
|---|---|
| **Muestra biológica recibida**<br>*Biological sample* | **Fresco** ☒ *Fresh*<br>**Crioconservado** ☐ *Cryopreserved* |
| **Fecha de la donación de la muestra biológica**<br>*Date of donation of the biological sample*<br>09/02/2015 | **Fecha del uso o descongelación** *(si congelado)*<br>*Date used or thawed (if frozen)*<br>09/02/2015 |
| **Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario).**<br>*Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)* | Aislamiento de fibroblastos mediante digestion enzimática (colagenasa, hialuronidasa y DNAsa I). El medio de cultivo empleado para su mantenimiento fue DMEM con 110mg/L de piruvato sódico y alto contenido en glucosa (4,5g/L) suplementado con 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 10% de FBS, 50u/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomicina.<br>Fibroblast isolation by enzymatic digestion (collagenase, hyaluronidase and DNase I). The culture medium used for maintenance was DMEM with 110mg/L of pyruvate and high glucose (4,5g/L) supplemented with 0.1mM of nonessential amino acids, 10% of FBS, 50u/ml of penicillin and 50µg/ml of streptomycin. |
| **Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen**<br>*Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.* | GenePrint10 Perfil de la muestra. Ver Anexo 4 / See Annex 4<br>TH01 6, 9.3<br>D21S11 27, 30<br>D5S818 12<br>D13S317 8, 11<br>D7S820 10, 12<br>D16S539 9, 13<br>CSF1PO 10, 11<br>AMEL X<br>vWA 16, 19<br>TPOX 8 |
| **¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase?**<br>*Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?* | Sí, en pase 4<br>Yes, at passage 4 |
| **Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados.**<br>*Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)*<br>*Specify factors and plasmids used for reprogramming* | El método empleado es no integrativo, utilizando para ello los vectores virales sendai (CytoTune - iPS Reprogramming Kit) que expresan los factores: hOCT3/4, hSOX2, hKLF4 y hc-MYC.<br>The method is not integrative, using the sendai viral vectors (CytoTune - iPS Reprogramming Kit) expressing the factors: hOCT3/4, hSOX2, hKLF4 and hc-MYC. |
| **Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada.**<br>**(si se describen en publicación, indicar referencia)**<br>*iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)* | Las iPSCs generadas se cultivaron sobre células de soporte (fibroblastos embrionarios de ratón preparados en nuestro laboratorio), en un medio de cultivo KnockOut DMEM/F-12 sin glutamina suplementado con 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 2mM de glutamax, 0.1mM de ß-mercaptoetanol, 20% de KnockOut Serum Replacement, 6 ng/ml FGF-2, 100u/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina.<br>The generated iPSCs were cultured on feeder cells (mouse embryonic fibroblasts prepared in our laboratory), in culture medium KnockOut DMEM/F-12 without glutamine and supplemented with 0.1mM of nonessential amino acids, 2mM of Glutamax, 0.1mM ß-mercaptoethanol, 20% KnockOut Serum Replacement, 6 ng/ml FGF-2, 100u/ml of penicillin and 100µg/ml of streptomycin. |

| | |
|---|---|
| **Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma;otros)**<br>*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)* | Planas, redondeadas o poligonales (la mayoría) y algunas alargadas y/o en forma de cuña. Bordes nítidos. Tamaño (área) medio de las colonias: 1.15 mm2 ± 0.29<br>Ratio núcleo/citoplasma elevada.<br>Flat, round or polygonal (the majority) with some being elongated and/or wedge-like. Defined borders. Mean size of colonies: 1.15 mm2 ± 0.29<br>High nucleus/cytoplasm ratio. |
| **Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)**<br>*Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)* | Congelación: 20-25 colonias/vial en 90% FBS y 10% DMSO<br>Descongelación: En medio de cultivo de iPSCs : Medio iPSC condicionado de MEFs (1:1) suplementado con 8ng/ml de FGF-2 y 10µM de Y27.<br>Freezing: 15-20 colonies/vial in 90% FBS and 10% DMSO<br>Thawing: iPSCs medium : MEF conditioned iPSC medium (1:1) supplemented with 8ng/ml FGF-2 and 10µM Y27. |
| **Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15)**<br>*Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)* | Disponibilidad de células criopreservadas en Pase 12.<br>Cryopreserved cells at Passage 12 are available |
| **¿Ha sido la línea modificada genéticamente?**<br>*Has the line been genetically modified?*<br>**Sí** *Yes* ☐ **No** *No* ☒<br>**Comentarios/** *Comments*: | **¿Se llevó a cabo un análisis clonal?**<br>*Has a clonal analysis been carried out?*<br>**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**
*Pluripotency test*

| | Método<br>*Method* | Nº pase<br>*Passage n.* | Resultado<br>*Results* | Comentarios<br>*Comments* |
|---|---|---|---|---|
| **Oct 4** | qPCR | 15 | + | ver Anexo 1 |
| **Nanog** | Inmunofluorescencia/ qPCR | 8/15 | + | ver Anexo 1 |
| **Sox 2** | qPCR | 15 | + | ver Anexo 1 |
| **SSEA3** | Inmunofluorescencia | 11 | + | ver Anexo 1 |
| **SSEA4** | Inmunofluorescencia | 15 | + | ver Anexo 1 |
| **TRA-1-60** | Inmunofluorescencia | 8 | + | ver Anexo 1 |
| **TRA-1-81** | Inmunofluorescencia | 11 | + | ver Anexo 1 |
| **Fosfatasa. Alk** | Actividad | 6 | + | ver Anexo 1 |

**Test de diferenciación in vitro**
*In vitro differentiation test*

| | Método<br>*Method* | Marcador<br>*Marker* | Nº pase<br>*Passage n* | Resultado<br>*Results* | Comentarios<br>*Comments* |
|---|---|---|---|---|---|
| **Ectodermo**<br>*Ectoderm* | In vitro Dif. | PAX6/ TUJ1 | 13 | + | ver Anexo 2 |
| **Mesodermo**<br>*Mesoderm* | In vitro Dif. | DESMIN | 16 | + | ver Anexo 2 |
| **Endoderm**<br>*Endoderm* | In vitro Dif. | AFP | 14 | + | ver Anexo 2 |

**Descripción de las características de diferenciación *in vitro*** *(espontánea/inducida)*

*Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)*

Diferenciación de cuerpos embrioides (EBs) hacia las tres capas germinales durante 14-16 días:
- Ectodermo: cultivo de EBs en medio de iPSCs suplementado con Noggin y A83. Después de 11 días, cultivo en medio Neurobasal suplementado con B27, Glutamax, BDNF, GDNF, ácido ascórbico, cAMP y TGFbeta-3.
- Mesodermo: cultivo de EBs en medio de iPSCs suplementado con ác.ascórbico.
- Endodermo: cultivo de EBs en medio de iPSCs.

Differentiation of EBs to the three germ layers for 14-16 days:
- Ectoderm: EBs in iPSCs culture medium supplemented with Noggin and A83. After 11 days, in Neurobasal medium supplemented with B27, Glutamax, BDNF, GDNF, ascorbic acid, cAMP and TGFbeta-3.
- Mesoderm: EBs in iPSCs culture medium supplemented with ascorbic acid.
- Endoderm: EBs in iPSCs culture medium.

| | |
|---|---|
| **Test de diferenciación in vivo**<br>*In vivo differentiation test* | **Método** **Marcador** **Nº pase** **Resultado** **Comentarios**<br>*Method* *Marker* *Passage n* *Results* *Comments*<br><br>**Ectodermo**<br>*Ectoderm*<br><br>**Mesodermo**<br>*Mesoderm*<br><br>**Endodermo**<br>*Endoderm* |
| **Descripción de las características de diferenciación *in vivo***<br><br>*Description of the differentiation characteristics in vivo* | |
| **Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)**<br>*Karyotype (Specify karyotype formula and passage)* | 46, XX, Normal. Pase 4<br>Ver Anexo 3<br><br>46, XX, Normal. Passage 4<br>See Annex 3 |
| **Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular**<br>*Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line* | GenePrint10 Perfil de la muestra. Ver Anexo 4 / See Annex 4<br>TH01 6, 9.3<br>D21S11 27, 30<br>D5S818 12<br>D13S317 8, 11<br>D7S820 10, 12<br>D16S539 9, 13<br>CSF1PO 10, 11<br>AMEL X<br>vWA 16, 19<br>TPOX 8 |
| **Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)**<br>*Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)* | El método de reprogramación celular empleado es no integrativo. Ver a continuación.<br><br>The cell reprogramming method used is not integrative. See next. |

| | |
|---|---|
| **Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)**<br>*Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)* | Mediante RT-PCR. Se ha analizado y detectado la ausencia de expresión de los transgenes así como del genoma SeV en la línea AD2 (IC-AD2-F-iPS-4F-1). Ver Anexo 5.<br>By RT-PCR. We analyzed and detected the absence of transgen expression and SeV genome in line AD2 (IC-AD2-F-iPS-4F-1). See Annex 5 |
| **Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética**<br>*Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation* | Genotipo APOE-4/4 Mediante qPCR (TaqMan SNP genotyping assay). Ver Anexo 6<br>APOE-4/4 genotype. By qPCR (TaqMan SNP genotyping assay). See Annex 6 |
| **Test de micoplasma**<br>***Mycoplasma Test*** | Negativo por PCR. Ver Anexo 7<br>Negative by PCR. See Annex 7 |

## SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
## *Section 3 Applicant Details*

| | |
|---|---|
| **Investigador Principal:**<br>*Principal Investigator:*<br>Carlos Vicario Abejón | **Dirección Postal:**<br>*Postal address:*<br>Avenida Doctor Arce 37, 28002 Madrid, España/Spain |
| **Centro de Trabajo:**<br>*Institution:*<br>Instituto Cajal-CSIC<br>y CIBERNED | **Teléfono** *(phone)*: 34-91-5854721<br>**Fax:** 34-91-5854754<br>**E-mail:** cvicario@cajal.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**<br>*(Representante legal del Departamento/Centro)*<br>*Legal Reprentative of the Department/Centre)*<br>Ricardo Martínez Murillo<br>Fecha/ Date:<br>17/07/2018 | **Firma del Investigador Principal**<br>*Signature of the Principal Investigator*<br>Carlos Vicario Abejón<br>Fecha /Date<br>17/07/2018 |
| **Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:**<br>*Name and Position of the Person Representing the Centre:*<br>Ricardo Martínez Murillo, Director | |
| **Dirección Postal:**<br>*Postal Address:*<br>Instituto Cajal-CSIC, Avenida Doctor Arce, 37<br>28002 Madrid, España/Spain | **Teléfono** /*Telephone*: 34-91-5854721<br>**Fax:** 34-91-5854754<br>**E-mail:** cvicario@cajal.csic.es |