

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: 26/02/2018

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 <i>Name of the iPS line:</i>	IC-PD2-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 <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>	Biopsia cutánea de la cara ventral del brazo (diámetro 4-6 mm) Fibroblastos de la dermis. Skin biopsy from the ventral side of the arm (4-6 mm diameter) Dermal fibroblasts.	
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Mujer Female	75 75
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO ☐ SÍ ☒ (especificar) Parkinson No Yes (specify)	
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO ☐ SÍ ☒ (especificar) Mutación en heterocigosis en el gen GBA1 (N370S/wt) / Heterozygous mutation in the GBA1 gene (N370S/wt) No Yes (specify)	

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> 26/4/2012	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> Diciembre-2014 / December-2014
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Aislamiento de fibroblastos mediante digestión enzimática (colagenasa, hialuronidasa y DNasa I). Los fibroblastos fueron congelados y, posteriormente, descongelados para realizar experimentos de reprogramación en diciembre-2014. 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 y 50u/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomycin. Fibroblast isolation by enzymatic digestion (collagenase, hyaluronidase and DNase I). Fibroblasts were kept frozen and later thawed for reprogramming experiments in December-2014. 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 and 50u/ml of penicillin and 50µg/ml of streptomycin.
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>	Pendiente. Ver a continuación, la huella genética de la línea celular IC-PD2-F-iPS-4F-1. Pending. See next, the genetic fingerprinting of cell line IC-PD2-F-iPS-4F-1.
¿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>	Sí, en pase 4 Yes, at passage4
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>	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. 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. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	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 β-mercaptoetanol, 20% de KnockOut Serum Replacement, 6ng/ml FGF-2 y 100u/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomycin. 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 β-mercaptoethanol, 20% KnockOut Serum Replacement, 6 ng/ml FGF-2 and 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) <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>	Planas, redondeadas o poligonales (la mayoría) y algunas alargadas y/o en forma de cuña. Bordes nítidos. Tamaño medio de las colonias: 1.47 mm ± 0.15 Ratio núcleo/citoplasma elevada. Flat, round or polygonal (the majority) with some being elongated and/or wedge-like. Defined borders. Mean size of colonies: 1.47 mm ± 0.15 High nucleus/cytoplasm ratio
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Congelación: 20-25 colonias/vial en 90% FBS y 10% DMSO 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. Freezing: 20-25 colonies/vial in 90% FBS and 10% DMSO 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) <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i>	Disponibilidad de células criopreservadas en Pase 14. Cryopreserved cells at Passage 14 are available
¿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 <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	
	Oct 4	qPCR	6-10	+	ver Anexo 1
	Nanog	Inmunofluorescencia/ qPCR	12/6-10	+	ver Anexo 1
	Sox 2	qPCR	6-10	+	ver Anexo 1
	SSEA3	Inmunofluorescencia	11	+	ver Anexo 1
	SSEA4	Inmunofluorescencia	12	+	ver Anexo 1
	TRA-1-60	Inmunofluorescencia	12	+	ver Anexo 1
	TRA-1-81	Inmunofluorescencia	11	+	ver Anexo 1
	Fosfatasa. Alk	Actividad	11	+	ver Anexo 1
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	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>	In vitro Dif. PAX6/ TUJ1	11-12	+	ver Anexo 2
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	In vitro Dif. DESMIN	11-12	+	ver Anexo 2
	Endoderm <i>Endoderm</i>	In vitro Dif. AFP	11-12	+	ver Anexo 2
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	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 <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método</th> <th>Marcador</th> <th>Nº pase</th> <th>Resultado</th> <th></th> </tr> <tr> <th>Comentarios</th> <th>Method</th> <th>Marker</th> <th>Passage n</th> <th>Results</th> <th>Comments</th> </tr> </thead> <tbody> <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> </tbody> </table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado		Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results	Comments	Ectodermo <i>Ectoderm</i>						Mesodermo <i>Mesoderm</i>						Endodermo <i>Endoderm</i>					
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																											
Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results	Comments																										
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>																															
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	46, XX, cariotipo normal. Pase 17. Ver Anexo 3. 46, XX, cariotipo normal. Passage 17. See Annex 3.																														
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>	GenePrint10 Marker Test Sample Profile (ver Anexo 4 / see Aneex 4): TH01: 9, 9.3 D21S11: 29, 30 D5S818: 12 D13S317: 8, 11 D7S820: 9, 12 D16S539: 11 CSF1PO: 12 AMEL: X vWA: 16 TPOX: 8, 11																														
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	El método de reprogramación celular empleado es no integrativo. Ver a continuación. The cell reprogramming method used is not integrative. See next.																														

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	Mediante RT-PCR. Se ha analizado y detectado la ausencia de expresión de los transgenes así como el genoma SeV en la línea PD2 (IC-PD2-F-iPS-4F-1). Ver Anexo 5. By RT-PCR. We analyzed and detected the absence of transgen expression and SeV genome in line PD2 (IC-PD2-F-iPS-4F-1). See Annex 5
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>	Mediante secuenciación usando la tecnología de Sequenom MassArray (CEGEN). El espectro de masas a partir de muestras que presentan la mutación N370S en heterocigosis muestra picos de A y G en las posiciones correspondientes (en torno a 5200 y 5280). Ver Anexo 6 Using Sequenom MassArray technology. Mass spectrum from samples presenting N370S mutation in heterozygosis displays peaks for A and G at the corresponding positions (around 5200 and 5280). See Annex 6
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo por PCR. Ver Anexo 7 Negative by PCR. See Annex 7

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Carlos Vicario Abejón	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avenida Doctor Arce 37, 28002 Madrid, España
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto Cajal-CSIC y CIBERNED	Teléfono (phone): 34-91-5854721 Fax: 34-91-5854754 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):

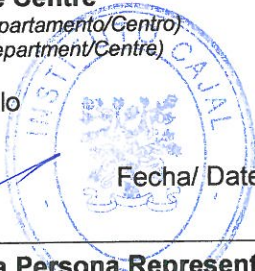
Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

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 <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre</i> Ricardo Martínez Murillo 26/02/2018 	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Carlos Vicario Abejón  26/02/2018
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Ricardo Martínez Murillo, Director	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Instituto Cajal-CSIC. Avenida Doctor Arce 37 28002 Madrid , España/Spain	Teléfono /Telephone: 34-91-5854721 Fax: 34-91-5854754 E-mail: cvicario@cajal.csic.es