

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div> Fresco <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> </div> <div> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> </div> </div>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 08.07.2015	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 09.07.2015
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Medio de cultivo/ Culture media: IMDM + 10%FBS + 0,5% Penicilin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). 37°C- 5%CO2
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>	Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5) <i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 5)</i>
¿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, 7 viales a p2 y 8 viales a p3 <i>Yes, 7 vials at p2 and 8 vials at p3</i>
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)</i> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Generación de células de pluripotencia inducida (iPSC) a partir de los fibroblastos de un paciente (p4) que presentaba la duplicación 7q11.23 mediante la estrategia retroviral con expresión ectópica de 4 factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc). Mediante el uso de un plásmido retroviral (pMXs OCT4 VP16 SOX2-mOrange) y un constructo tricistrónico (pMXsKLF4 MYCGFP) <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts (p4) of a patient showing the 7q11.23 duplication, by the retroviral strategy with ectopic expression of 4 transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc), using the retroviral plasmid (pMXs OCT4 VP16 SOX2-mOrange) and a tricistronic constructor (pMXsKLF4 MYCGFP).</i>
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>	Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD112Sk). Culture medium: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, InVitrogen corporation), 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 20% Knockout Serum Replacement (Invitrogen) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). Support: Matrigel (Corning BV) Culture medium: mTeSR Basal Medium Kit (StemCell Technologies)

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>Colonias grandes poligonales, ligeramente aplanadas, de un tamaño entre 1- 3 mm de diámetro de diversas formas con bordes lisos. Células de tamaño uniforme y una elevada relación núcleo/citoplasma.</p> <p><i>Large and flat polygonal colonies, with uniformly sized cells of 1-3 mm of diameter. They have several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio.</i></p>
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	<p>La congelación de los clumps de colonias se ha realizado en FBS (90%) + DMSO (10%), mediante congelador programable (-0.5°C/min.) o mediante contenedor de isopropanol a -80°C (-1°C/min.). Los viales se han descongelado a 37°C mediante descongelación rápida.</p> <p><i>The clumps of colonies were cryopreserved in FBS(90%)+ DMSO (10%), by programmable freezer (-0.5°C/min.) or by isopropanol container at -80°C (-1°C/min). Vials were thawed quickly at 37°C.</i></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>Viales congelados a pases 3-14</p> <p><i>Frozen vials at passages 3-14</i></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"/> Comentarios/ Comments:	¿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

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>
Anexo 1 <i>Annex 1</i>	Oct 4	inmunocitoq.	13	+	
	Nanog	inmunocitoq. .	13	+	
	Sox 2	inmunocitoq. .	13	+	
	SSEA3	inmunocitoq. .	13	+	
	SSEA4	inmunocitoq. .	13	+	
	TRA-1-60	inmunocitoq. .	13	+	
	TRA-1-81	inmunocitoq. .	13	+	
	Fosfatasa. Alk	actividad.	13	+	
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq.	Tuji1	16	+
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA	16	+
	Endoderm <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	FOXA2	16	+
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i>	Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico. Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 (ver Anexo 2).				
<i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	<i>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/ (see Annex 2).</i>				

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table><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><tr><td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td><td>inmunohist.</td><td>Tuj1-GFAP</td><td>17</td><td>+/+</td><td></td></tr><tr><td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td><td>inmunohist.</td><td>ASMA-ASA</td><td>17</td><td>+/+</td><td></td></tr><tr><td>Endodermo <i>Endoderm</i></td><td>inmunohist.</td><td>AFP-FOXA2</td><td>17</td><td>+/+</td><td></td></tr></table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado		Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results	Comments	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunohist.	Tuj1-GFAP	17	+/+		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunohist.	ASMA-ASA	17	+/+		Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunohist.	AFP-FOXA2	17	+/+	
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																											
Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results	Comments																										
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunohist.	Tuj1-GFAP	17	+/+																											
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunohist.	ASMA-ASA	17	+/+																											
Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunohist.	AFP-FOXA2	17	+/+																											
	<p>Inyección intratesticular en ratones SCID de 4•10 mill de células indiferenciadas y tras 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo (Anexo 3).</p> <p><i>4·10 mill of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. After 8 weeks, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3).</i></p>																														
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	46,XY p9; p16																														
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>Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5)</p> <p><i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 5)</i></p>																														
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	<p>La PCR evidenció la integración de los 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc. (Anexo 6)</p> <p><i>Integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc was shown by PCR (Annex 6)</i></p>																														

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	<p>Se evidenció el silenciamiento de los 4 genes de reprogramación: Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc mediante qRT-PCR (Anexo 6)</p> <p><i>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown by qRT-PCR (Annex 6)</i></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>Se presenta el detalle de la duplicación identificada en la banda 7q11.23 que coincide con la duplicación que presenta el paciente y que se ha descrito en la literatura como causante del Síndrome de la duplicación 7q11.23 (Anexo 7).</p> <p><i>Duplication in the band 7q11.23 has shown. This duplication is identical to the one present in the patient and that has been described in literature as the cause of the Syndrome of duplication 7q11.23 (Annex 7).</i></p>
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	<p>Negativo por PCR (Anexo 8)</p> <p><i>Negative by PCR (Annex 8)</i></p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Gran Via de l'Hospitalet 199. 08908 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	Teléfono (phone): 93 3160360 Fax: 93 31603601 E-mail: blc@cmrb.eu

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Roser Corominas	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> C/ Dr.Aiguader 88, lab 720, 08003 Barcelona
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Universitat Pompeu Fabra	Teléfono (phone): +34 933 160 821 Fax: +34 933 160 901 E-mail: rosercorominas@gmail.com

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: 16/05/2018	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha/Date: 16. 01. 18
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Angel Raya. Director	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Gran Via de l'Hospitalet 199. 08908 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona	Teléfono /Telephone: 93 3160320 Fax: 93 3160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)  Fecha/Date:	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  18/04/2018 Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Enric Vallduví Botet. Vicerector. Direcció de projectes en l'àmbit de la Recerca, Universitat Pompeu Fabra	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Plaça de la Mercè, 10-12 08002 Barcelona	Teléfono /Telephone: 933160899 Fax: E-mail: vr.recerca@upf.edu

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR DUPSW FiPS 501-R4F-2 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Diferenciación *in vivo*

Anexo 4: Cariotipo

Anexo 5: Resultados microsatélites

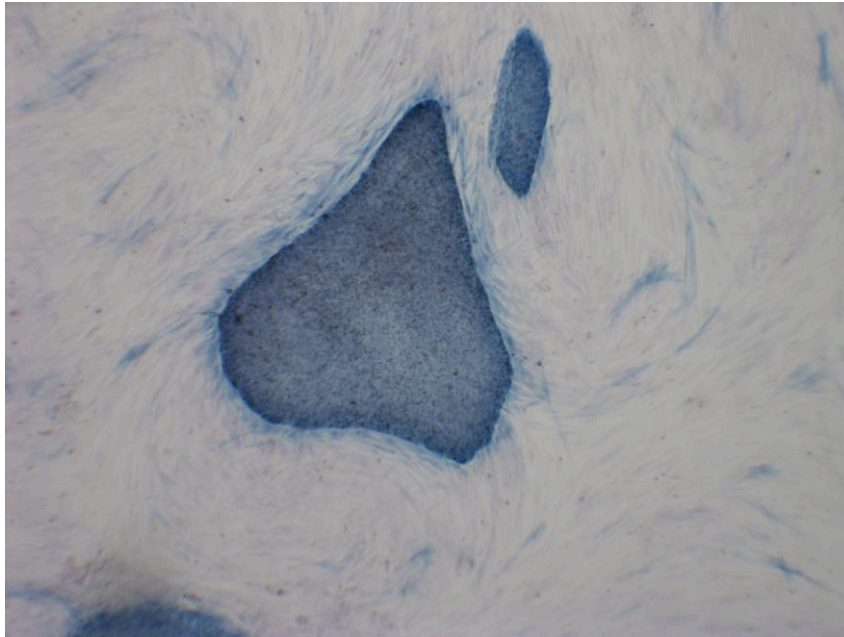
Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 7: Genotipado

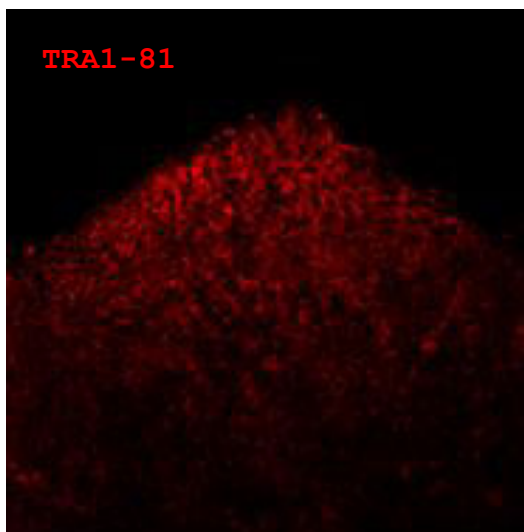
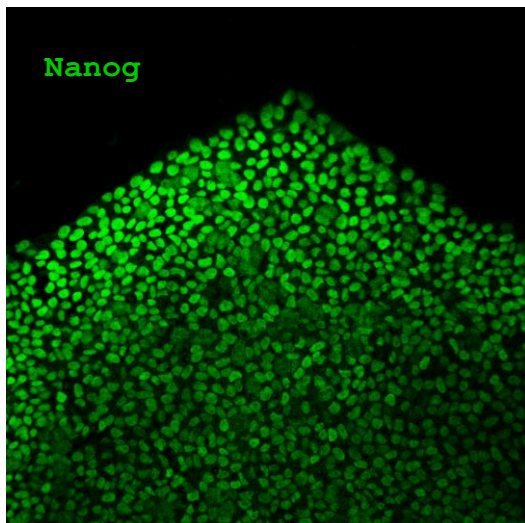
Anexo 8: Resultado Test de micoplasma (PCR)

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

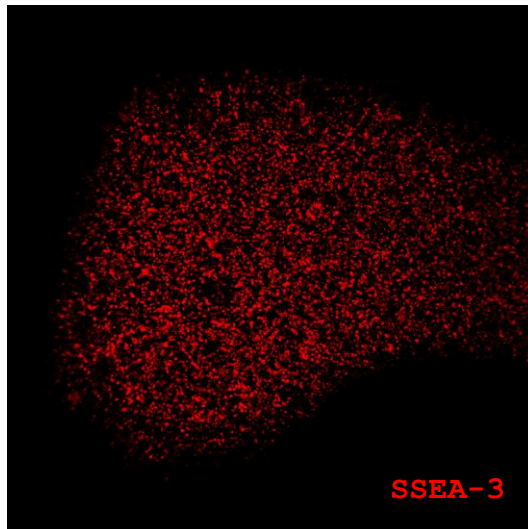
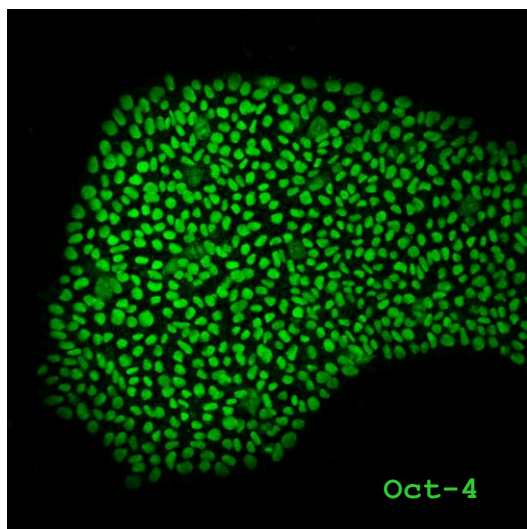


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



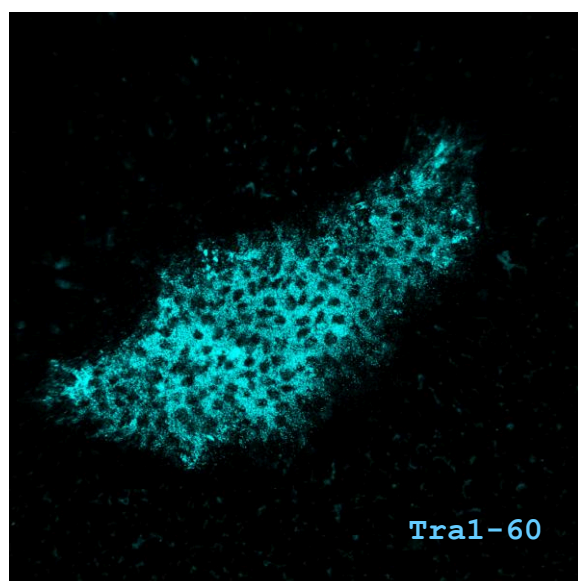
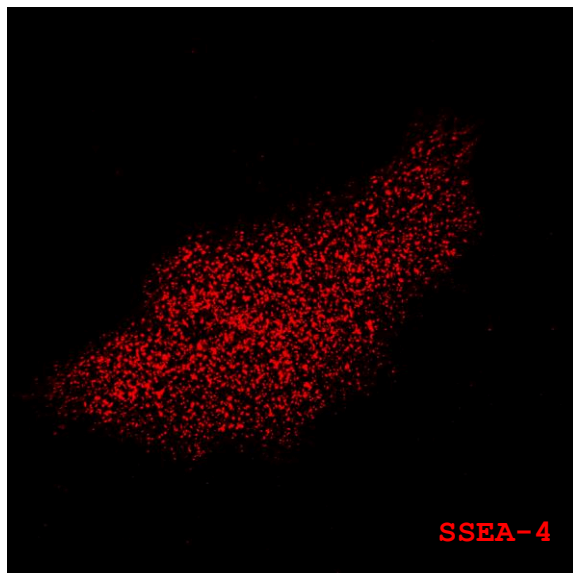
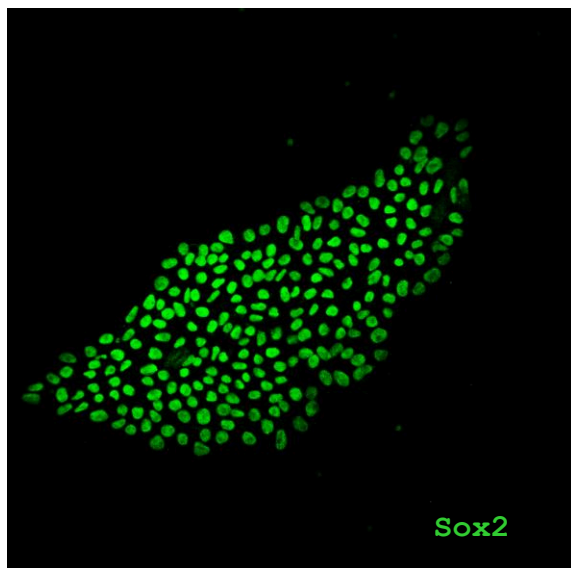
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

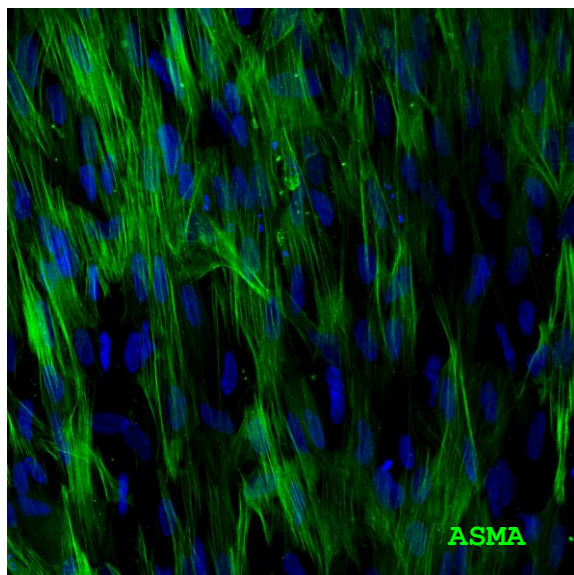
Oct-4 y SSEA-3



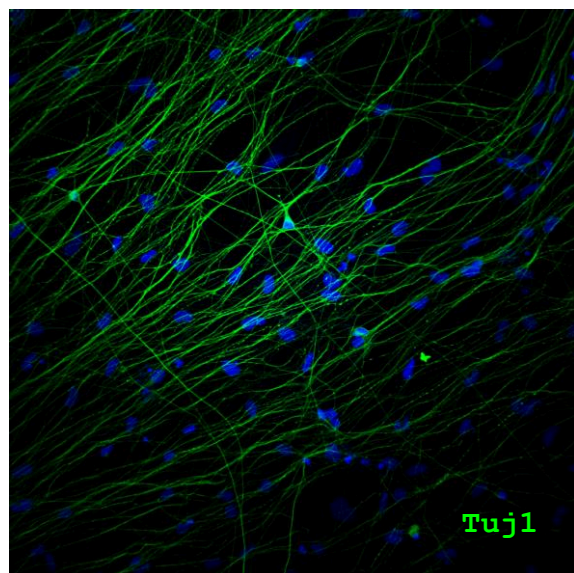
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

Diferenciación *in vitro*



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASMA**



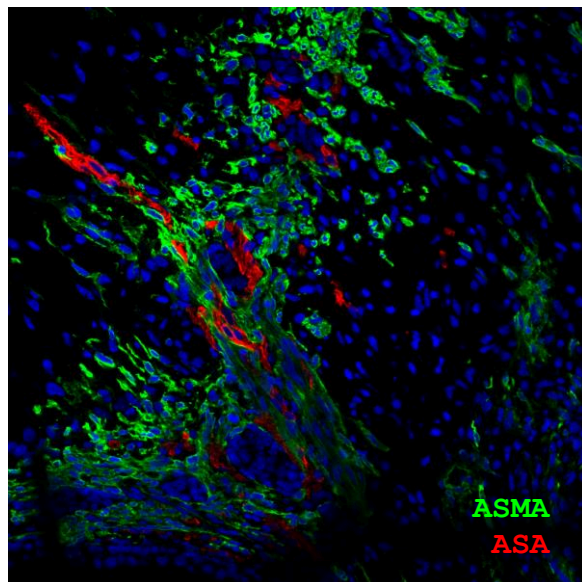
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**.



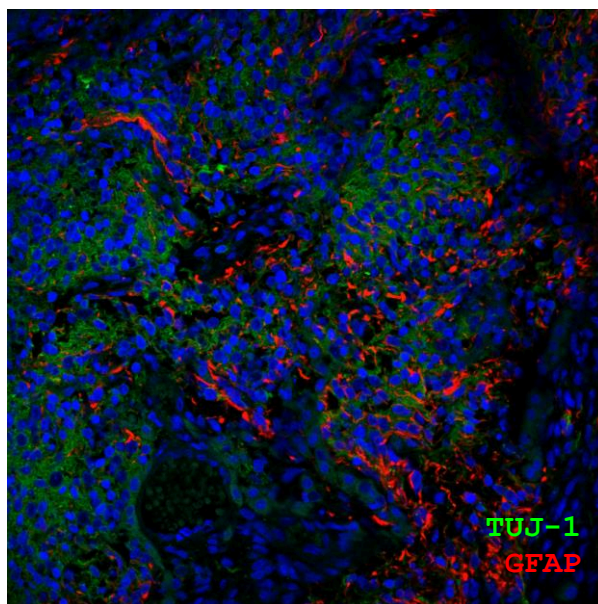
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **FOXA2**

Anexo 3

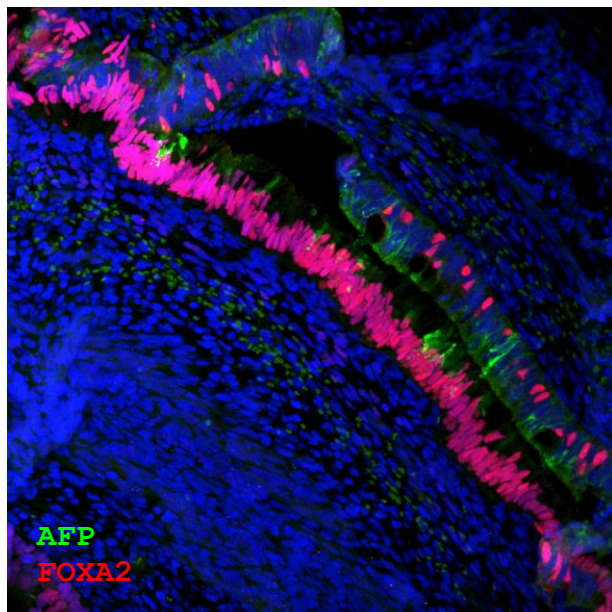
Diferenciación *in vivo*



Diferenciación *in vivo* a mesodermo: Células positivas para **ASMA y ASA**



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **TUJ1 y GFAP**.

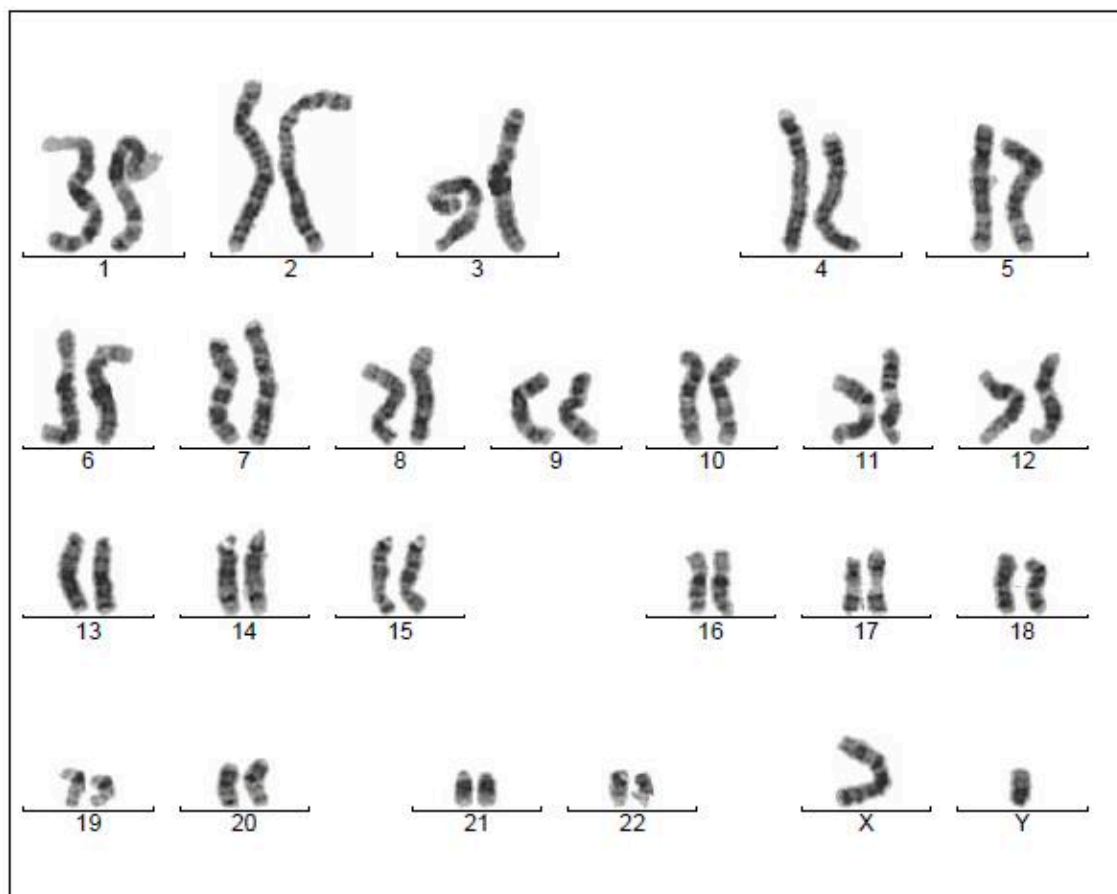


Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 4

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A179625

Patient name: DUPSW FiPS 501-R4F-2 p16

Specimen type: stem cells

Result: 46,XY

Anexo 5

Resultado microsatélites



Table 5. The GenePrint® 10 System Allelic Ladder Information.

STR Locus	Label	Size Range of Allelic Ladder Components ^{1,2} (bases)	Repeat Numbers of Allelic Ladder Components
TH01	FL	156–195	4–9, 9.3, 10–11, 13.3
D21S11	FL	203–259	24, 24.2, 25, 25.2, 26–28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36–38
D5S818	JOE	119–155	7–16
D13S317	JOE	176–208	7–15
D7S820	JOE	215–247	6–14 ³
D16S539	JOE	264–304	5, 8–15
CSF1PO	JOE	321–357	6–15
Amelogenin	TMR	106, 112	X, Y
vWA	TMR	123–171	10–22
TPOX	TMR	262–290	6–13

¹The length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analysis.

²When using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard 600, the calculated sizes of allelic ladder components may differ from those listed. This occurs because different sequences in allelic ladder and ILS components may cause differences in migration. The dye label also affects migration of alleles.

³HeLa cells have a microvariant allele 13.3 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see www.cstl.nist.gov/strbase/var_D13S317.htm#Tri).

Figura 1. Información de la casa comercial Promega sobre la relación entre cada uno de los loci STR amplificados y las repeticiones (en rangos de tamaño y número) que pueden estar presentes en dichos productos de PCR.

RESULTADOS:

A continuación se detalla la correlación entre el código de muestra de Biobanco y la línea celular procesada:

código Biobanco	Línea celular
32161597002	DUPSW FiPS501 R4F-2, P15

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a los alelos encontrados para cada uno de los marcadores microsatélites analizados.

Línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
DUPSW FiPS501 R4F-2, P15	X, Y	11, 12	11, 12	9, 11	27, 28	12, 13	9, 11	6, 9.3	8, 11	16, 18

Granada, a 28 de Diciembre de 2016

Área de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

A continuación se detalla la correlación entre el código de muestra de Biobanco y la línea celular procesada:

código Biobanco	Línea celular
32161593002	DUPSW 501 F

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a los alelos encontrados para cada uno de los marcadores microsatélites analizados.

Línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
DUPSW 501 F	X, Y	11, 12	11, 12	9, 11	27, 28	12, 13	9, 11	6, 9.3	8, 11	16, 18

Granada, a 28 de Diciembre de 2016



Área de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

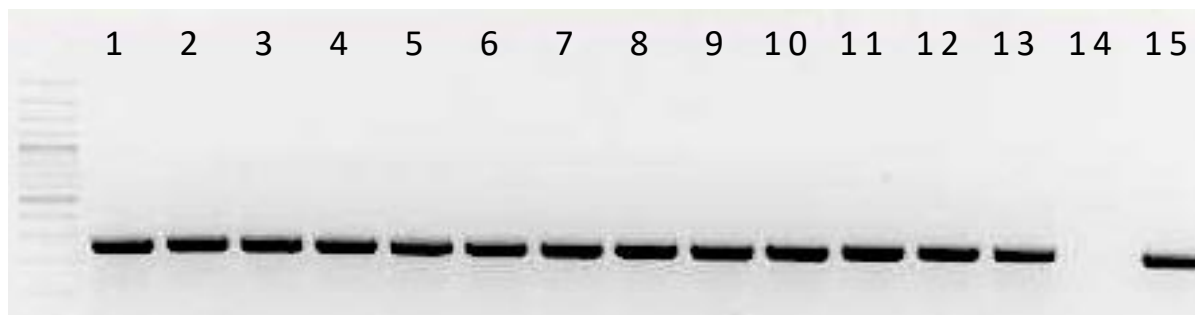
Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes DUPSW FiPS 501-R4F-2
y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

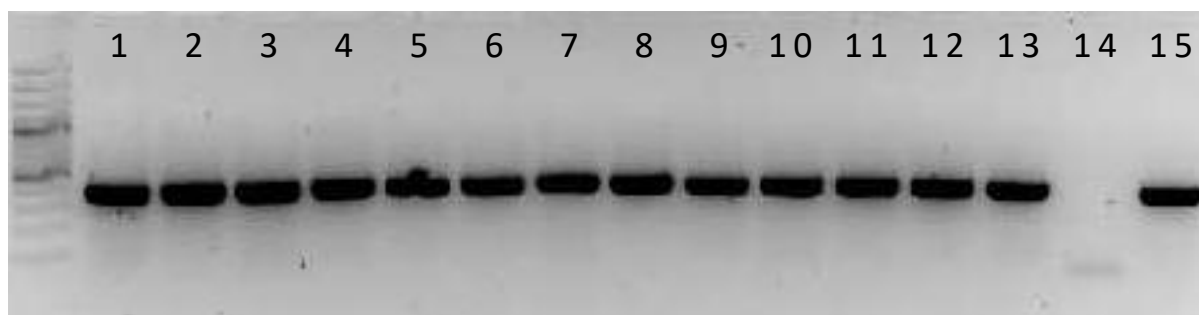
Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

M16091 Integration PCR 22/06/16

Oct4 – Sox2



Klf4 - cMyc

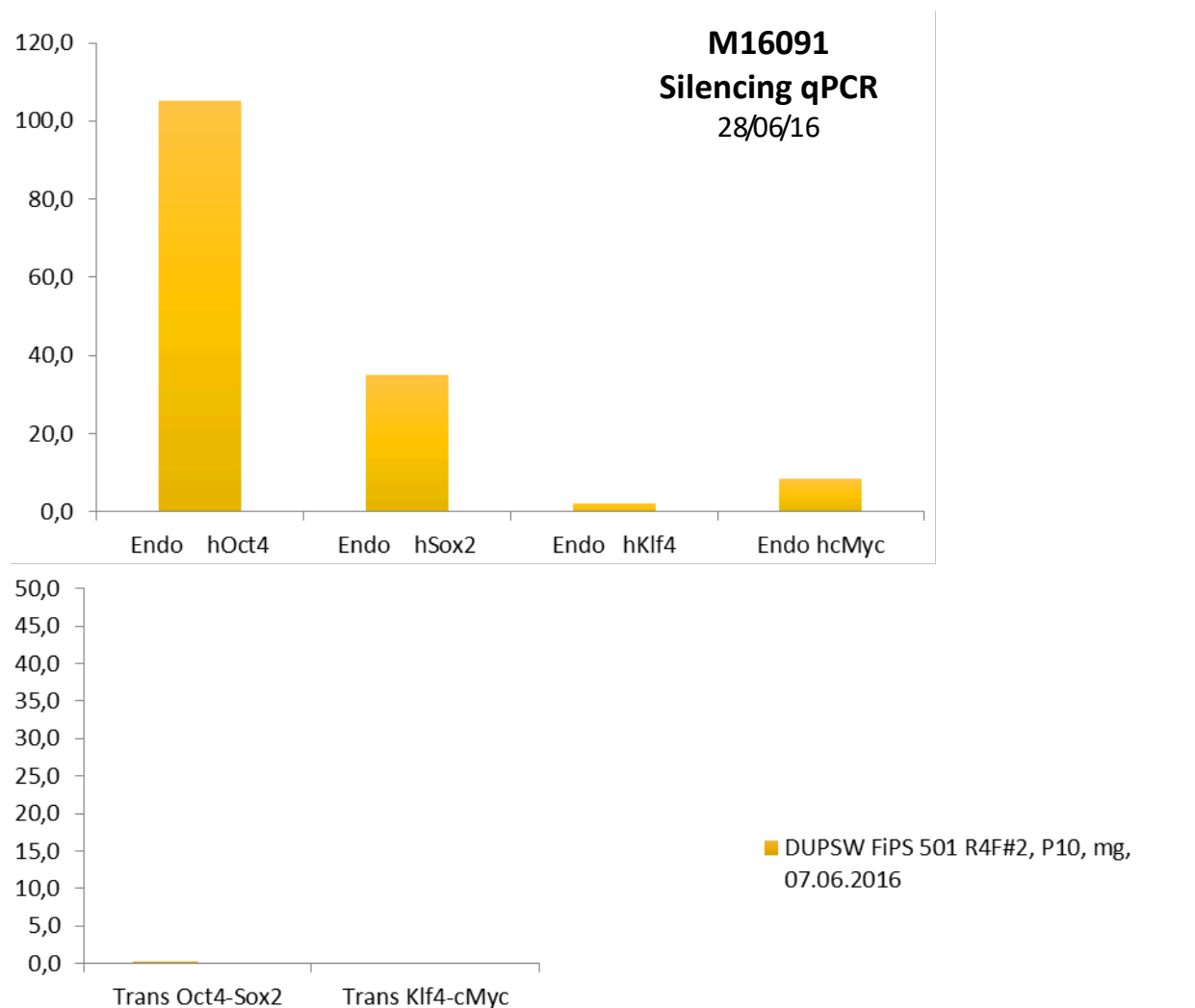


8. DUPSW FiPS 501 R4F#2, P10

14. Negative Control (H2O)

15. Positive Control

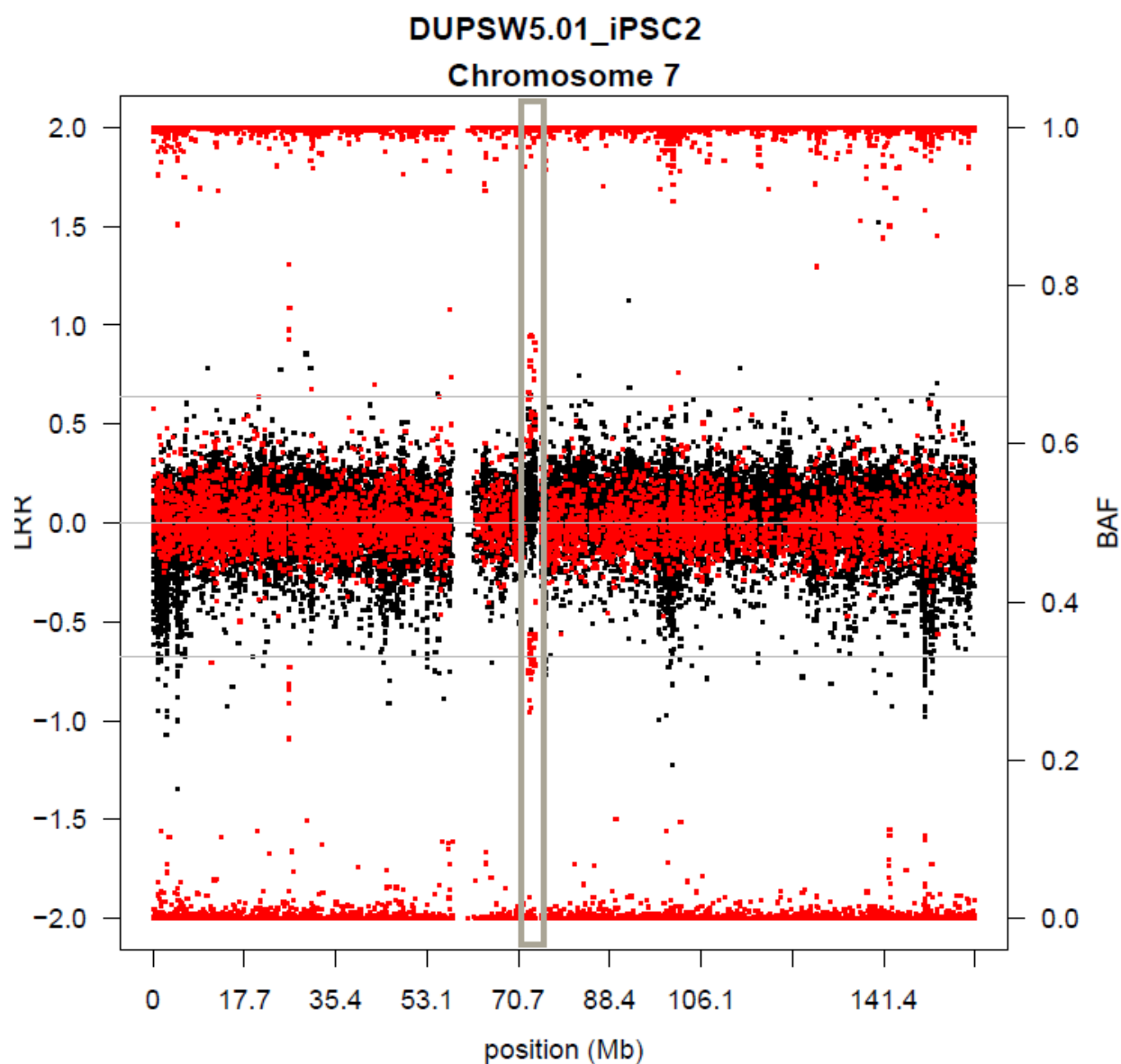
Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los genes utilizados para generar la línea



Silenciamiento de los transgenes de reprogramación. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH

Anexo 7

Genotipado



SNP-array mostrando la presencia de la duplicación de la región 7q11.23 en la línea de hiPSC.

Anexo 8

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

09-11-2016

1 2 3



1. DUPSW FiPS 501 R4F-2 p14
2. CT -
3. CT +