

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 to Deposit a human iPS cell line

FECHA: 10.12.19

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 from 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>	THD FiPS B1 Ep6F-15
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 dermis procedentes de biopsia de piel. <i>Dermal fibroblasts from skin biopsy.</i>
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino, 15 años Female, 15 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Deficiencia de la Tirosina Hidroxilasa <i>No Yes (specify) Tyrosine Hydroxylase Deficiency</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) GEN TH <i>No Yes(specify) c.982C>T, p.R238W/c.1196 C>T, p.T399M</i>

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" 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> 3.2016	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 13.05.2016
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 iPSc generada (Anexo 5) <i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical to the markers of the iPSc 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, p6 y p7 Yes, p6 y p7
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> Specify factors and plasmids used for reprogramming	Generación de las células pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos (p9) de un paciente con déficit de la tirosina hidroxilasa, mediante la nucleofección con Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofactor kit (Lonza, #VPD-1001) y vectores episomales con expresión ectópica de 6 factores de transcripción (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, Addgene #27077; pCXLE-hSK, Addgene # 27078; pCXLE-hUL, Addgene # 27080). En paralelo, se nucleofectaron fibroblastos con el plásmido pCXLE-EGFP (Addgene # 27082) como control para calcular la eficiencia. <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts (p9) of a patient having Tyrosine Hydroxylase Deficiency, by nucleofection with Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofactor kit (Lonza, #VPD-1001) and episomal vectors with ectopic expression of 6 transcription factors (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, Addgene #27077; pCXLE-hSK, Addgene # 27078; pCXLE-hUL, Addgene # 27080). In parallel, fibroblasts were nucleofected with a control plasmid carrying EGFP (pCXLE-EGFP, Addgene # 27082) to calculate efficiency of nucleofection.</i>
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>	Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD1112Sk). 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)

<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>Colcnias 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>
<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<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 in isopropanol containers at -80°C (-1°C/min). Vials were thawed quickly at 37°C.</i></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>Viales congelados a pase 7-13</p> <p><i>Frozen vials at passage 7-13</i></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

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.	14	+		
	Nanog inmunocitoq.	14	+		
	Sox 2 inmunocitoq.	14	+		
	SSEA3 inmunocitoq.	14	+		
	SSEA4 inmunocitoq.	14	+		
	TRA-1-60 inmunocitoq.	14	+		
	TRA-1-81 inmunocitoq.	14	+		
	Fosfatasa. Alk actividad	5	+		
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>	inmunocitoq.	Tuj1/GFAP	11	+/+	
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA/ASA	11	+/+	
Endoderm <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	FOXA2	11	+	
<p>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).</p> <p><i>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (see Annex 2).</i></p>					

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="434 181 608 241">Comentarios</th> <th data-bbox="608 181 746 241">Método</th> <th data-bbox="746 181 885 241">Marcador</th> <th data-bbox="885 181 1024 241">Nº pase</th> <th data-bbox="1024 181 1433 241">Resultado</th> </tr> <tr> <td data-bbox="434 241 608 277"></td> <td data-bbox="608 241 746 277"><i>Method</i></td> <td data-bbox="746 241 885 277"><i>Marker</i></td> <td data-bbox="885 241 1024 277"><i>Passage n</i></td> <td data-bbox="1024 241 1433 277"><i>Results</i></td> </tr> <tr> <td data-bbox="434 277 608 311"></td> <td data-bbox="608 277 746 311"></td> <td data-bbox="746 277 885 311"></td> <td data-bbox="885 277 1024 311"></td> <td data-bbox="1024 277 1433 311"><i>Comments</i></td> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="434 311 608 344">Ectodermo</td> <td data-bbox="608 311 746 344"></td> <td data-bbox="746 311 885 344"></td> <td data-bbox="885 311 1024 344"></td> <td data-bbox="1024 311 1433 344"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="434 344 608 378"><i>Ectoderm</i></td> <td data-bbox="608 344 746 378"></td> <td data-bbox="746 344 885 378"></td> <td data-bbox="885 344 1024 378"></td> <td data-bbox="1024 344 1433 378"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="434 412 608 445">Mesodermo</td> <td data-bbox="608 412 746 445"></td> <td data-bbox="746 412 885 445"></td> <td data-bbox="885 412 1024 445"></td> <td data-bbox="1024 412 1433 445"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="434 445 608 479"><i>Mesoderm</i></td> <td data-bbox="608 445 746 479"></td> <td data-bbox="746 445 885 479"></td> <td data-bbox="885 445 1024 479"></td> <td data-bbox="1024 445 1433 479"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="434 512 608 546">Endodermo</td> <td data-bbox="608 512 746 546"></td> <td data-bbox="746 512 885 546"></td> <td data-bbox="885 512 1024 546"></td> <td data-bbox="1024 512 1433 546"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="434 546 608 580"><i>Endoderm</i></td> <td data-bbox="608 546 746 580"></td> <td data-bbox="746 546 885 580"></td> <td data-bbox="885 546 1024 580"></td> <td data-bbox="1024 546 1433 580"></td> </tr> </tbody> </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>																																														
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>																																														
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46, XX p10, p17 (Anexo 3/ Annex 3)</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>Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPSC generada (Anexo 4)</p> <p><i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical to the markers of the iPSC line (Annex 4)</i></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>El análisis mediante PCR mostró la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC y en fibroblastos control no-nucleofectados; y presencia de plásmidos en fibroblastos control nucleofectados con GFP tras 72h tras nucleofección (Anexo 5).</p> <p><i>The copy number PCR showed absence of episomal plasmids in iPSCs and non-nucleofected fibroblasts and presence of plasmids in GFP nucleofected control fibroblasts 72h after nucleofection (Annex 5).</i></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>La QRT-PCR evidenció los niveles de expresión de mRNA de marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) y de p53 y EBNA-1 de fibroblastos control nucleofectados con GFP 72h tras nucleofección (pla) (Anexo 5)</p> <p><i>QRT-PCR showed mRNA expression levels of endogenous pluripotency markers (CDS) and no expression of transgenes (pla) and as control p53 and EBNA-1 expression of GFP nucleofected control fibroblasts 72h after nucleofection (Annex 5).</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>En el anexo 6 se muestra el detalle de las mutaciones presentes en la línea que también presenta el paciente</p> <p><i>Annex 6 shows the detail of the mutations present in the line that also presents the patient</i></p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Negativo por PCR (Anexo 7)</p> <p><i>Negative by PCR (Annex 7)</i></p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

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

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Àngels García Cazorla</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Passeig de Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Fundació Sant Joan de Déu (FSJD)</p>	<p>Teléfono (phone): 93 2532100</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: agarcia@sjdhospitalbarcelona.org</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

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.

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre)</p> <p>CMR[B]</p> <p>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Center of Regenerative Medicine in Barcelona</p> <p>Hospital Duran i Reynals 3ª planta Gran Via de l'Hospitalet, 199-203 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)</p>  <p>Fecha/ Date: 30/12/2019</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>30/12.19</p> <p>Fecha /Date</p>
---	---

<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre:</p> <p>Angel Raya. Director</p>	
--	--

<p>Dirección Postal: Postal Address:</p> <p>Hospital Duran i Reynals. Gran Via de l' Hospitalet 199. 08908. Hospitalet de Llobregat. Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: 93 3160320</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: gerencia@cmrb.eu</p>
---	---

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre)</p>  <p>Fecha/ Date: 27/01/2020</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha /Date</p>
--	---

<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre:</p> <p>Emili Bargalló Angerri. Director</p>	
--	--

<p>Dirección Postal: Postal Address:</p> <p>Edifici Docent. Santa Rosa, 39-57 08950 Esplugues del Llobregat (Barcelona)</p>	<p>Teléfono /Telephone: 936 00 97 51</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: info@fsjd.org</p>
--	--

**ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **THD FiPS B1-Ep6F-15** EN EL
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES**

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

Anexo 4: Resultados microsatélites

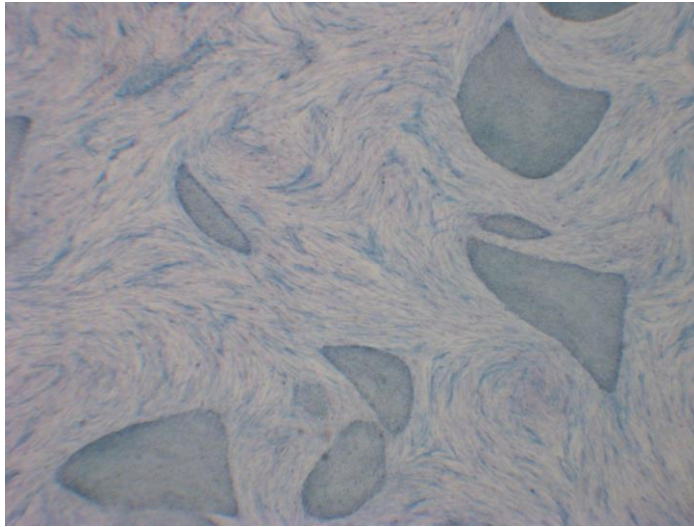
Anexo 5: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 6: Genotipado

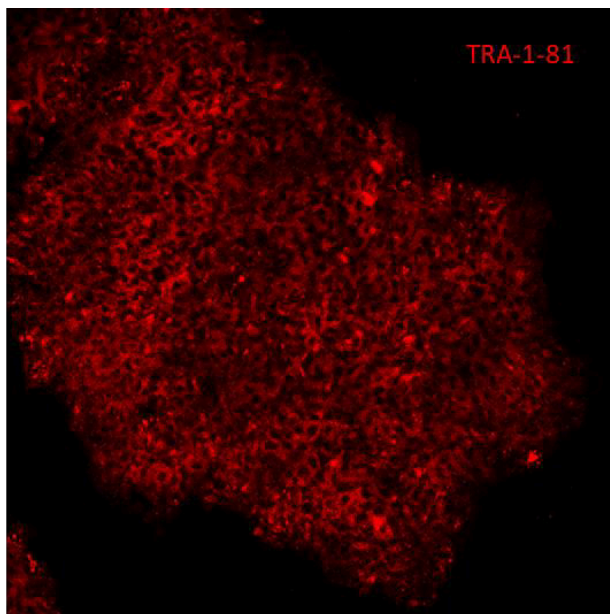
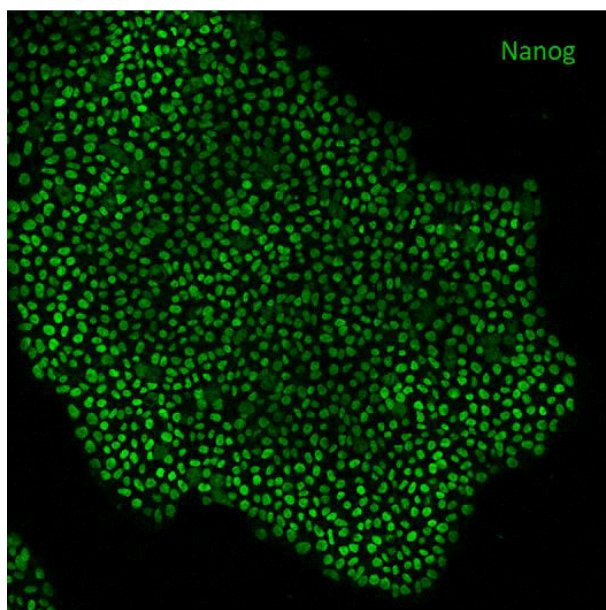
Anexo 7: Resultado Test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

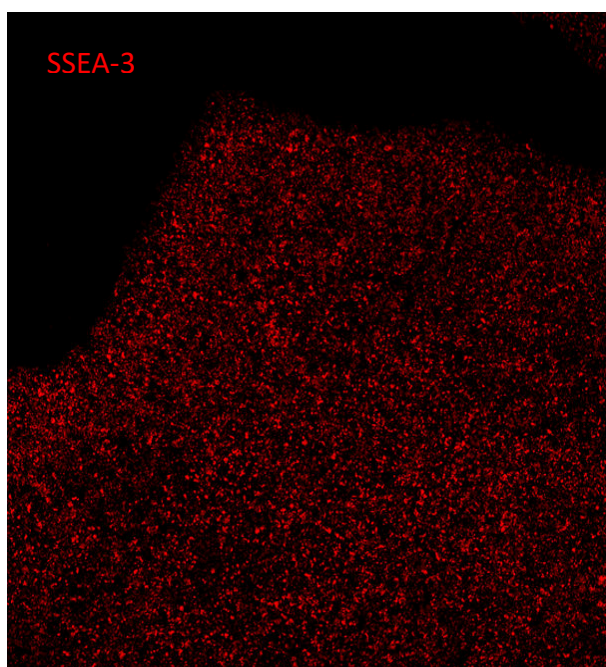
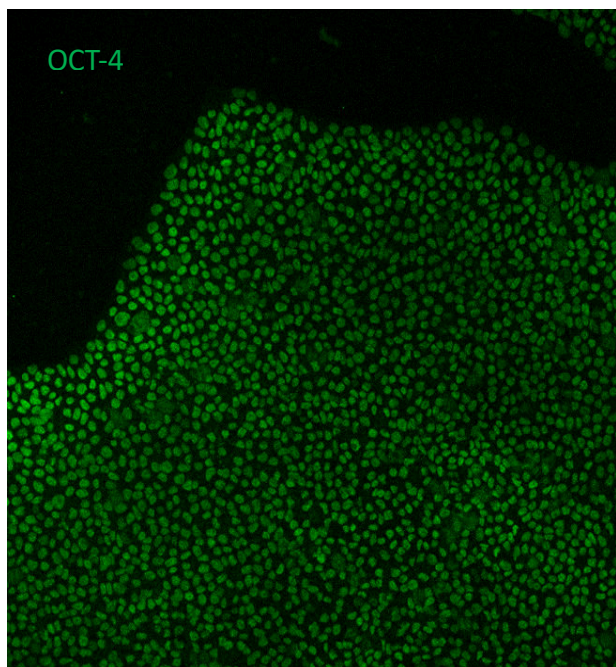


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



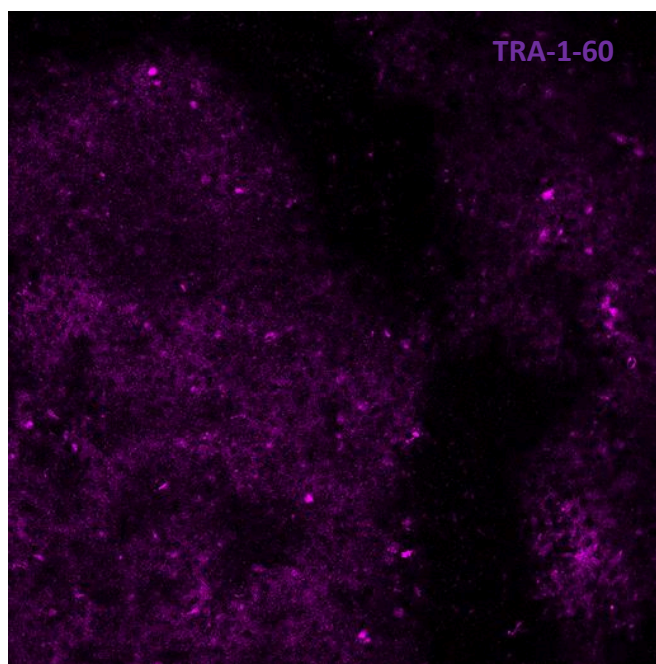
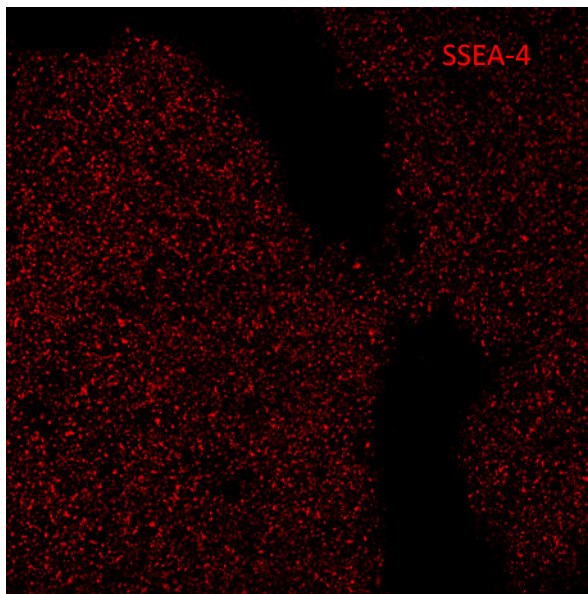
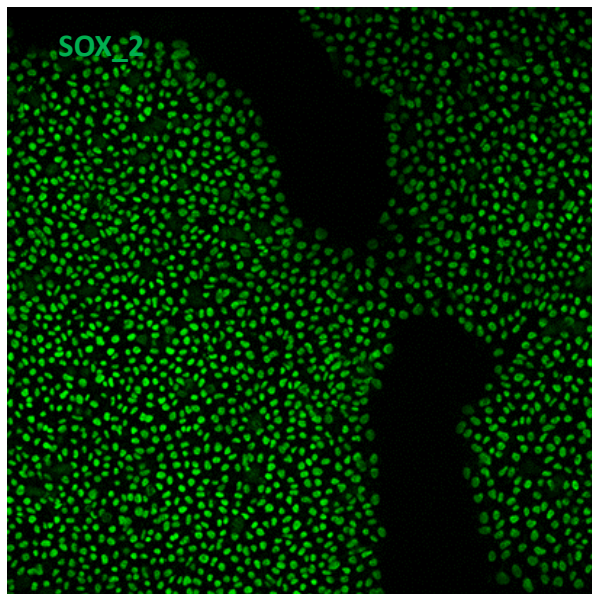
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

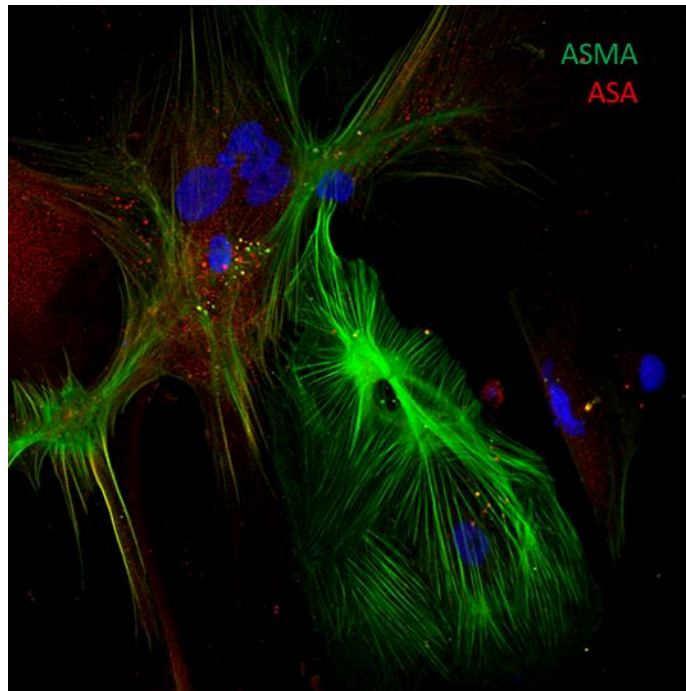


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

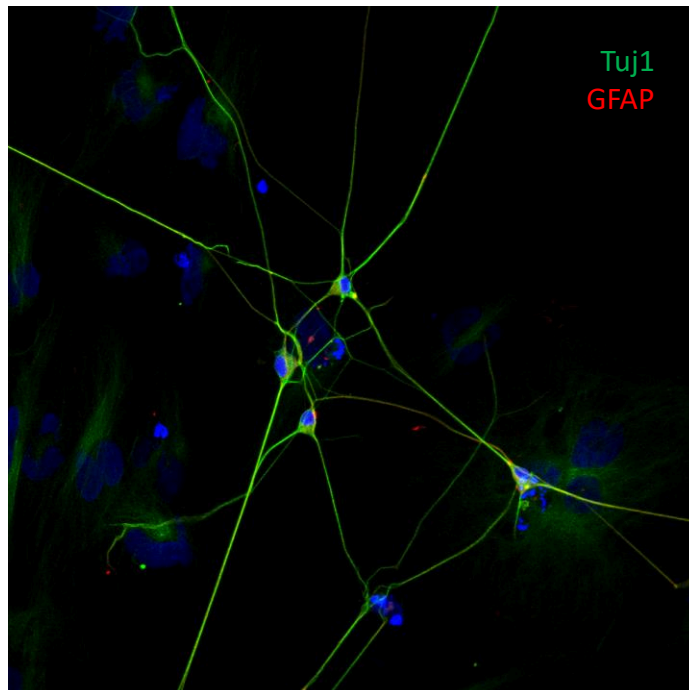
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

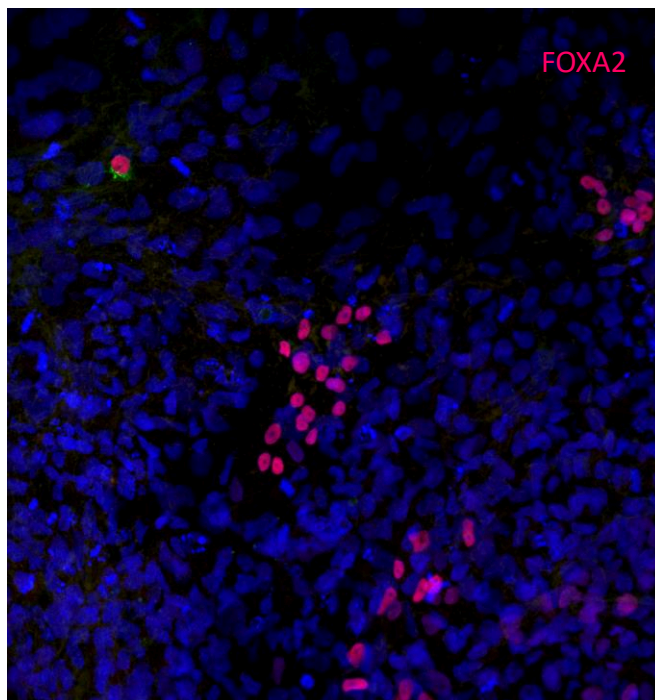
Diferenciación *in vitro*



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



Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1 Y GFAP**



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

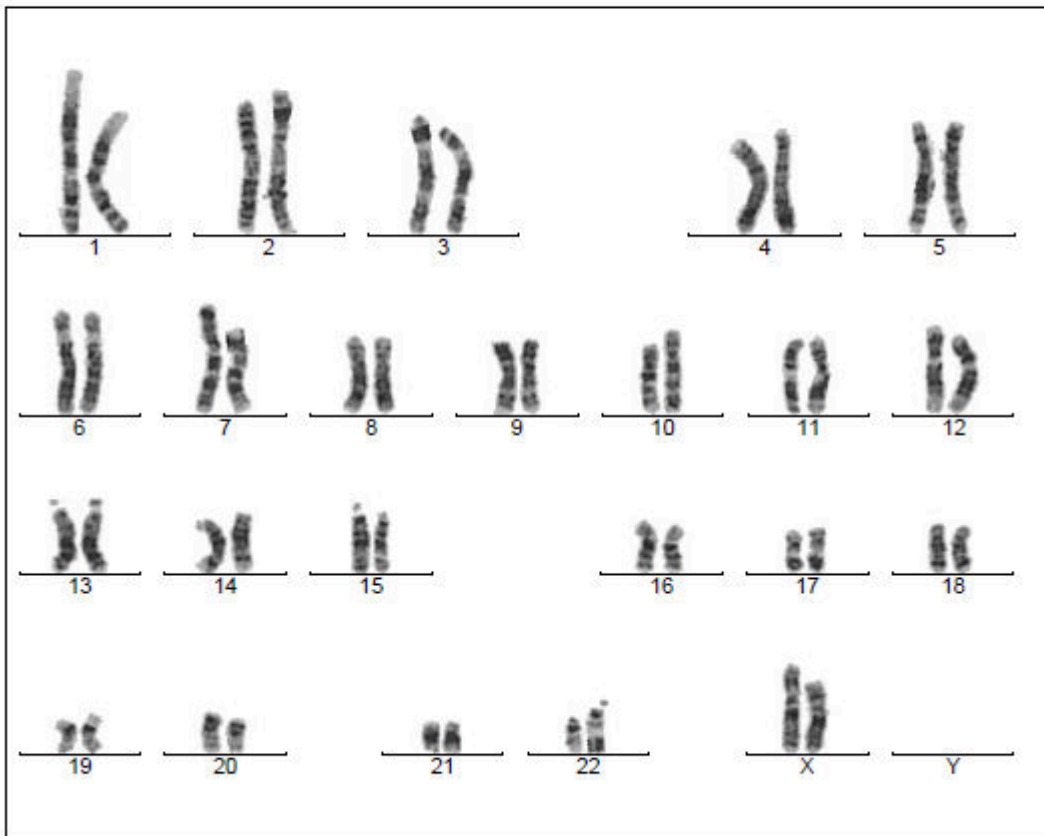


Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 3

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A179624

Patient name: THD FiPS B1-Ep6F-15 p17

Specimen type: stem cells

Result: 46,XX

Anexo 4

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
32161305002	THD FiPSB1 Ep6F-15 p13

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
THD FiPSB1 Ep6F-15 p13	X	11	11, 13	11	29, 30	11	10, 13	7	8, 11	16, 17

Granada, a 14 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
32161229002	THD B1 F p6

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
THD B1 F p6	X	11	11, 13	11	29, 30	11	10, 13	7	8, 11	16, 17

Granada, a 24 de Octubre de 2016



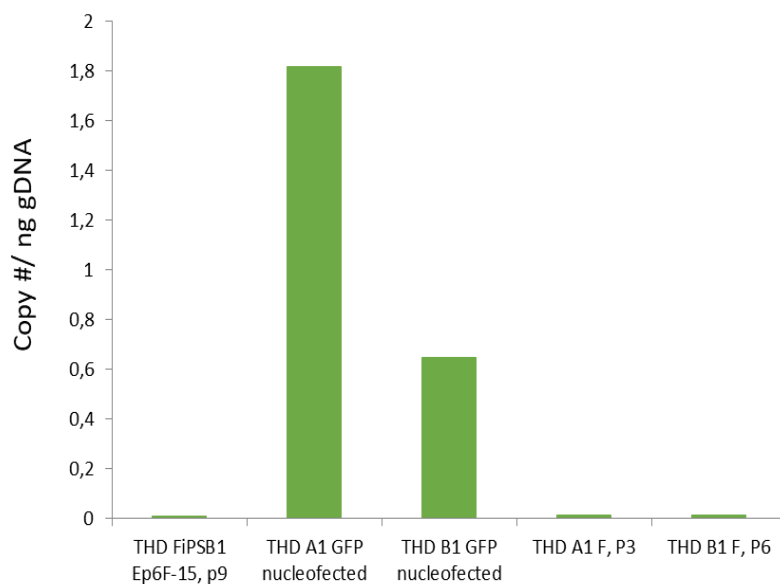
Área de Biología Molecular
Biobanco de ISPA

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

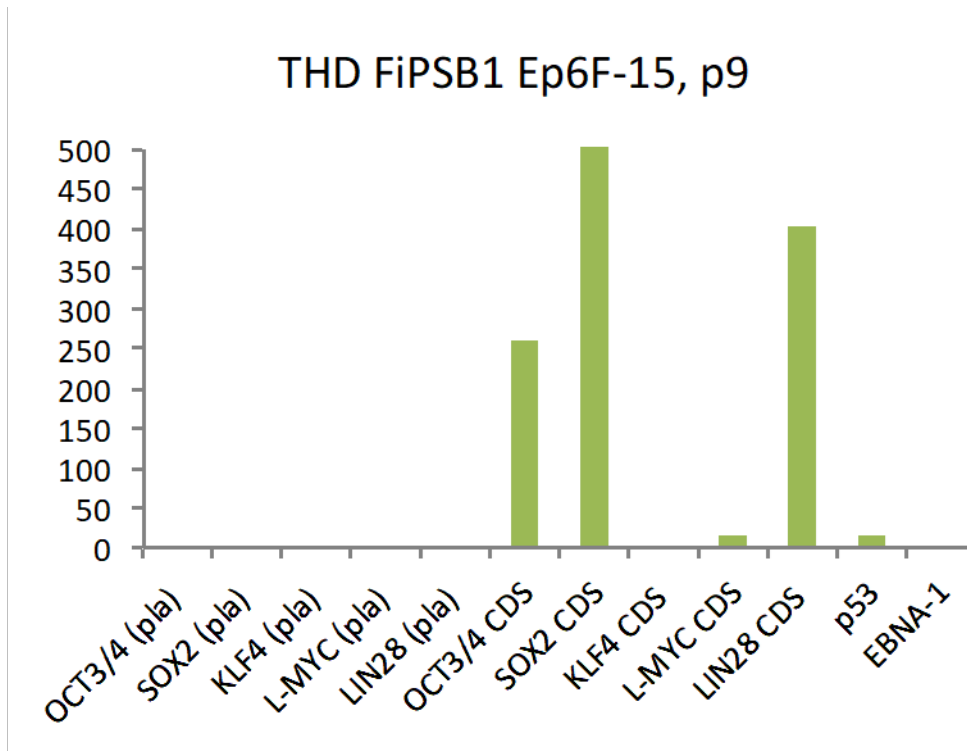
Anexo 5

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

PCR Absence of episomal vector



Análisis PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea **THD FiPS B1 Ep6F-15**, en fibroblastos control GFP-nucleofectados 72h después de la nucleofección (**THD A1 GFP y THD B1 GFP**) y en fibroblastos control no-nucleofectados (**THD A1 F y THD B1 F**).



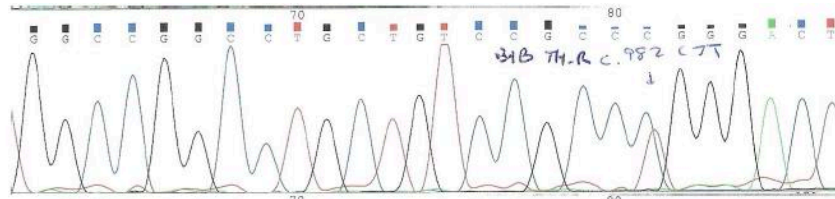
Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) en la línea **THD FiPS B1 Ep6F-15**

Anexo 6

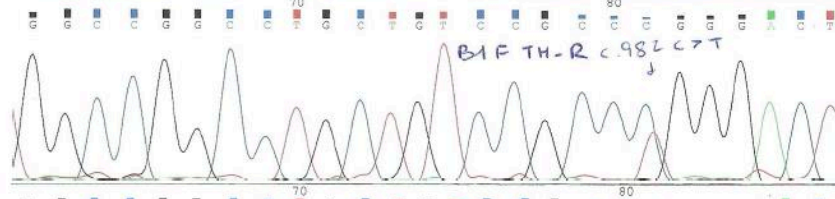
Genotipado

c.982C>T

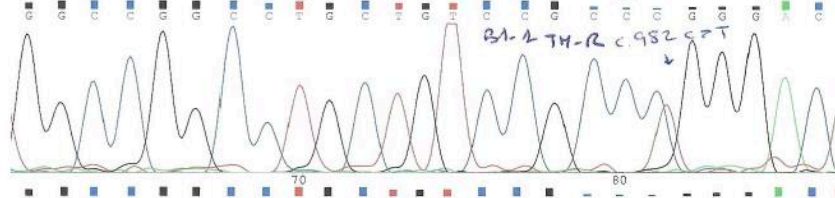
Blood



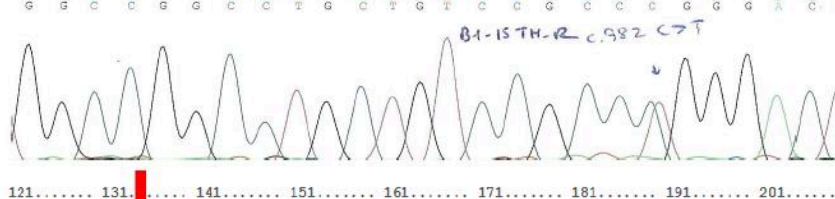
Fibroblasts



Clon 1



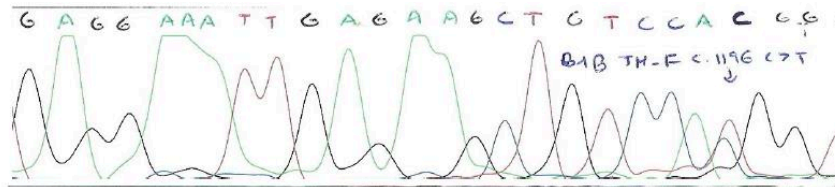
Clon 15



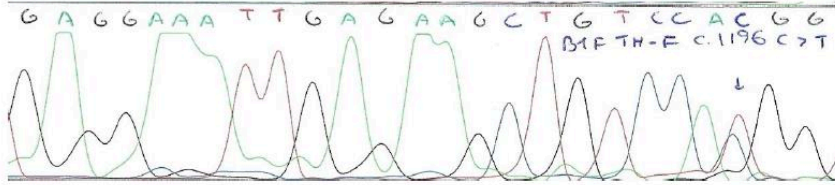
alignment position	111.....	121.....	131.....	141.....	151.....	161.....	171.....	181.....	191.....	201.....	211.....	
SeqReFc_982C_T	111	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCCcTGA
A13 Blood	57	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCC--TGA
A14 Fibroblasts	57	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCC--TGA
A15 Clon 1	57	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCC--TTA
A16 Clon 15	57	CCTGTGGCCG	GCTGCTGTC	CGCCGGGAC	TTCTGGCCA	GCTGGCCTT	CCGCGTGTTC	CAGTGCACCC	AGTATATCCG	CCACGCGTCC	TGCCCCATGC	ACTCC--TGA

c.1196C>T

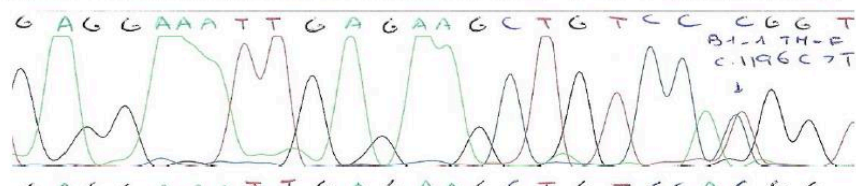
Blood



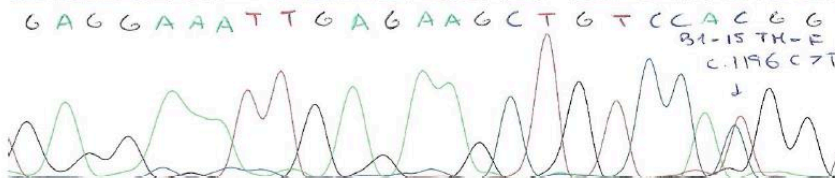
Fibroblasts



Clon 1



Clon 15



alignment position	1.....	11.....	21.....	31.....	41.....	51.....	61.....	71.....	81.....	91.....	10.....	
SeqRefc.1196C_T	1	tgaccacaggy	ctgacctctcc	ccatccttca	tctctcctgc	tccacaggac	attggcCTGG	CGTCCCTGGG	GGCCTGGAT	GAGGAAATTG	AGAAGCTGC	CACGGTGGGT
A17 Blood	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----CTGG	CGTCCCTGGG	GGCCTGGAT	GAGGAAATTG	AGAAGCTGC	CATGGTGGGT
A18 Fibroblasts	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----CTGG	CGTCCCTGGG	GGCCTGGAT	GAGGAAATTG	AGAAGCTGC	CATGGTGGGT
A19 Clon 1	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----GTCCCTGGG	GGCCTGGAT	GAGGAAATTG	AGAAGCTGC	CATGGTGGGT	CATGGTGGGT
A20 Clon 15	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----CCTGGAT	GGCCTGGAT	GAGGAAATTG	AGAAGCTGC	CATGGTGGGT	CATGGTGGGT

Se muestra las mutaciones en sangre y fibroblastos del paciente y en la línea generada (clon 15).

Anexo 7

Resultado Test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST



1. THD FiPS B1-Ep6F-15 p12
2. Negative Control (water)
3. Positive Control