

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [PD]FiPS006-4F-11 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

Anexo 4: Estudio microsatélites

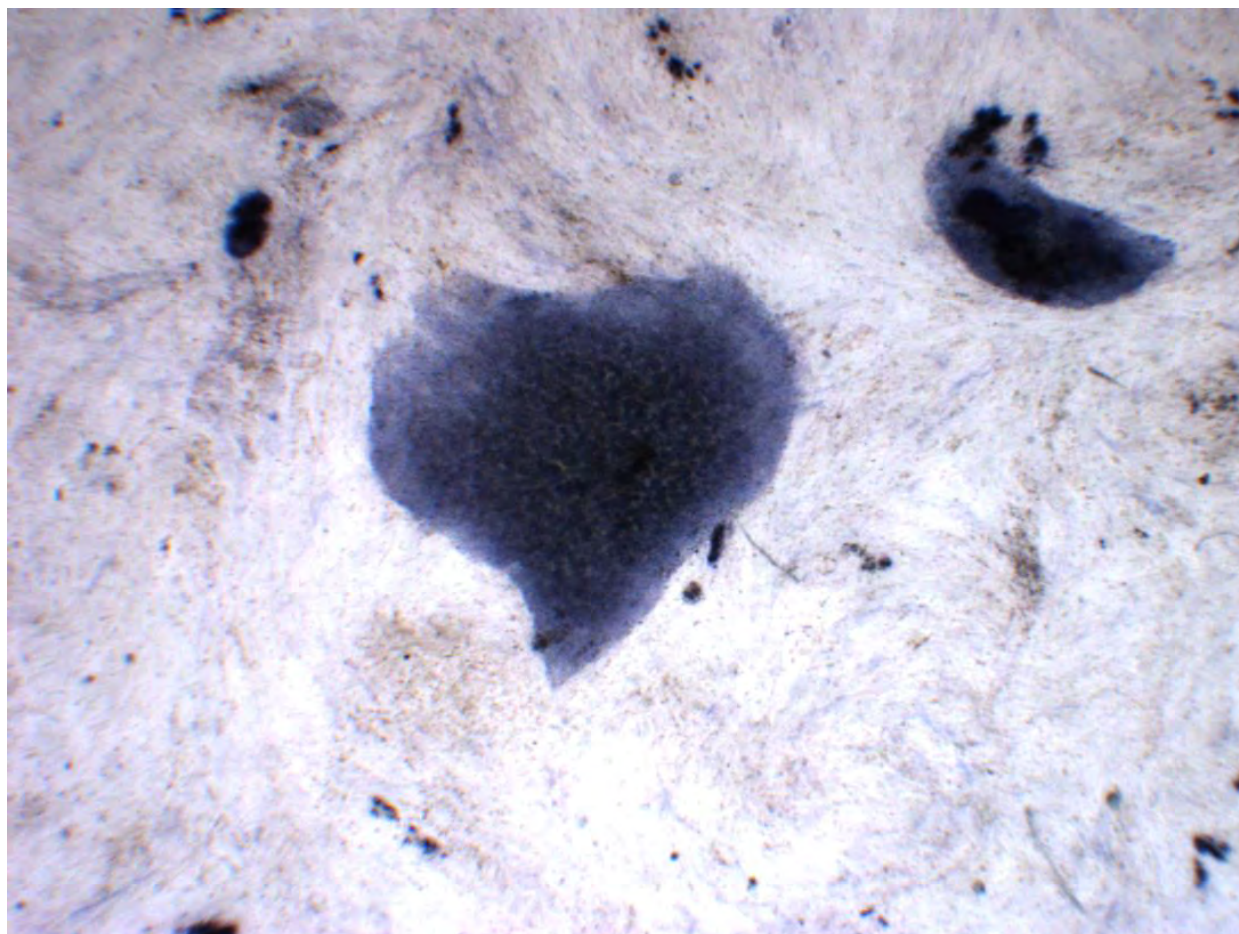
Anexo 5: Test de integración y de silenciamiento

Anexo 6: Genotipación de la línea

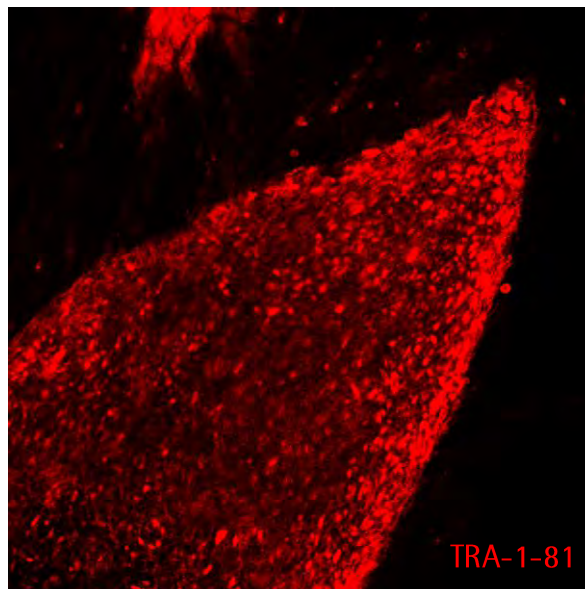
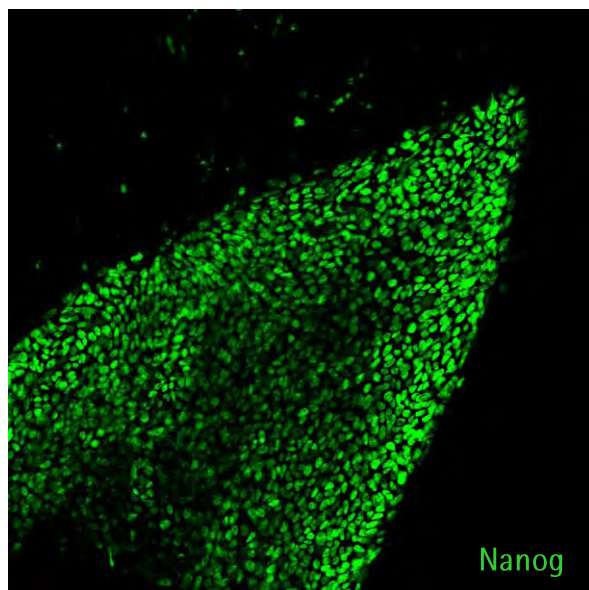
Anexo 7: Test de mycoplasma

Anexo 1

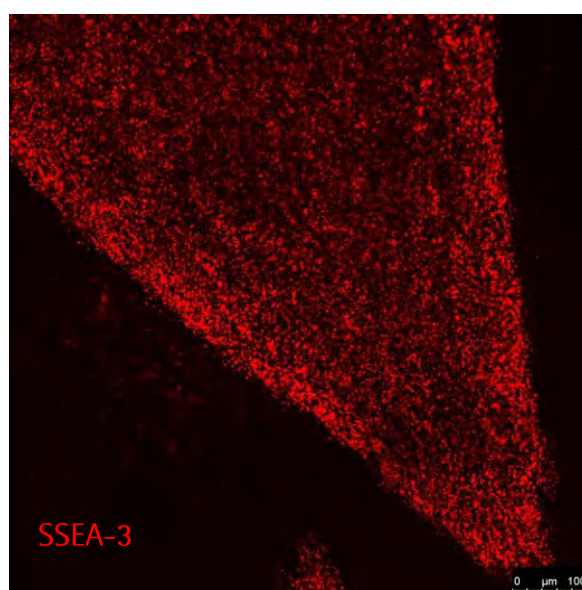
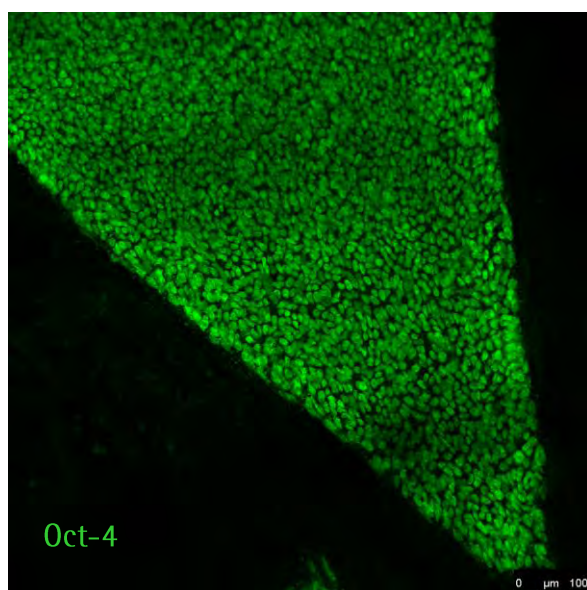
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



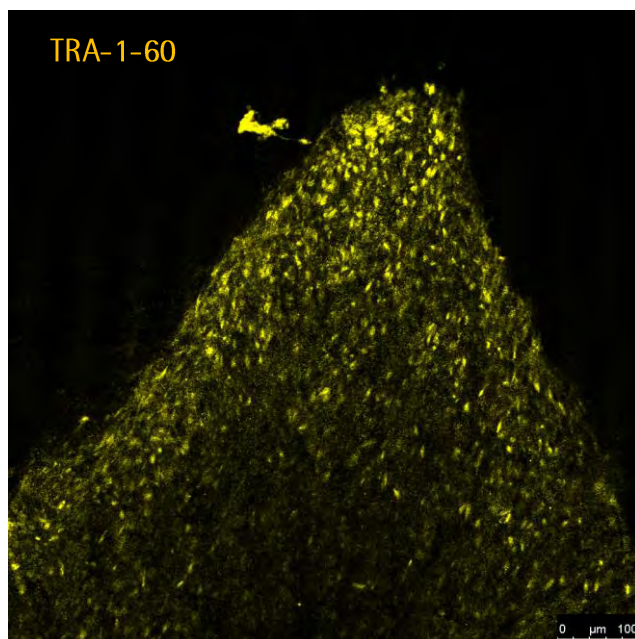
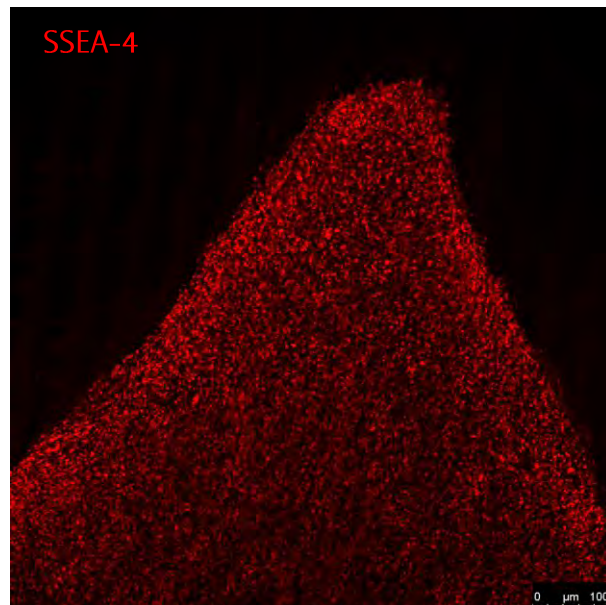
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células madre pluripotentes



Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes para **Nanog** y **TRA-1-81**



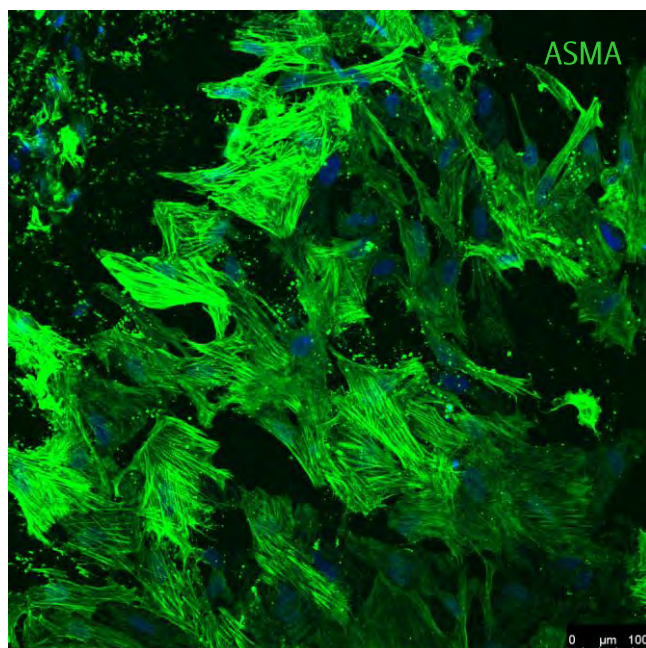
Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes para **Oct-4** y **SSEA-3**



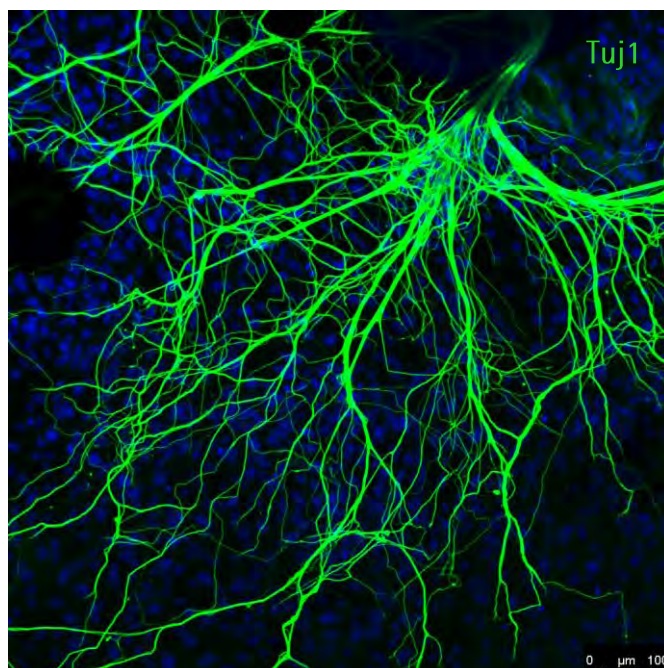
Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes para **Sox-2**, **SSEA-4** y **TRA1-60**

Anexo 2

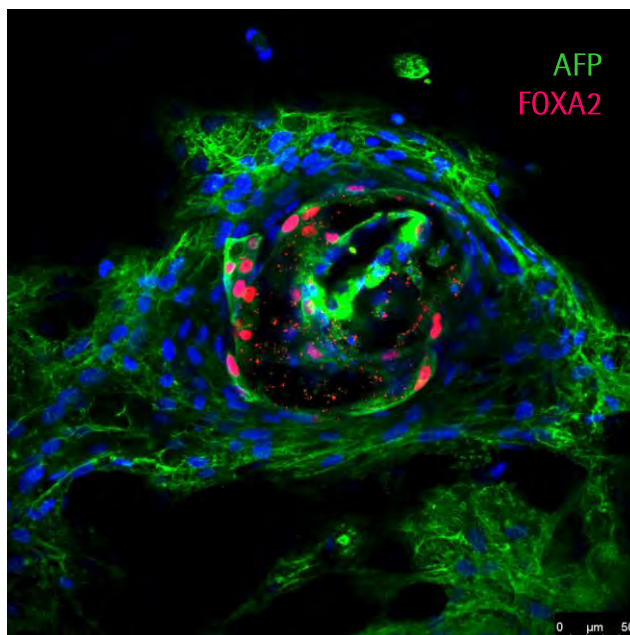
Diferenciación *in vitro*



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



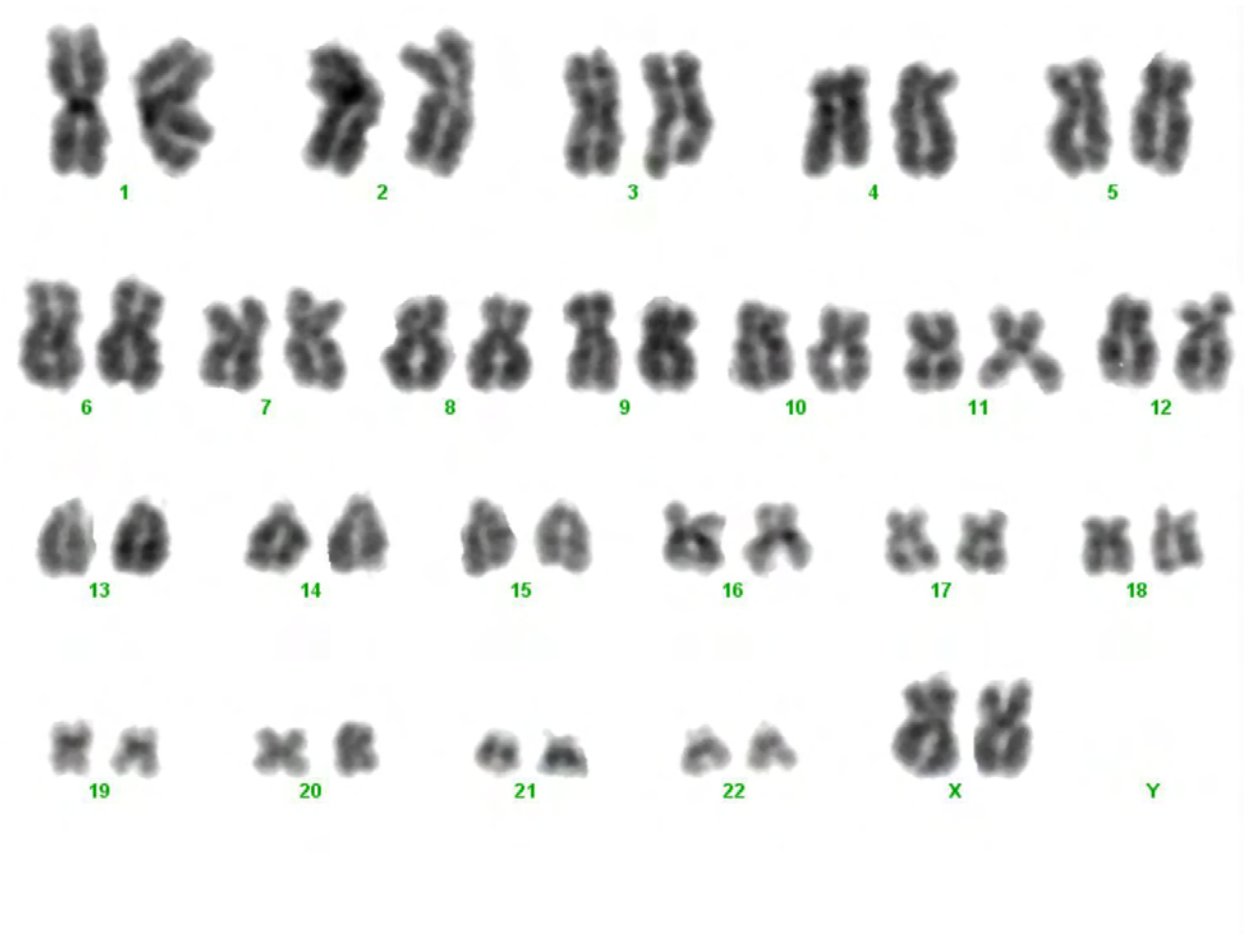
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**



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

Anexo 3

Cariotipo



Anexo 4

Estudio microsatélites

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [PD] FiPS006-4F-11 y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.



qCell Identity Test

Web: <http://www.qgenomics.com>
Email: info@qgenomics.com
Tel: 93.316.08.08

Servicio de autenticación de líneas celulares

Detalles de la solicitud

Solicitante: Cristina Gómez Santos
Centro: Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Departamento:

Detalles de la muestra

Identificador externo: PD006 FiPS-4F-11
Identificador interno: qG15013240
Descripción: 1 tubo de 15mL con pellet celular.
Nota: ID petición PD006 FiPS-4F-11, pero en el tubo indica PD006

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

Muestra	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX
PD006 FiPS-4F-11	6-8	29-33.2	13-13	12-14	8-8	13-14	12-12	XX	16-18	8-10

Coincidencia con línea celular conocida: No **Cual:**

Contaminación con otra línea celular humana: No detectable

Observaciones: El patrón de marcadores STR coincide en un 100 % con la línea celular Parkinson PAL125 006 p4 (qG15013233)

Firmado:
Manel Garcia

Fecha: 02/06/2015

Breve descripción del método

El estudio se ha realizado mediante el genotipado de marcadores STR (también conocidos como microsatélites: TH01, D21S11, D5S828, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA y TPOX). La combinación de los nueve marcadores utilizados produce un perfil de alelos con una probabilidad de coincidencia por azar de 1 en $2,9 \times 10^9$. Se usa además un marcador para identificar el sexo de la muestra (AMEL).

Servicio de autenticación de líneas celulares

Detalles de la solicitud

Solicitante: Cristina Gómez Santos
Centro: Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Departamento:

Detalles de la muestra

Identificador externo: Parkinson PAL125 006 p4
Identificador interno: qG15013233
Descripción: 1 tubo 1.5mL con pellet celular.
Nota: ID petición Parkinson PAL125 006 p4, pero en el tubo indica Fibras PD006

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

Muestra	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX
Parkinson PAL125 006 p4	6-8	29-33.2	13-13	12-14	8-8	13-14	12-12	XX	16-18	8-10

Coincidencia con línea celular conocida: No Cual:

Contaminación con otra línea celular humana: No detectable

Observaciones: El patrón de marcadores STR coincide en un 100 % con la línea celular PD006 FIPS-4F-11 (qG15013240)

Firmado:
Manel Garcia

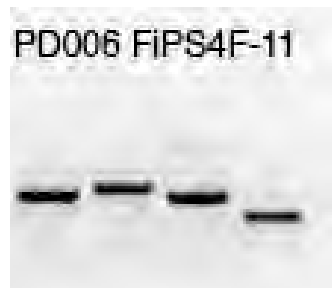
Fecha: 02/06/2015

Breve descripción del método

El estudio se ha realizado mediante el genotipado de marcadores STR (también conocidos como microsatélites: TH01, D21S11, D5S828, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA y TPOX). La combinación de los nueve marcadores utilizados produce un perfil de alelos con una probabilidad de coincidencia por azar de 1 en $2,9 \times 10^9$. Se usa además un marcador para identificar el sexo de la muestra (AMEL).

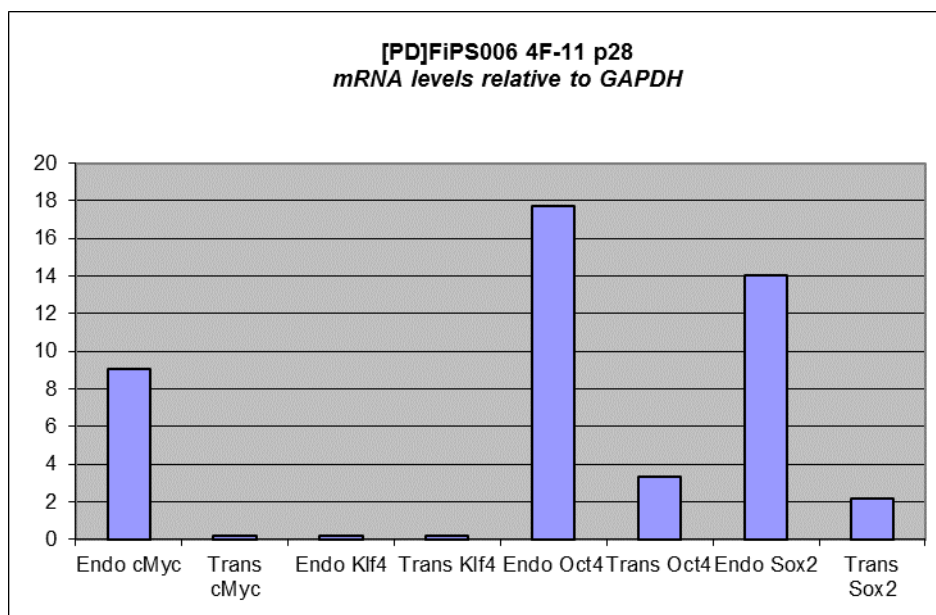
Anexo 5

Estudio integración y de silenciamiento



Oct4 Sox2 Klf4 cMyc

Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los 4 genes utilizados Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-myc) para generar la línea [PD]FiPS006-4F-11



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 6

Genotipación de la línea

SEQUENCE RESULTS:

Sequence of PCR product on exon 7 of PINK1

WT PINK1 cDNA:

ATGGCGGTGCGACAGGCGCTGGGCCGCGGCCTGCAGCTGGGTGAGCGCTGCTGCTGCGCTTCACGGGCAAGCCCGG
CCGGGCTACGGCTTGGGGCGGCCGGGCCCGGCGGGGCTGTGTCCGCGGGGAGCGTCCAGGCTGGGCCGAGGAC
CGGGCGCGGAGCCTCGCAGGGTCGGGCTCGGGCTCCCTAACCGTCTCCGCTTCTTCCGCCAGTCGGTGGCCGGGCTG
GCGGCGCGGTGTCAGCGGCAGTTCTGTGTGCGGGCTGGGGCTGCGCGGGCCCTTGGCGCCGGGAGTCTTTCTGGC
CTTCGGGCTAGGGCTGGGCTCATCGAGGAAAAACAGGCGGAGAGCCGGCGGGCGGTCTCGGCCTGTCAGGAGATCC
AGGCAATTTTTTACCCAGAAAAGCAAGCCGGGGCTGACCCGTTGGACACGAGACGCTTGCAGGGCTTTTCGGCTGGAG
GAGTATCTGATAGGGCAGTCCATTGGTAAGGGCTGCAGTGTGTGTATGAAGCCACCATGCCTACATTGCCCCA
GAACCTGGAGGTGACAAAGAGCACCGGGTTGCTTCCAGGGAGAGGCCAGGTACCAAGTGCACAGGAGAAGGGCAGG
AGCGAGCTCCGGGGGGCCCCCTGCCTTCCCCCTTGGCCATCAAGATGATGTGGAACATCTCGGCAGGTTCTCCAGCGAA
GCCATCTTGAACACAATGAGCCAGGAGCTGGTCCCAGCGAGCCGAGTGGCCTTGGCTGGGGAGTATGGAGCAGTCAC
TTACAGAAAATCCAAGAGAGGTCCCAAGCAACTAGCCCCCTCACCCCAACATCATCCGGGTTCTCCGCGCCTTCACCT
CTTCCGTGCCGCTGCTGCCAGGGGGCCCTGGTGCAGTACCCTGATGTGTGTGCCCTCACGCCTCCACCCTGAAGGCCTG
GGCCATGGCCGGACGCTGTTCTCGTTATGAAGAACTATCCCTGTACCCTGCGCCAGTACCTTTGTGTGAACACACC
CAGCCCCCGCCTCGCCGCCATGATGCTGCTGCAGCTGCTGGAAGGCGTGGACCATCTGGTTCAACAGGGCATCGCGC
ACAGAGACCTGAAATCCGACAACATCCTTGTGGAGCTGGACCCAGACGGCTGCCCTGGCTGGTGTATCGCAGATTTT
GGCTGCTGCCTGGCTGATGAGAGCATCGGCCTGCAGTTGCCCTTCAGCAGCTGGTACGTGGATCGGGGCGGAAACGG
CTGTCTGATGGCCCCAGAGGTGTCCACGGCCCCGTCTGGCCCCAGGGCAGTGATTGACTACAGCAAGGCTGATGCCT
GGGCAGTGGGAGCCATCGCCTATGAAATCTTCGGGCTTGTCAATCCCTTCTACGGCAGGGCAAGGCCACCTTGAA
AGCCGCAGCTACCAAGAGGCTCAGCTACCTGCACTGCCCCAGTCAAGTGCCTCCAGACGTGAGACAGTTGGTGAGGGC
ACTGCTCCAGCGAGAGGCCAGCAAGAGACCATCTGCCCGAGTAGCCGCAAATGTGCTTCATCTAAGCCTCTGGGGTG
AACATATTTCTAGCCCTGAAGAATCTGAAGTTAGACAAGATGGTTGGCTGGCTCCTCCAACAATCGGCCGCCACTTTG
TTGGCCAACAGGCTCACAGAGAAGTGTGTGTGGAACAAAAATGAAGATGCTCTTTCTGGCTAACCTGGAGTGTGA
AACGCTCTGCCAGGCAGCCCTCCTCCTCTGCTCATGGAGGGCAGCCCTGTGA

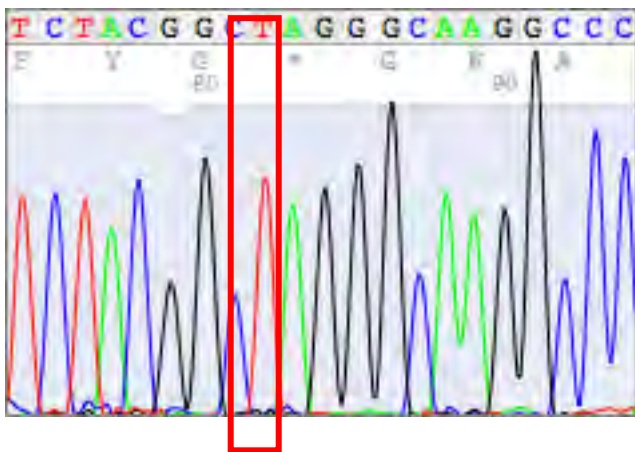
Mutated PINK1 cDNA:

ATGGCGGTGCGACAGGCGCTGGGCCGCGGCCTGCAGCTGGGTGAGCGCTGCTGCTGCGCTTCACGGGCAAGCCCGG
CCGGGCTACGGCTTGGGGCGGCCGGGCCCGGCGGGGCTGTGTCCGCGGGGAGCGTCCAGGCTGGGCCGAGGAC
CGGGCGCGGAGCCTCGCAGGGTCGGGCTCGGGCTCCCTAACCGTCTCCGCTTCTTCCGCCAGTCGGTGGCCGGGCTG
GCGGCGCGGTGTCAGCGGCAGTTCTGTGTGCGGGCTGGGGCTGCGCGGGCCCTTGGCGCCGGGAGTCTTTCTGGC
CTTCGGGCTAGGGCTGGGCTCATCGAGGAAAAACAGGCGGAGAGCCGGCGGGCGGTCTCGGCCTGTCAGGAGATCC
AGGCAATTTTTTACCCAGAAAAGCAAGCCGGGGCTGACCCGTTGGACACGAGACGCTTGCAGGGCTTTTCGGCTGGAG
GAGTATCTGATAGGGCAGTCCATTGGTAAGGGCTGCAGTGTGTGTGTATGAAGCCACCATGCCTACATTGCCCCA
GAACCTGGAGGTGACAAAGAGCACCGGGTTGCTTCCAGGGAGAGGCCAGGTACCAAGTGCACAGGAGAAGGGCAGG
AGCGAGCTCCGGGGGGCCCCCTGCCTTCCCCCTTGGCCATCAAGATGATGTGGAACATCTCGGCAGGTTCTCCAGCGAA
GCCATCTTGAACACAATGAGCCAGGAGCTGGTCCCAGCGAGCCGAGTGGCCTTGGCTGGGGAGTATGGAGCAGTCAC
TTACAGAAAATCCAAGAGAGGTCCCAAGCAACTAGCCCCCTCACCCCAACATCATCCGGGTTCTCCGCGCCTTCACCT
CTTCCGTGCCGCTGCTGCCAGGGGGCCCTGGTGCAGTACCCTGATGTGTGTGCCCTCACGCCTCCACCCTGAAGGCCTG
GGCCATGGCCGGACGCTGTTCTCGTTATGAAGAACTATCCCTGTACCCTGCGCCAGTACCTTTGTGTGAACACACC
CAGCCCCCGCCTCGCCGCCATGATGCTGCTGCAGCTGCTGGAAGGCGTGGACCATCTGGTTCAACAGGGCATCGCGC
ACAGAGACCTGAAATCCGACAACATCCTTGTGGAGCTGGACCCAGACGGCTGCCCTGGCTGGTGTATCGCAGATTTT
GGCTGCTGCCTGGCTGATGAGAGCATCGGCCTGCAGTTGCCCTTCAGCAGCTGGTACGTGGATCGGGGCGGAAACGG
CTGTCTGATGGCCCCAGAGGTGTCCACGGCCCCGTCTGGCCCCAGGGCAGTGATTGACTACAGCAAGGCTGATGCCT
GGGCAGTGGGAGCCATCGCCTATGAAATCTTCGGGCTTGTCAATCCCTTCTACGGCAGGGCAAGGCCACCTTGAA
AGCCGCAGCTACCAAGAGGCTCAGCTACCTGCACTGCCCCAGTCAAGTGCCTCCAGACGTGAGACAGTTGGTGAGGGC
ACTGCTCCAGCGAGAGGCCAGCAAGAGACCATCTGCCCGAGTAGCCGCAAATGTGCTTCATCTAAGCCTCTGGGGTG
AACATATTTCTAGCCCTGAAGAATCTGAAGTTAGACAAGATGGTTGGCTGGCTCCTCCAACAATCGGCCGCCACTTTG
TTGGCCAACAGGCTCACAGAGAAGTGTGTGTGGAACAAAAATGAAGATGCTCTTTCTGGCTAACCTGGAGTGTGA
AACGCTCTGCCAGGCAGCCCTCCTCCTCTGCTCATGGAGGGCAGCCCTGTGA

Sample: PAL 125 006

Sequencing result:

GGCGATGATAAGCAGGCTGATGCCTGGGCAGTGGGAGCCATCGCCTATGAAATCTT
CGGGCTTGTCAATCCCTTCTACGGCTAGGGCAAGGCCACCTTGAAAGCCGCAGCT
ACCAAGAGGCTCAGCTACCTGCACTGCCCAGATCAGTGCCTCCAGACGTGAGACAG
TTGGTGAGGGCACTGCTCCAGCGAGAGGCCAGCAAGA



Result:

PAL 125 006 presents a homozygotic mutation on PINK1 exon 7.

Anexo 7

Test de mycoplasma

MYCOPLASMA TEST

3



1. [PD] FiPS006-4F-11
2. CT -
3. CT +