

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR OCD FiPS 1-Ep6F-16 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

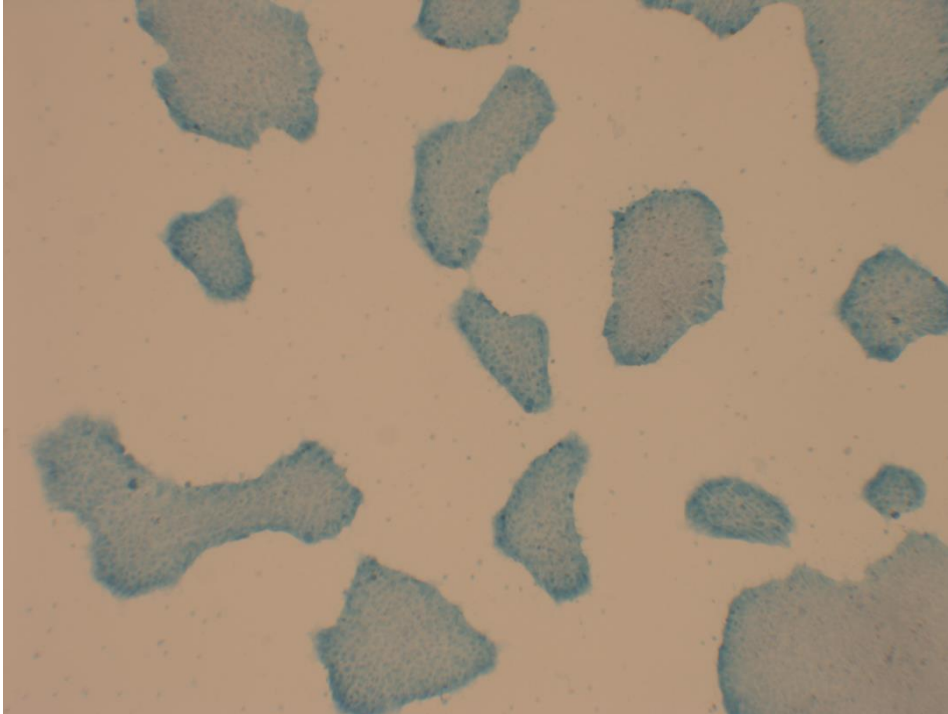
Anexo 5: Resultados microsatélites

Anexo 6: Ausencia de los transgenes de reprogramación

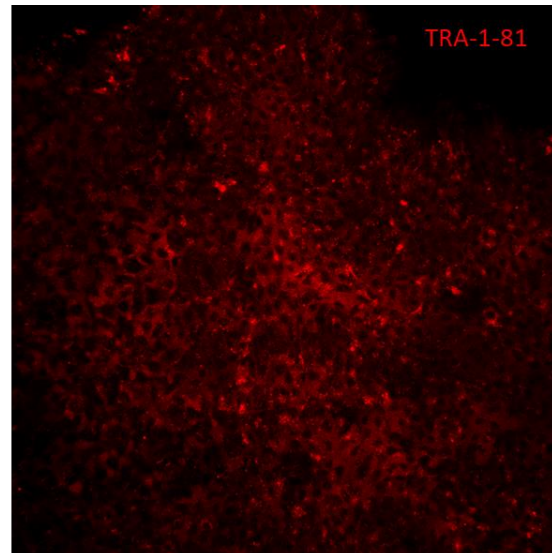
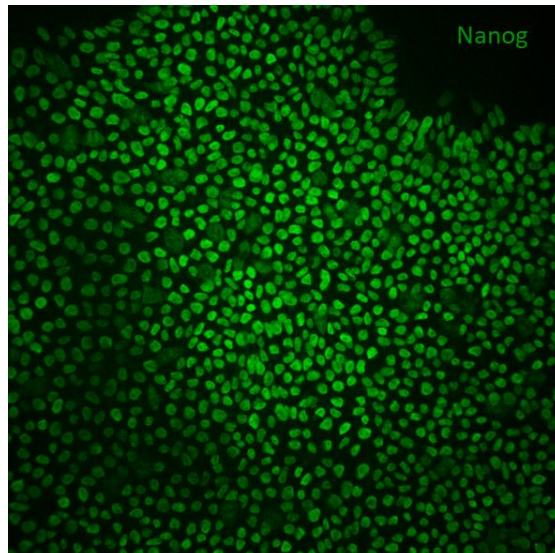
Anexo 7: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

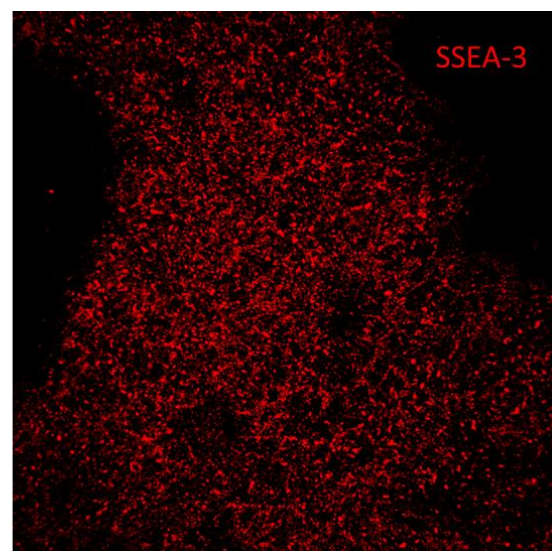
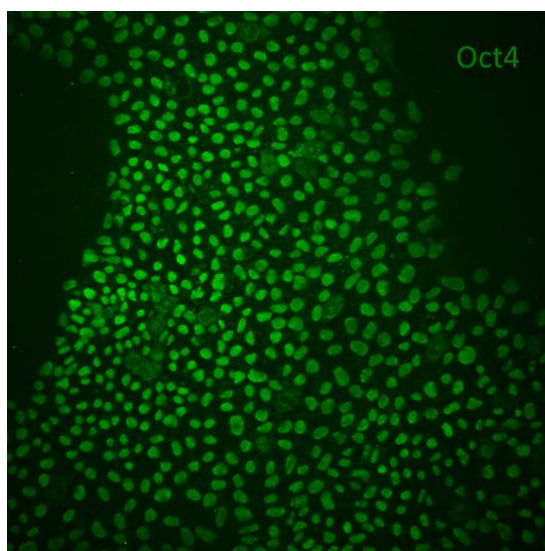


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



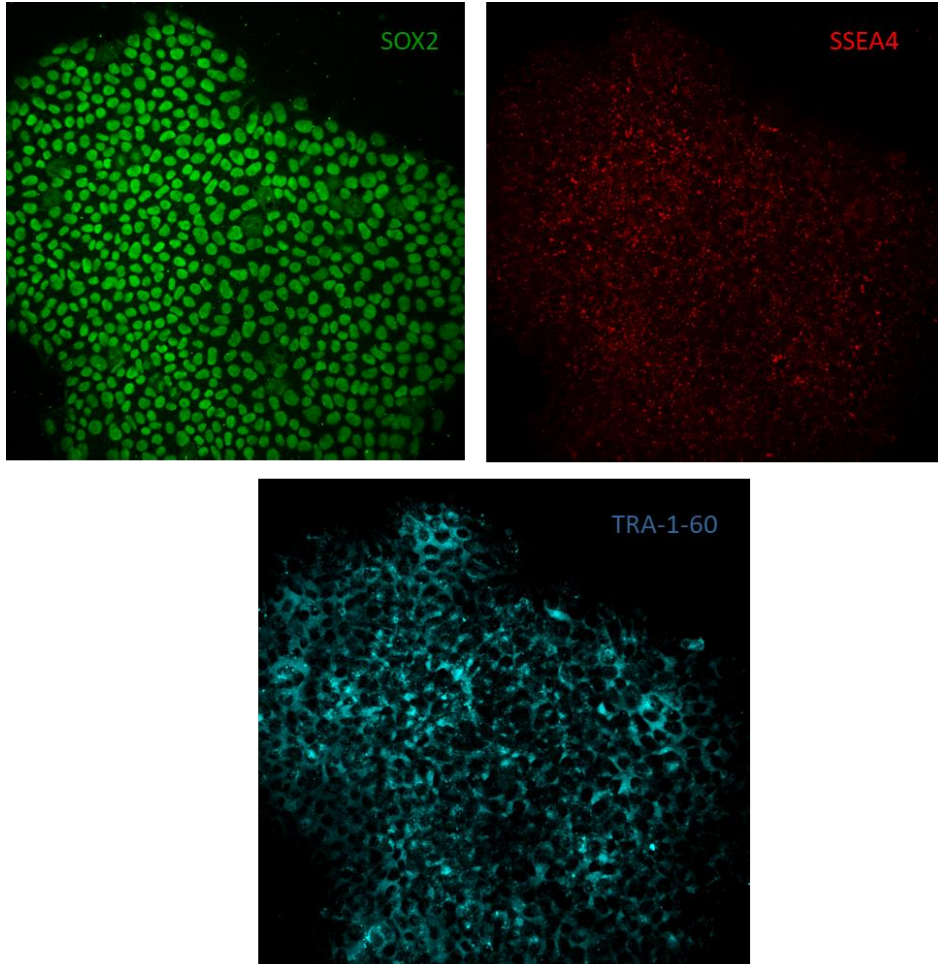
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

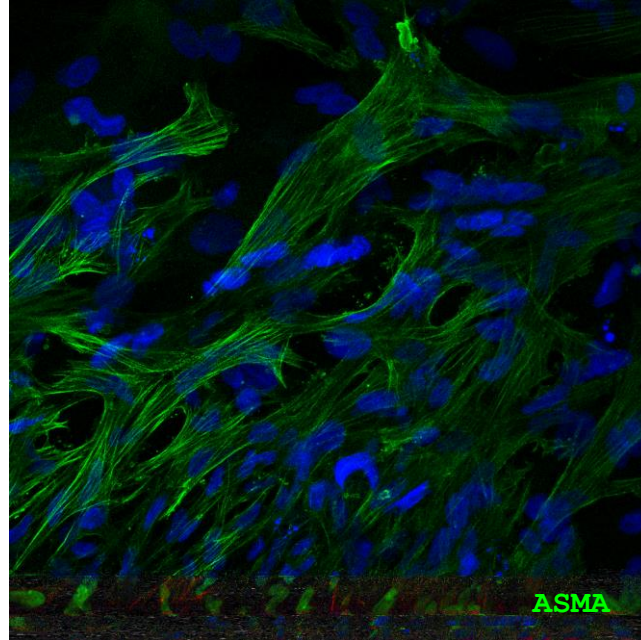


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

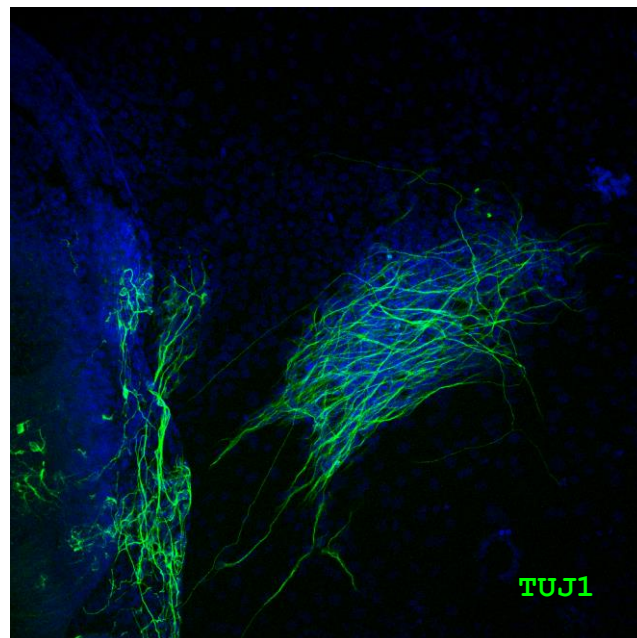
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

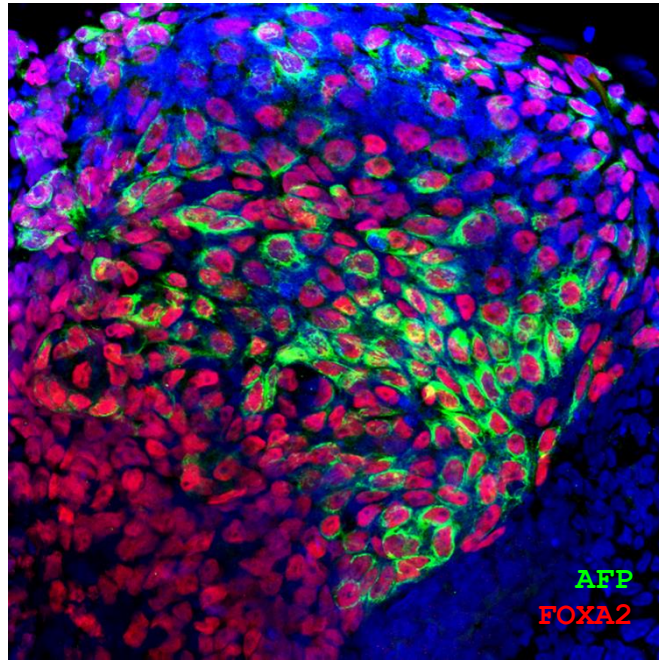
Diferenciación *in vitro*



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



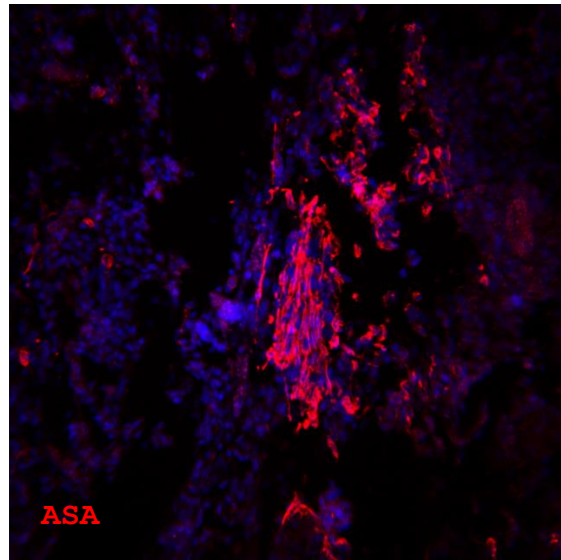
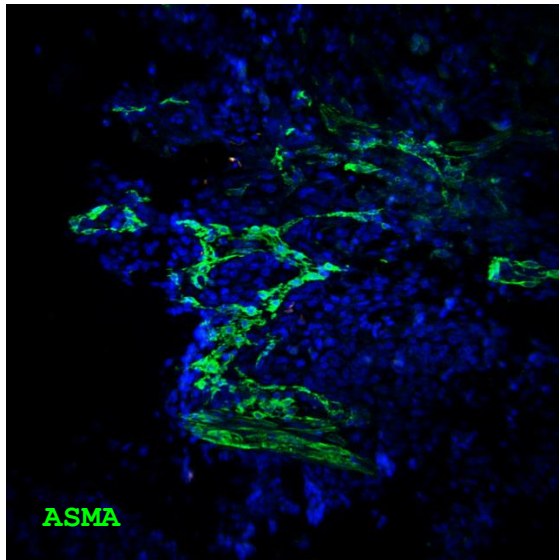
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**



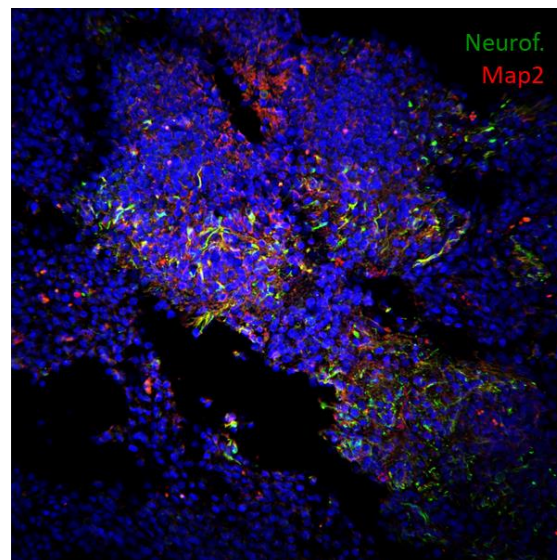
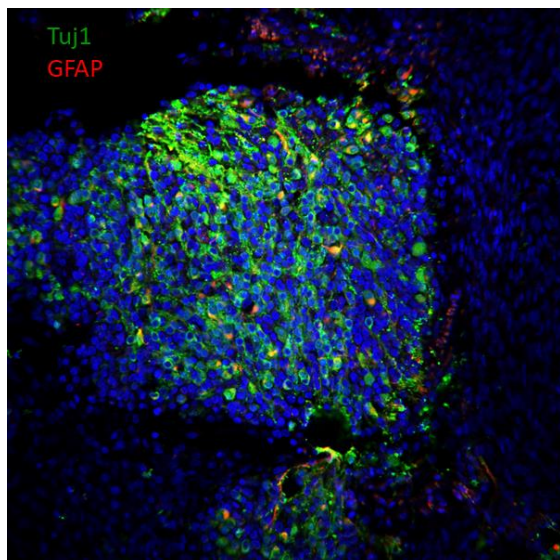
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

Anexo 3

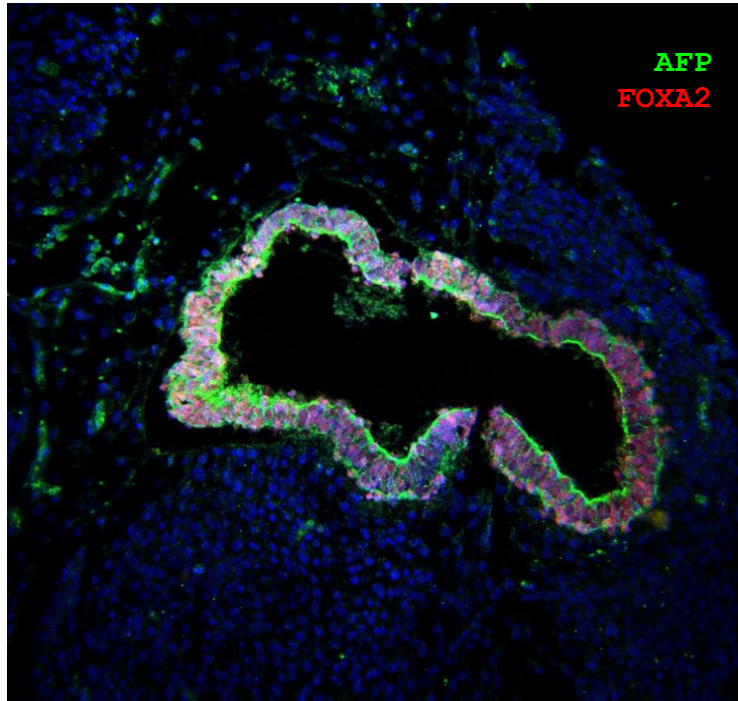
Diferenciación *in vivo*



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



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **TUJ1, GFAP, Neurofilamento y Map2.**

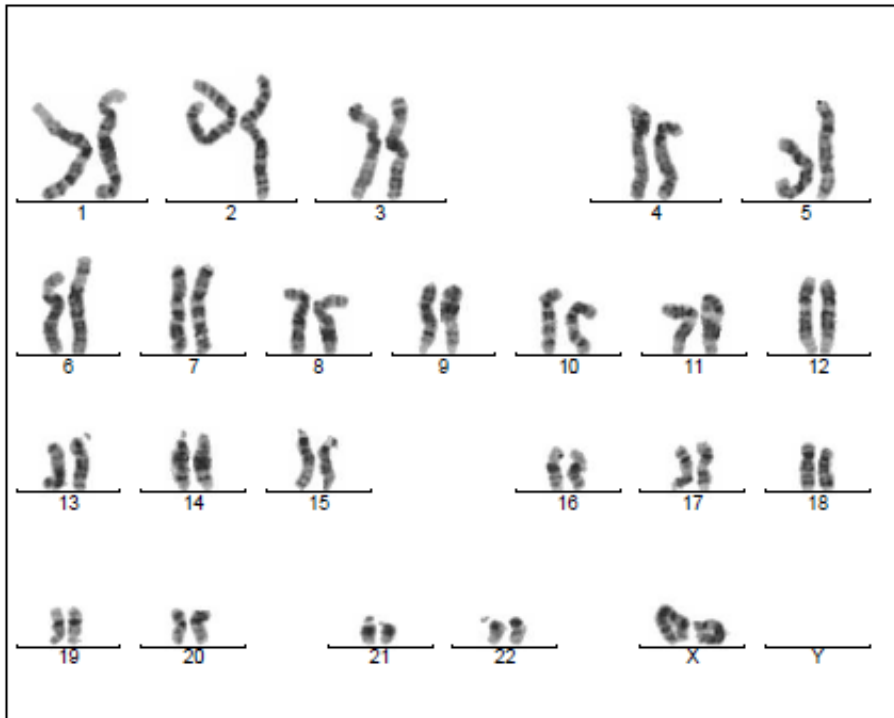


Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

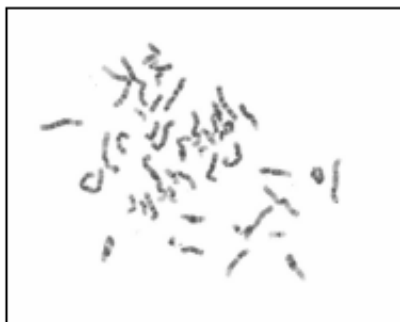
Anexo 4

Cariotipo

Cytogenetic analysis



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. X. Y.



Case name: 12131

Patient name: OCD FiPS1-Ep6F-16 p6

Specimen type: stem cells

Result: 46,XX

Anexo 5

Resultado microsatélites



Los resultados obtenidos son estudiados mediante el programa informático GeneMapper® 3.2. De acuerdo con la información suministrada por Promega® sobre su kit de amplificación GenePrint® 10 System, estos son los datos correspondientes de los alelos existentes para cada uno de los diferentes loci STR (figura1):



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 | 156–192 | 4–9, 9.1, 10–11, 13.1 |
| D21S11 | FL | 283–259 | 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 | 109–156 | 7–16 |
| D13S317 | JOE | 176–208 | 7–15 |
| D7S820 | JOE | 215–247 | 6–14 ¹ |
| D16S539 | JOE | 284–304 | 5, 8–15 |
| CSF1PO | JOE | 321–357 | 6–15 |
| Amelogenin | TMR | 108, 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 13.1 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see www.cstl.nist.gov/srbaso/var/_D13S317.Jamaa101).

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 indica el código de Biobanco para la muestra analizada y el código origen del ADN procesado de la línea celular:

| Código Biobanco | Código origen de ADN |
|-----------------|-----------------------|
| 32180103002 | OCD FiPS 1-Ep6F-16 p7 |

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR.

| Código origen del ADN de la línea celular | Loci STR analizados | | | | | | | | | |
|---|---------------------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|------|--------------|-----|
| | AMEL | CSF1PO | D13S317 | D16S539 | D21S11 | D5S818 | D7S820 | TH01 | TPOX | vWA |
| OCD FiPS 1-Ep6F-16 p7 | X | 12, 13 | 11, 12 | 11 | 29, 31 | 11, 12 | 11, 12 | 6, 7 | 8, 10, 12, 5 | 18 |

Granada, a 26 de Marzo de 2018

Laboratorio de Biología Molecular
 Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

A continuación se indica el código de Biobanco para la muestra analizada y el código origen del ADN procesado de la línea celular:

| Código Biobanco | Código origen de ADN |
|-----------------|----------------------|
| 32180072002 | OCD1F |

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR.

| Código origen del ADN de la línea celular | Loci STR analizados | | | | | | | | | |
|---|---------------------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|------|-------|-----|
| | AMEL | CSF1PO | D13S317 | D16S539 | D21S11 | D5S818 | D7S820 | TH01 | TPOX | vWA |
| OCD1F | X | 12, 13 | 11, 12 | 11 | 29, 31 | 11, 12 | 11, 12 | 6, 7 | 8, 10 | 18 |

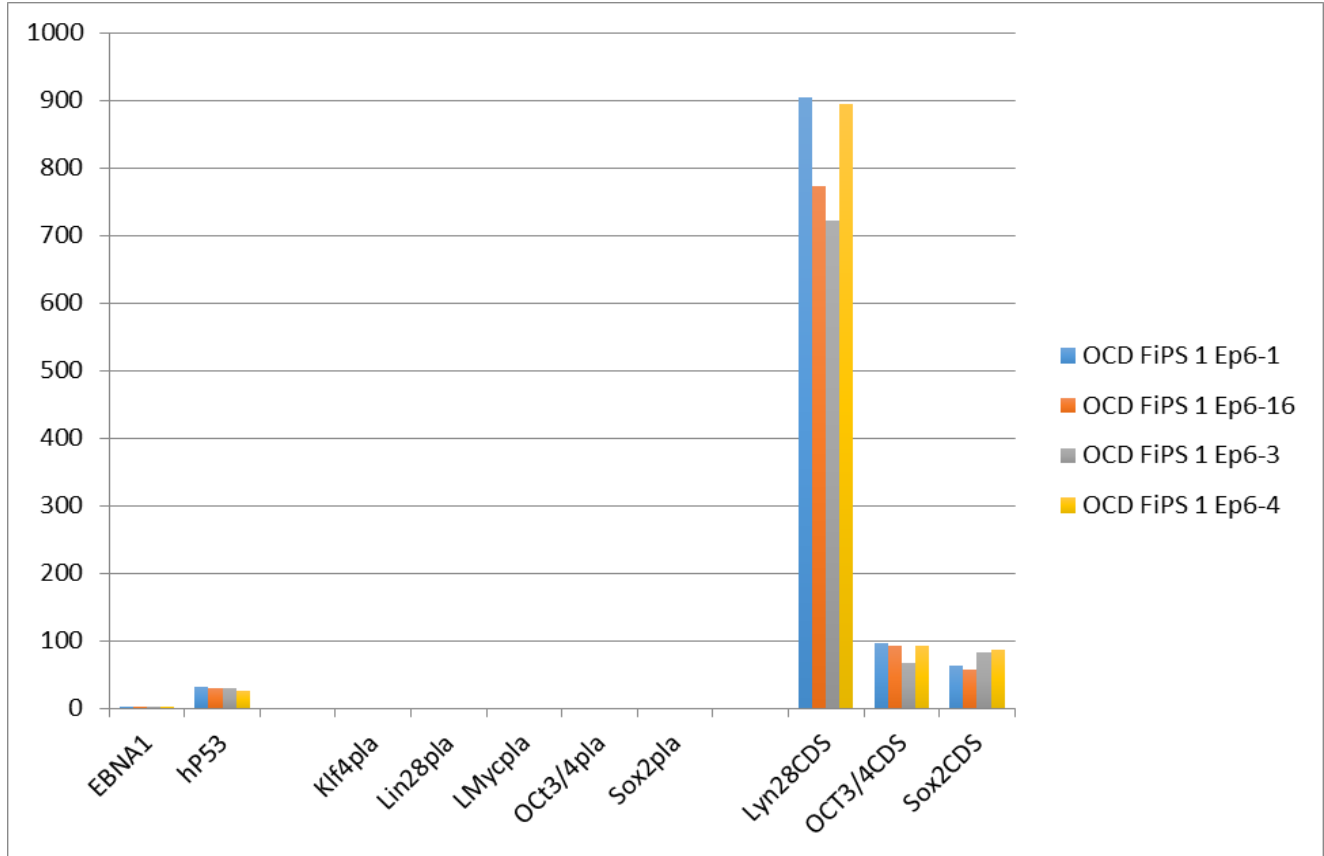
Granada, a 19 de Febrero de 2018

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

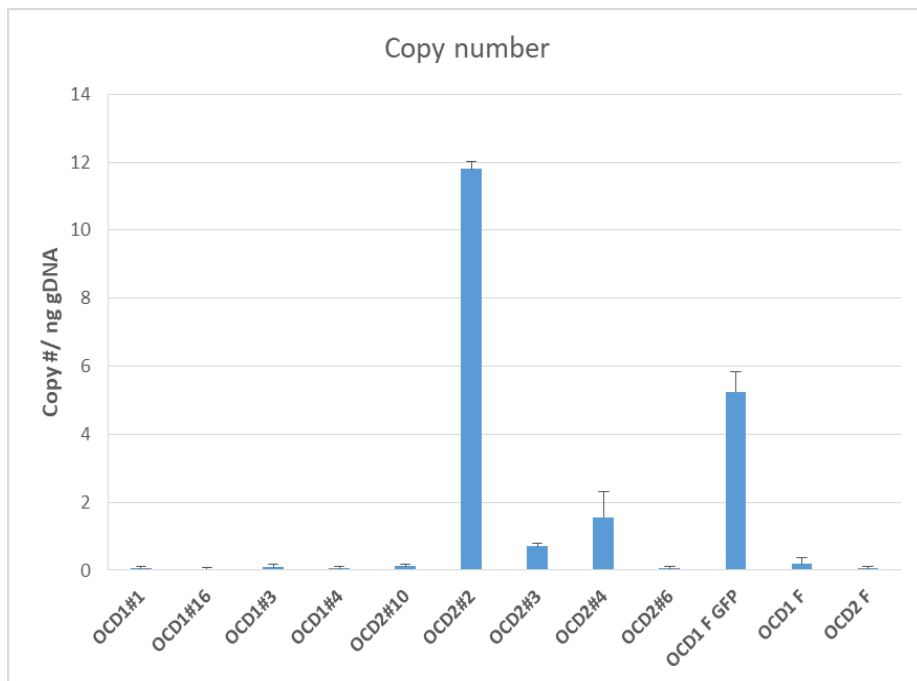
Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

Ausencia de los transgenes de reprogramación



Niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) en la línea **OCD FiPS 1 –EP6F-16** y otros clones procedentes del mismo paciente.

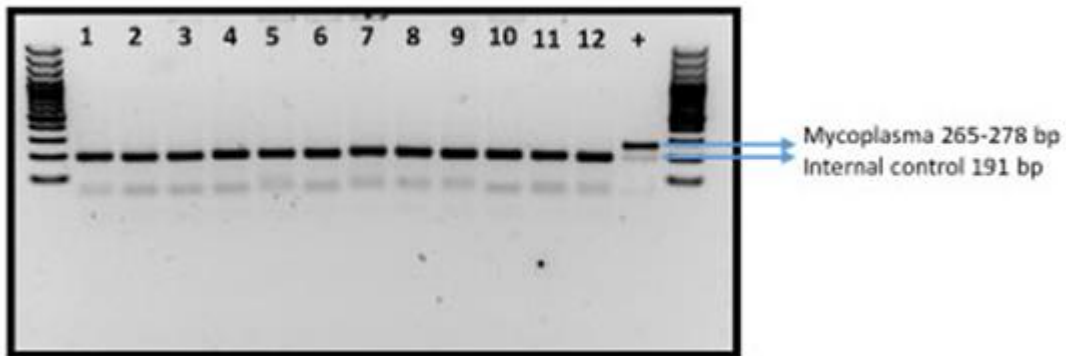


PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC (**OCD1#16** corresponde a la abreviación de **OCD FiPS 1-Ep6F-16**) y en fibroblastos control no-nucleofectados (**OCD1F**) y la presencia de plásmidos en fibroblastos control GFP-nucleofectados 72h después de la nucleofección (**OCD1 F GFP**)

Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 26/10/17



3. OCD FiPS1 Ep6F-16