

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **THD FiPS A1-Ep6F-17** 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: Ausencia de los transgenes de reprogramación

Anexo 6: Genotipado

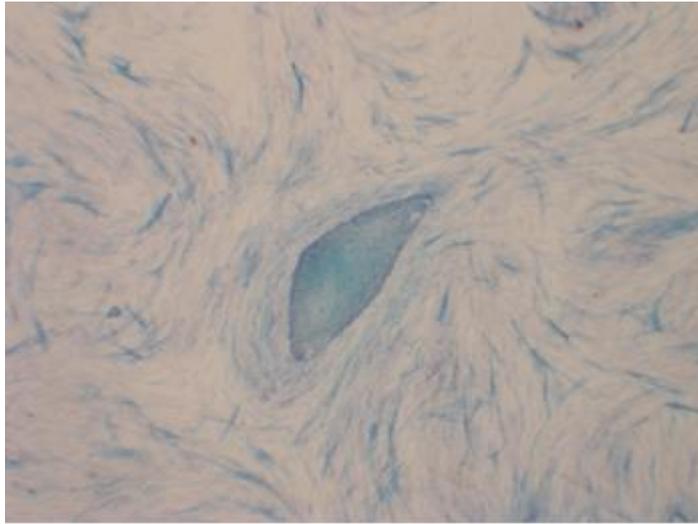
Anexo 7: Resultado Test de micoplasma



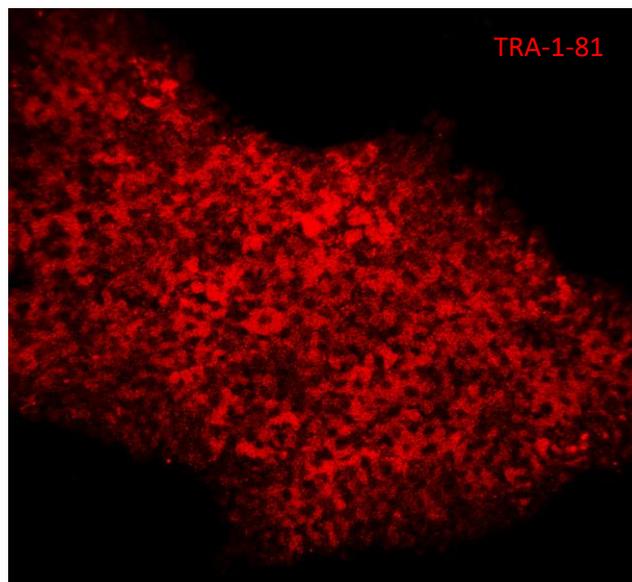
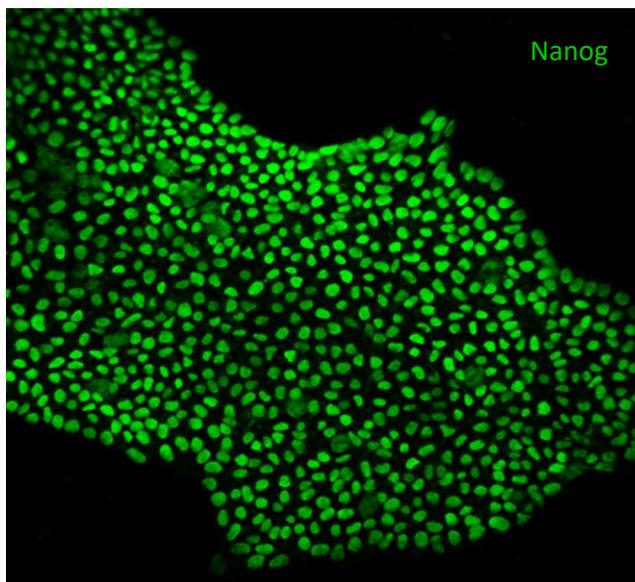
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

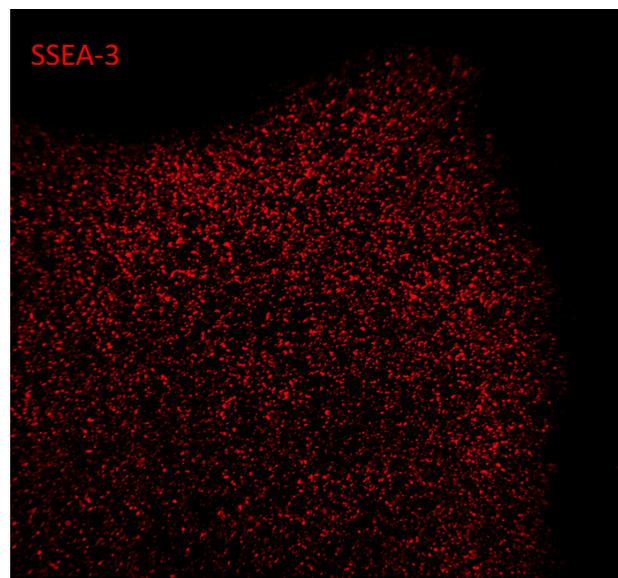
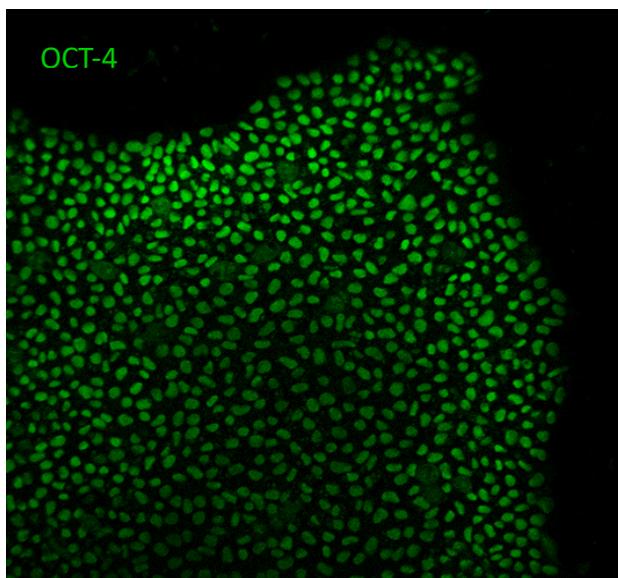


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



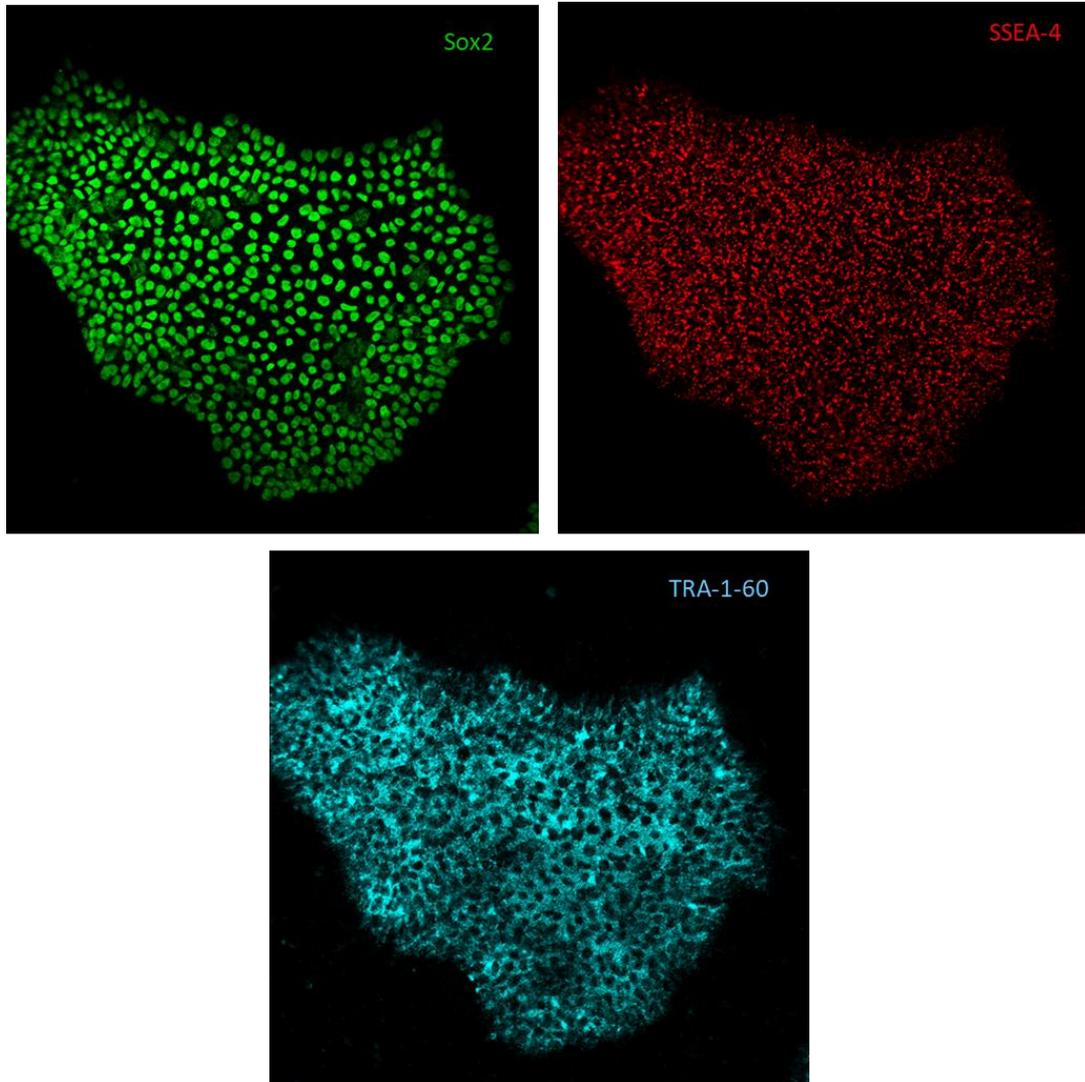
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

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

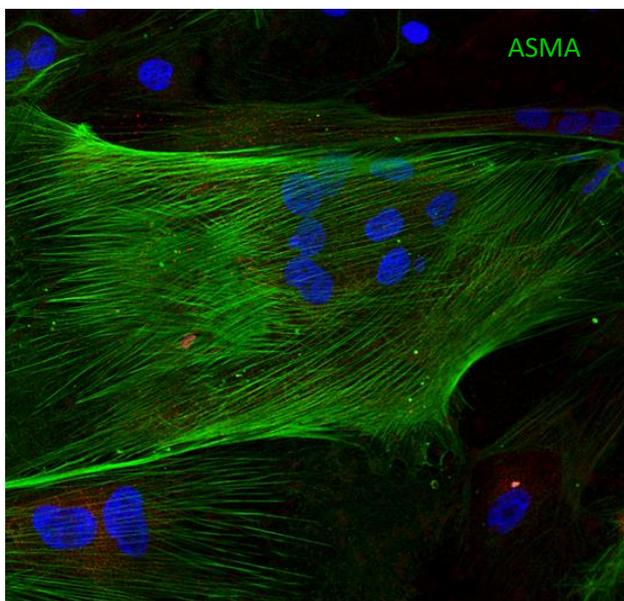
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60



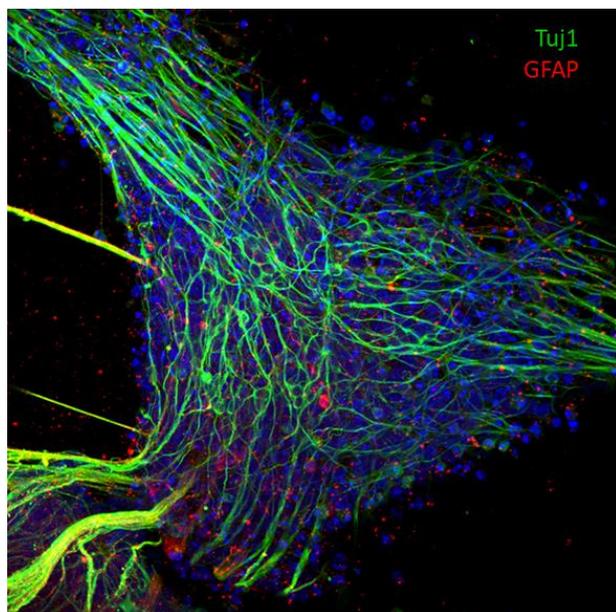
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 2

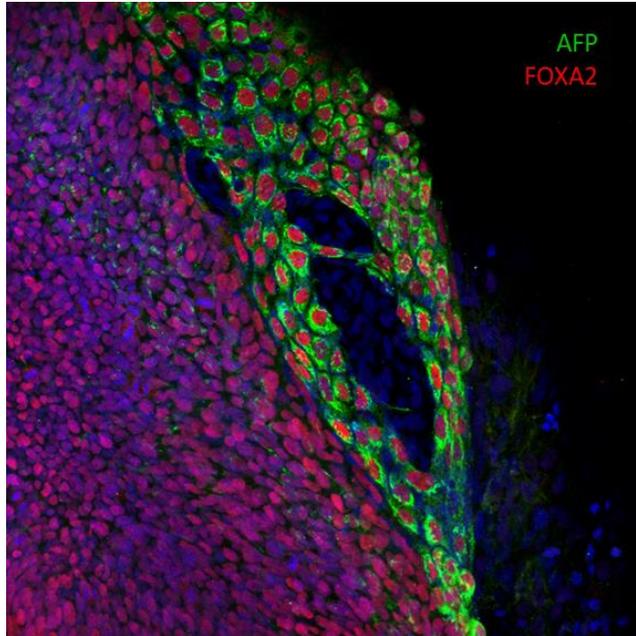
Diferenciación *in vitro*



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



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



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

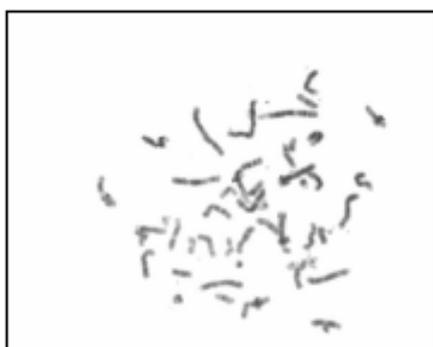
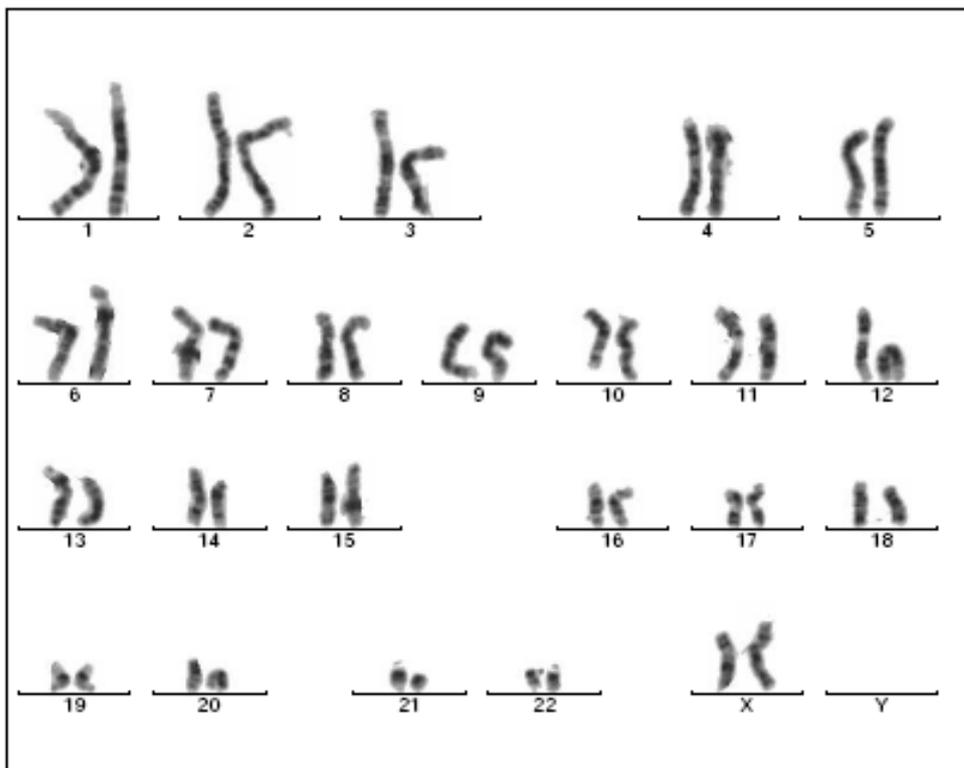


Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 3

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A181376

Patient name: THD FiPSA1 Ep6F-17 p14

Specimen type: stem cells

Result: 46,XX



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

Anexo 4

Resultado microsatélites



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

STR Locus	Label	Size Range of Allelic Ladder Components ^a (bases)	Repeat Numbers of Allelic Ladder Components
TH01	FL	156–195	4–9, 9.3, 10–11, 13.3
D21S11	FL	200–259	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	JCE	119–125	7–16
D13S317	JCE	176–208	7–15
D7S820	JCE	215–247	6–14 ^b
D16S539	JCE	264–304	5, 8–15
CSF1PO	JCE	321–357	6–15
Ancogenit	TMR	186, 112	X, Y
vWA	TMR	125–171	18–22
TPOX	TMR	262–290	6–13

^aThe length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analysis.

^bWhen 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.

^cHeLa cells have a microvariant allele 13.3 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see www.esbl.nsl.gov.au/base/locus/D13S317.Juno.Tel).

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
32161304002	THD FIPSA1 Ep6F-17 p14

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 FIPSA1 Ep6F-17 p14	X	12	8, 11	12, 14	30, 33.2	11, 12	10, 11	7	8, 11	17, 19

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
32161228002	THD A1 F p3

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 A1 F p3	X	12	8, 11	12, 14	30, 33.2	11, 12	10, 11	7	8, 11	17, 19

Granada, a 24 de Octubre de 2016

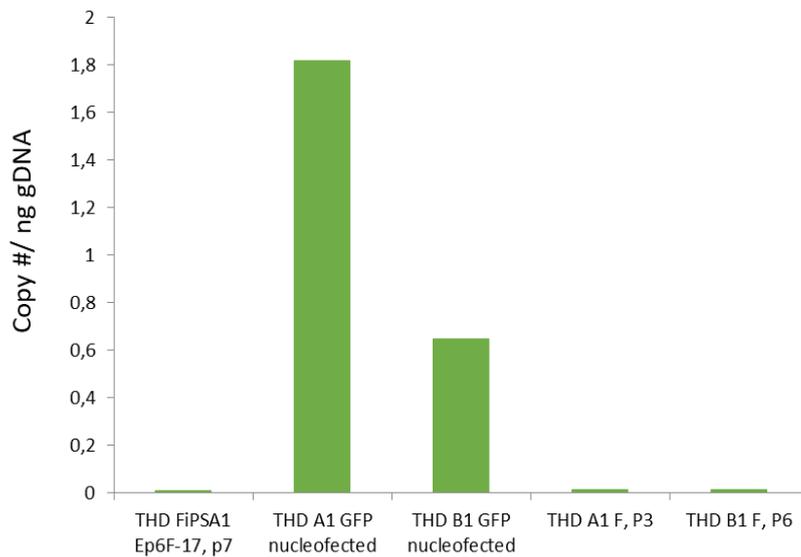


Área de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

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

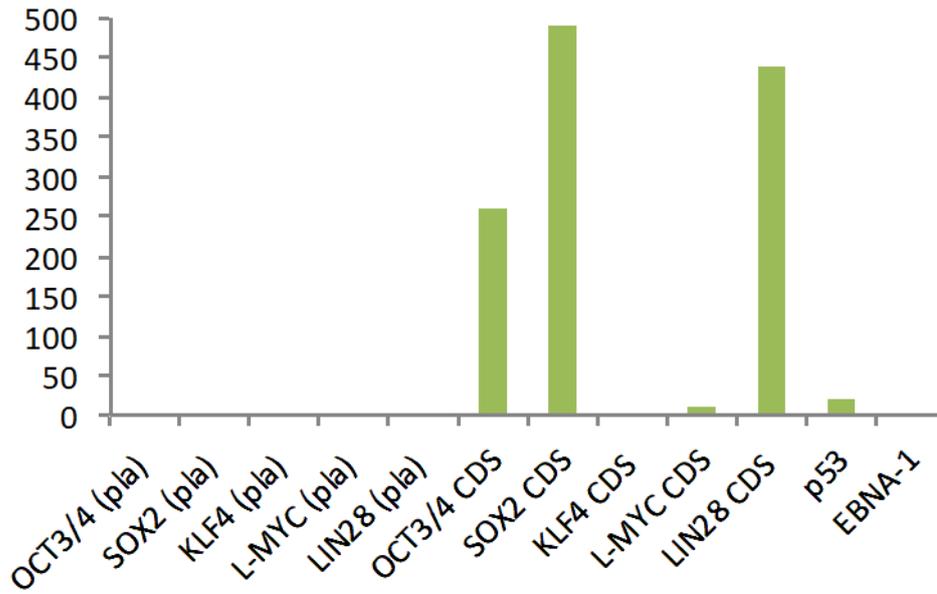
Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación



Análisis PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea **THD FiPS A1 Ep6F-17**, 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**).

THD FiPSA1 Ep6F-17, p7



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 A1 Ep6F-17**

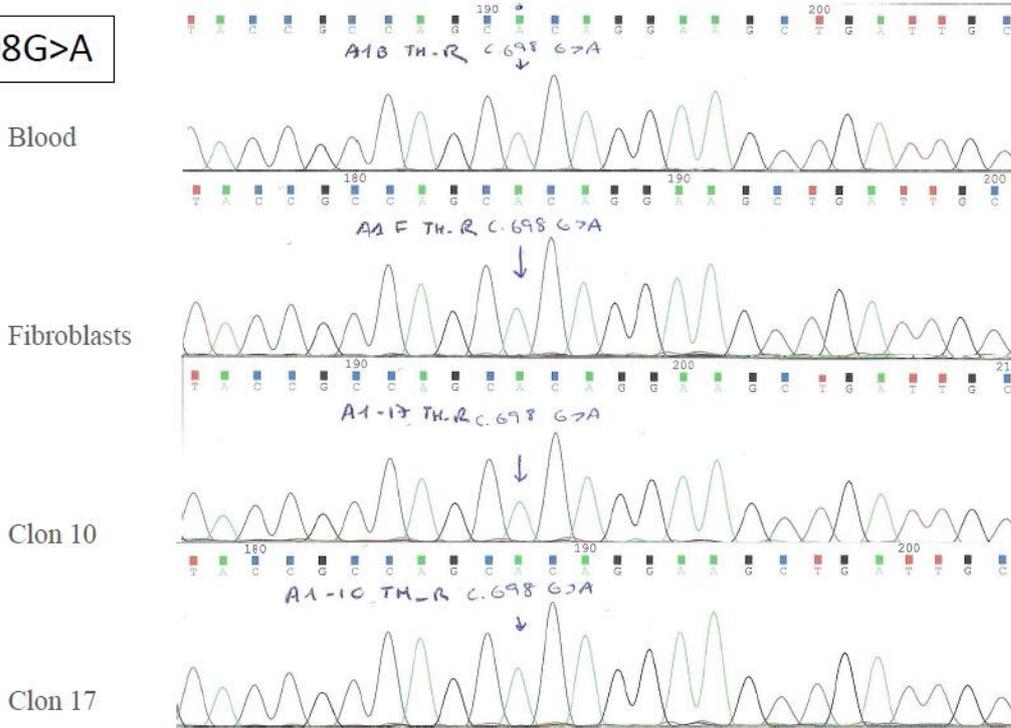


Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 6

Genotipado

c.698G>A



alignment position	221	231	241	251	261	271	281	291	301	311	321	
SeqReFc_698G_A	145	GCCAGCGCAG	GAAGCTGATT	GCTGAGATCG	CCTTCCAGTA	CAGGCAGTGA	GGGGCCCTG	CGCTCGGGAC	CCAGACTCCG	TOCTGCAGGC	TGACCGTGA	CCTGGGGGT
A5 Blood	185	GCCAGCACAG	GAAGCTGATT	GCTGAGATCG	CCTTCCAGTA	CAGGCAGTGA	GGGGCCCTG	CGCTCGGGAC	CCAGACTCCG	TOCTGCAGGC	TGACCGTGA	CCTGGGGGT
A6 Fibroblasts	179	GCCAGCACAG	GAAGCTGATT	GCTGAGATCG	CCTTCCAGTA	CAGGCAGTGA	GGGGCCCTG	CGCTCGGGAC	CCAGACTCCG	TOCTGCAGGC	TGACCGTGA	CCTGGGGGT
A7 Clon 10	182	GCCAGCACAG	GAAGCTGATT	GCTGAGATCG	CCTTCCAGTA	CAGGCAGTGA	GGGGCCCTG	CGCTCGGGAC	CCAGACTCCG	TOCTGCAGGC	TGACCGTGA	CCTGGGGGT
A8 Clon 17	189	GCCAGCACAG	GAAGCTGATT	GCTGAGATCG	CCTTCCAGTA	CAGGCAGTGA	GGGGCCCTG	CGCTCGGGAC	CCAGACTCCG	TOCTGCAGGC	TGACCGTGA	CCTGGGGGT

Muestra de la mutación en sangre y fibroblastos del paciente y en la línea generada (clon 17).



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

Anexo 7

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST



1. THD FiPSA1 Ep6F-17 p13
2. CT -
3. CT +