

ANEXOS A LA SOLICITUD DE
DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR
AND-4 EN EL BNLC

*ANNEXES TO THE APPLICATION FOR
THE DEPOSITION OF AND-4 CELL LINE
IN THE BNLC*

ANEXOS

ANNEXES

Anexo 1: Datos de tipificación de HLA y microsatélites
Annex 1: Microsatellite HLA typification data

Anexo 2: Controles microbiológicos
Annex 2: Microbiological controls

Anexo 3: Marcadores de indiferenciación
Annex 3: Undifferentiation markers

Anexo 4: Cariotipo
Annex 4: Karyotype

Anexo 5: Diferenciación *in vitro*
Annex 5: In vitro differentiation

Anexo 6: Diferenciación *in vivo*
Annex 6: In vivo differentiation

Anexo 7: Estructura del lentivirus utilizado
Annex 7: Structure of the lentiviral construct

Anexo 8: Expresión del lentivirus en células AND-4
Annex 8: Lentiviral expression in AND-4 cells

Anexo 1: Datos de tipificación de HLA y microsatelites de las líneas AND-4 y HEFs

Annex 1: Microsatellite and HLA typification data of AND-4 and HEFs lines



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Servicio de ANALISIS CLINICOS

Laboratorio HLA

IDENTIFICACIÓN iPSCs-conce1

*CLASE I HLA-A*2301,*3002; B*5301,*5801; Cw*0401,*0701*

*CLASE II HLA-DRB1*1503,*1602; HLA-DQB1*0502, *0602*

viernes, 20 de noviembre de 2009

Fdo. Dr. MA López Nevot
FEA de Inmunología
Laboratorio HLA Genómico

Fdo. Dr. Prof. Federico Garrido
Jefe de Servicio de Análisis Clínicos
Hospital Virgen de las Nieves Granada

C5 7/1

Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Avda. Fuerzas Armadas, 2. 18014 - Granada
Tel.: 958 02 00 00. Fax: 958 02 01 32

* **CONCE-1** es la denominación inicial de la línea celular reprogramada **AND-4**.



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Resultados del análisis de microsatélites de la línea IPSCs conce-1

IPSCs conce-1	STRs	Allele 1	Allele 2
	D6S311	233,27	235,96
	D6S291	197,75	207,17
	D6S273	125,3	127,28
	c.1.2.5	196,61	198,41
	c.1.2.c	246,75	248,7
	D6S265	122,41	-
	D6S105	122,61	123,96
	D6S276	203,96	219,07
	D15S146	220,52	-
	D15S1028	172,85	174,72
	D15S126	185,72	198,93
	D15S209	198,3	205,73
	D15S153	193,27	220,52

Fdo Dr. Prof. Federico Garrido
Jefe de Servicio de Análisis Clínicos
Hospital Virgen de las Nieves
Granada

Fdo Dra. Isabel Maleno
Investigadora FIBAO
Hospital Virgen de las Nieves
Granada

CS 7/1

Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Avda. Fuerzas Armadas, 2. 18014 - Granada
Tel.: 958 02 00 00. Fax: 958 02 01 32

* **CONCE-1** es la denominación inicial de la línea celular reprogramada **AND-4**.



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Servicio de ANALISIS CLINICOS

Laboratorio HLA

IDENTIFICACIÓN HEFS

CLASE I HLA-A*2301,*3002; B*5301,*5801; Cw*0401,*0701

CLASE II HLA-DRB1*1503,*1602; DQB1*0502,*0602

jueves, 19 de noviembre de 2009

Fdo. Dr. MA López Nevot
FEA de Inmunología
Laboratorio HLA Genómico

Fdo. Dr. Prof. Federico Garrido
Jefe de Servicio de Análisis Clínicos
Hospital Virgen de las Nieves Granada

CS 7/1

Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Avda. Fuerzas Armadas, 2. 18014 - Granada
Tel.: 958 02 00 00. Fax: 958 02 01 32



Resultados del análisis de microsatélites de la línea HEFs

HEFs	STRs	Allele 1	Allele 2
	D6S311	233,23	235,92
	D6S291	197,74	207,16
	D6S273	125,2	127,1
	c.1.2.5	196,47	198,29
	c.1.2.c	246,81	248,75
	D6S265	122,42	-
	D6S105	122,53	123,97
	D6S276	203,95	219,05
	D15S146	220,46	-
	D15S1028	173,84	175,71
	D15S126	185,83	199,04
	D15S209	198,4	205,82
	D15S153	193,38	220,46

Fdo Dr. Prof. Federico Garrido
Jefe de Servicio de Análisis Clínicos
Hospital Virgen de las Nieves
Granada

Fdo Dra. Isabel Maleno
Contratada FIBAO
Hospital Virgen de las Nieves
Granada

Anexo 2: Controles microbiológicos *Annex 2: Microbiological controls*



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Unidad de Producción Celular
Hospital Virgen de las Nieves

ENSAYO DE ESTERILIDAD

MUESTRA: iPS CONCE1

FECHA DE CULTIVO: 08 octubre 2009

TÉCNICA: Ensayo esterilidad mediante inoculación directa.

Farmacopea Española 3ª edición. 01/2005, 20601.

RESULTADO:

No desarrollo de microorganismos (bacterias y hongos) tras 15 días de incubación.

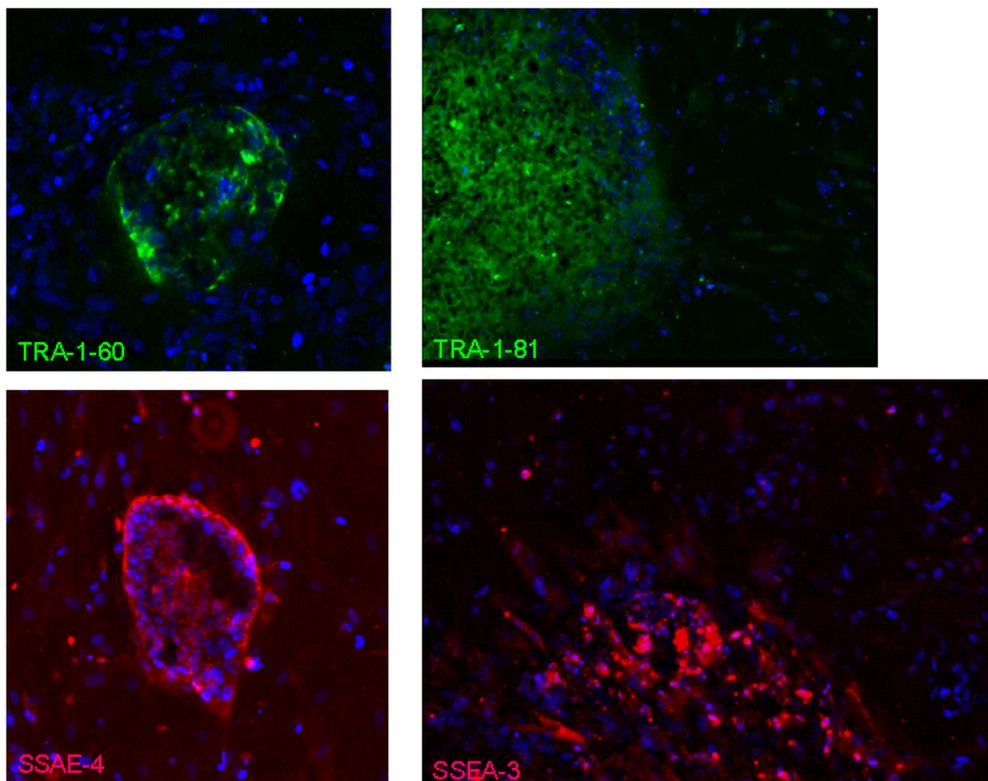
Granada, 26 de octubre de 2009

Sara Sanbonmatsu Gámez
Facultativo Especialista de Área de Microbiología y Parasitología
Unidad de Producción Celular
HU Virgen de las Nieves
Avda Fuerzas Armadas s/n
18014 Granada

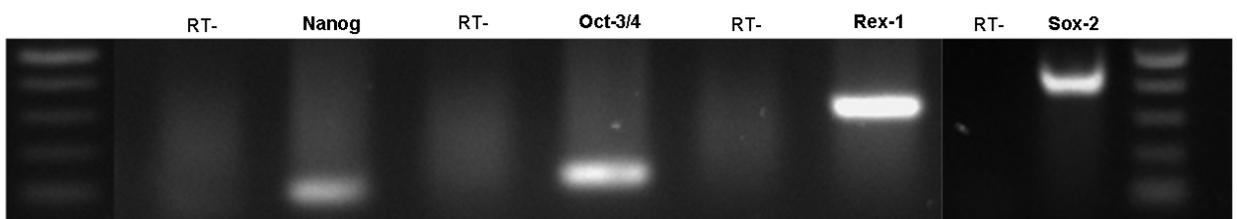
Anexo 3: Marcadores de indiferenciación. En el panel A, análisis mediante inmunofluorescencia de la presencia de cuatro marcadores de pluripotencia; el DNA se visualizó mediante tinción con DAPI (azul). En el panel B, análisis mediante RT-PCR de otros cuatro marcadores de pluripotencia.

Annex 3: Undifferentiation markers. In panel A, immunofluorescent analysis of the presence of four pluripotent markers; nuclear DNA was stained with DAPI (blue). In panel B, RT-PCR analysis of another four pluripotent markers.

A



B



* **CONCE-1** es la denominación inicial de la línea celular reprogramada **AND-4**.

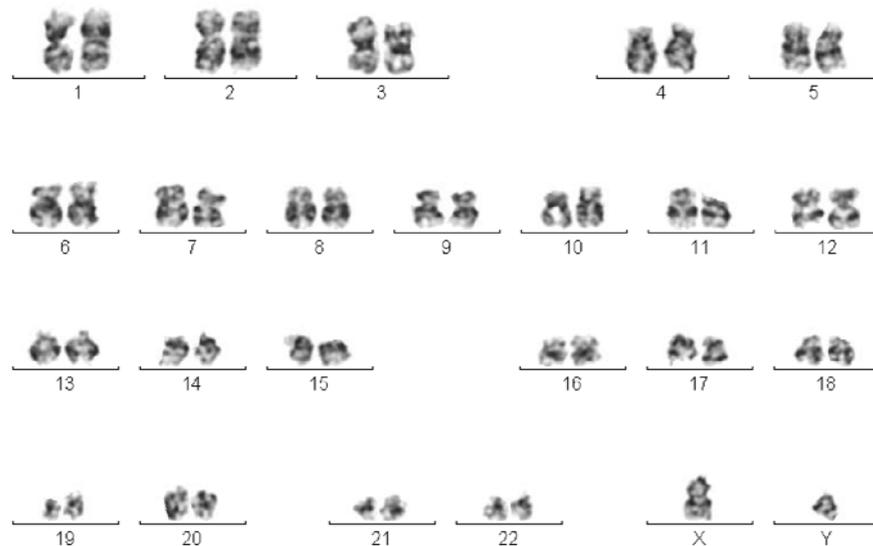
Anexo 4: Cariotipo. **A**, Cartiotipo de la línea HEFs antes de la reprogramación. **B**, Cariotipo de la línea AND-4.

Annex 4: Karyotype. A, Karyotype of HEFs line prior to reprogramming. B, Karyotype of AND-4.

A

Unidad de Citogenética			
Nº de muestra:	HEF p13	Fecha de entrada:	24/11/2009
Area solicitante:	Area Reprogramación y	Tipo de muestra:	Fibroblastos
Paciente:	/	Técnica:	Bandas G
Hospital:			

RESULTADOS ANÁLISIS CITOGÉNICO



Cariotipo: 46,XY

Diagnóstico citogenético: Cariotipo masculino normal

Comentarios cariotipo: El resultado del estudio está limitado por la sensibilidad de la técnica.

P. Catalina - C. Palma - P.E. Leone

04/12/2009

* **CONCE-1** es la denominación inicial de la línea celular reprogramada **AND-4**.

B

Unidad de Citogenética

Nº de muestra: conce-1 P10

Fecha de entrada: 20/10/2009

Area solicitante: Area Reprogramación y

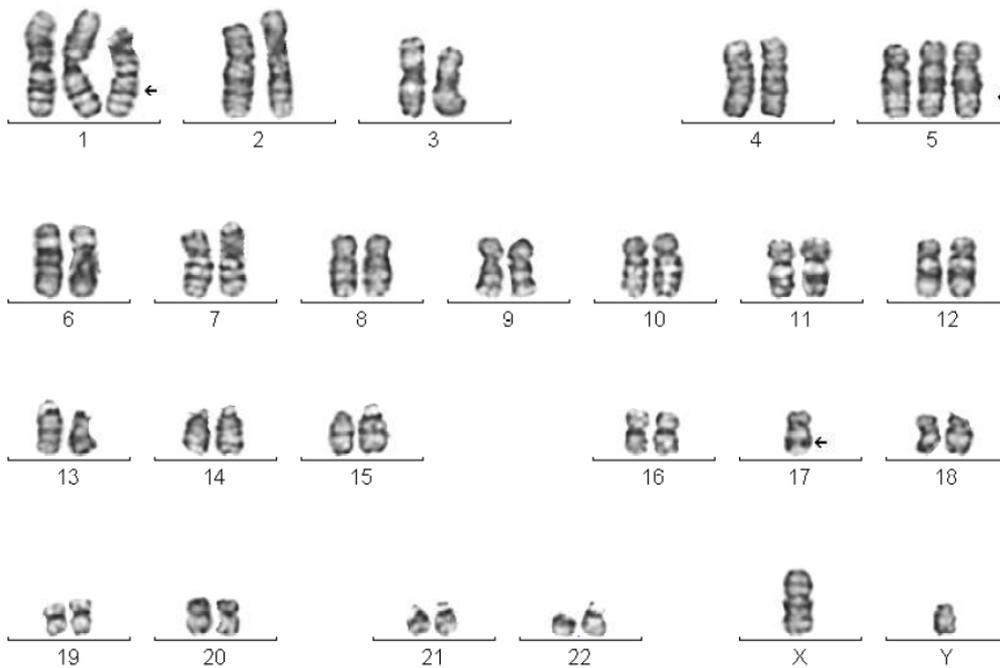
Tipo de muestra: Línea celular

Paciente: /

Técnica: Bandas G

Hospital:

RESULTADOS ANÁLISIS CITOGENÉTICO



Cariotipo: 47,XY,+1,+5,-17

Diagnóstico citogenético:

Comentarios cariotipo: El resultado del estudio está limitado por la sensibilidad de la técnica

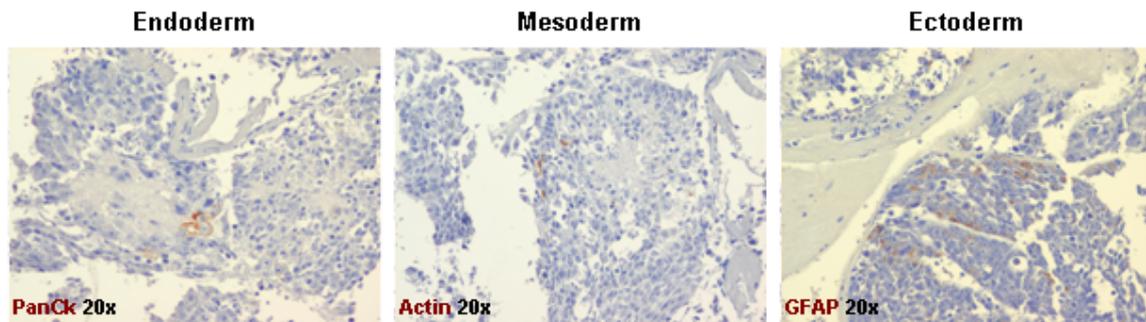
P. Catalina - C. Palma - P.E. Leone

16/11/2009

* **CONCE-1** es la denominación inicial de la línea celular reprogramada **AND-4**.

Anexo 5: Diferenciación *in vitro*
Annex 5: In vitro differentiation

CONCE-1 line



PanCK: Pancreatic Cytokeratin

Actin: Alpha Smooth Muscle Actin

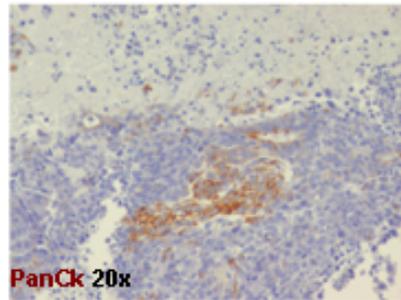
GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

* **CONCE-1** es la denominación inicial de la línea celular reprogramada **AND-4**.

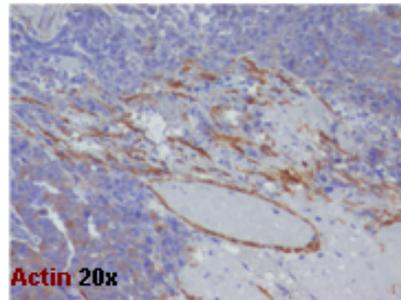
Anexo 6: Diferenciación *in vivo*
Annex 6: In vivo differentiation

CONCE-1 line

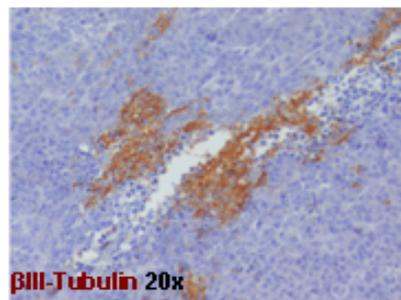
Endoderm



Mesoderm



Ectoderm

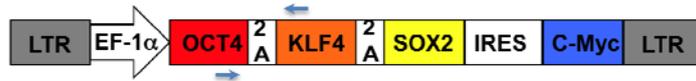


PanCK: Pancreatic Citokeratin
Actin: Alpha Smooth Muscle Actin

* **CONCE-1** es la denominación inicial de la línea celular reprogramada **AND-4**.

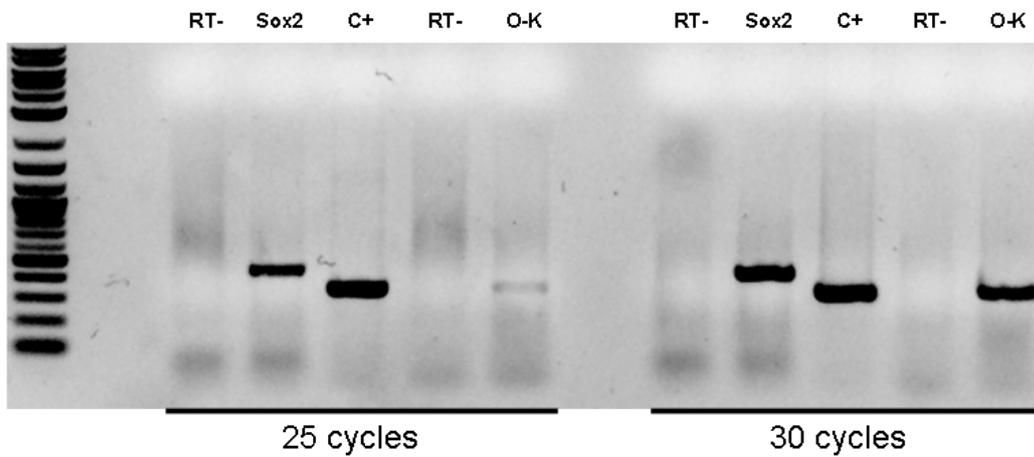
Anexo 7: Estructura del lentivirus utilizado. La posición relativa de los cebadores utilizados para detectar expresión específica del transgen se muestran con flechas azules.

Annex 7: Structure of the lentiviral construct. In the scheme, the relative position of the oligonucleotides used to detect specific expression of the transgene are shown as blue arrows.



* **CONCE-1** es la denominación inicial de la línea celular reprogramada **AND-4**.

Anexo 8: Expresión del lentivirus en células AND-4
Annex 8: Lentiviral expression in AND-4 cells



Sox2: RT-PCR para amplificar el factor de transcripción Sox2
Sox2: RT-PCR to amplify the transcription factor Sox2

O-K: RT-PCR para amplificar una región del transgén (Anexo 7) en 25 y 30 ciclos
O-K: RT-PCR to amplify a region of transgene (Annex 7) at 25 and 30 cycles