



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **ATTR-CM PBiPS1-Sv4F-3** 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

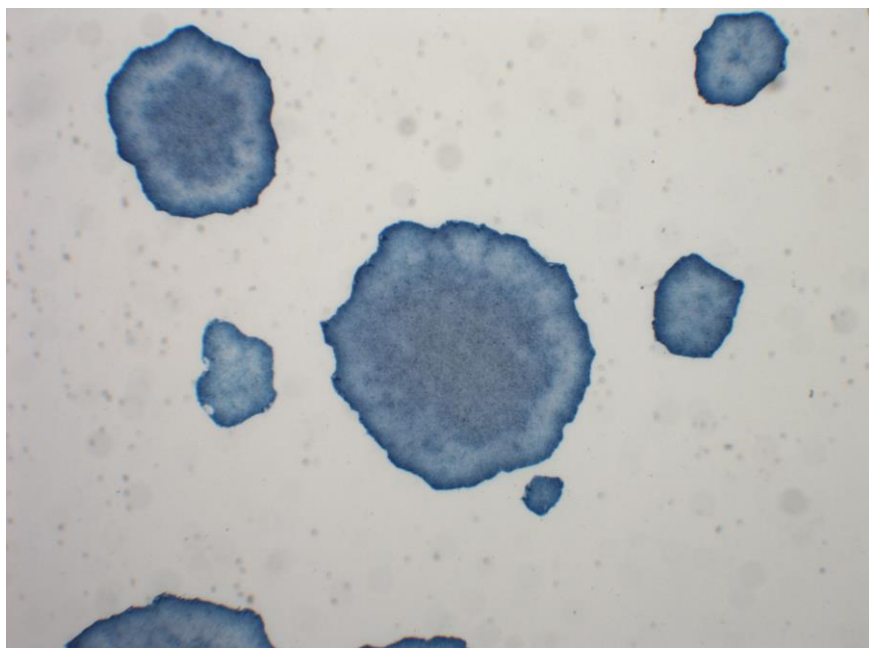
Anexo 6: Comprobación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

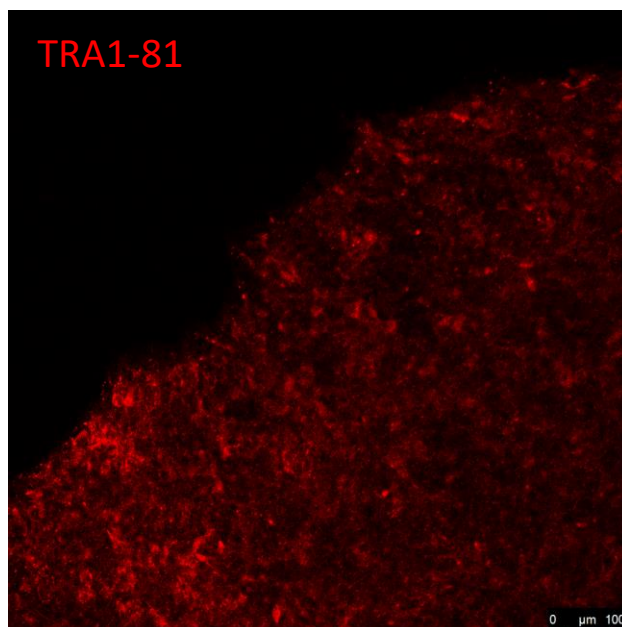
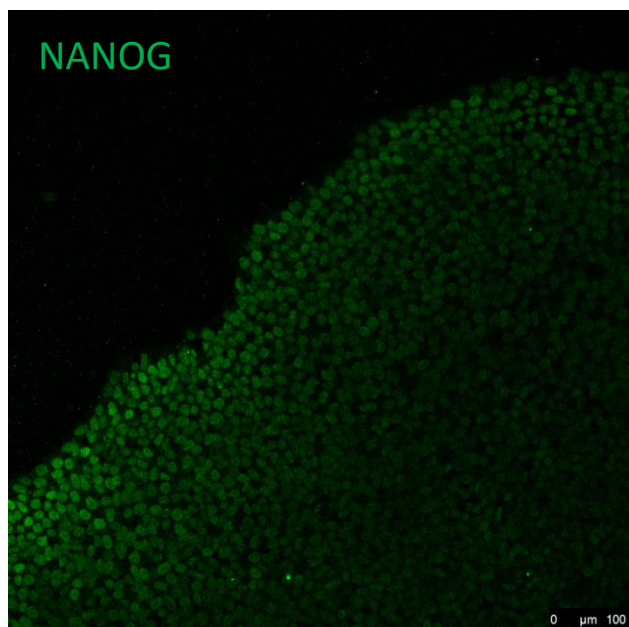


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

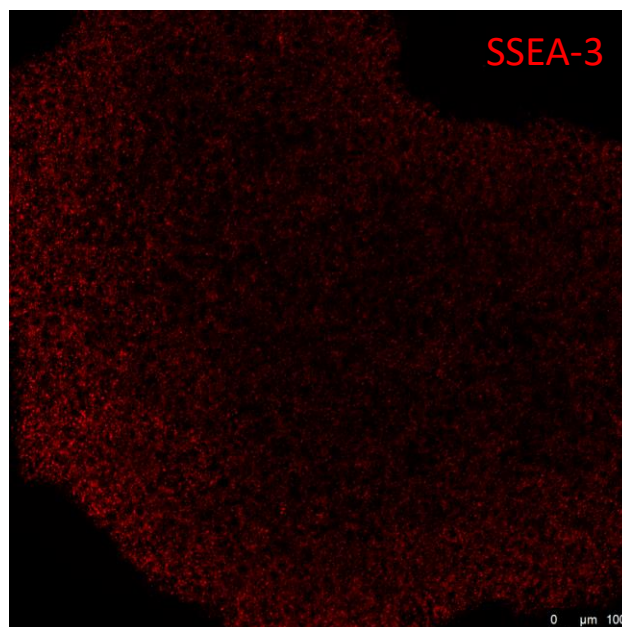
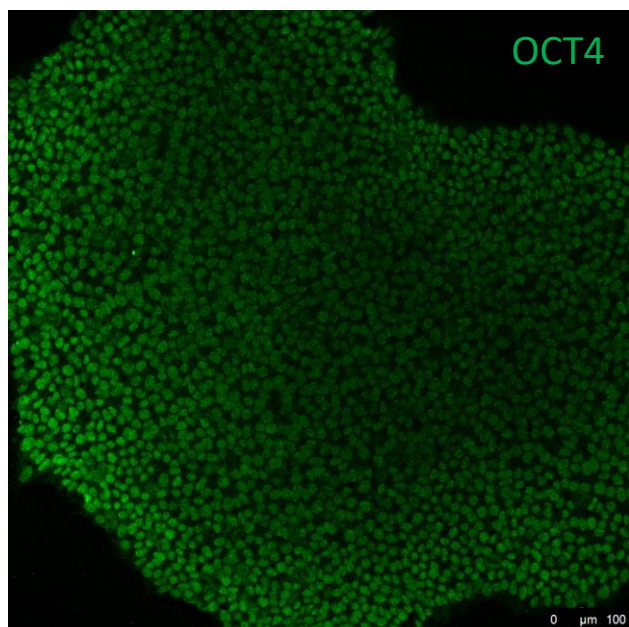


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



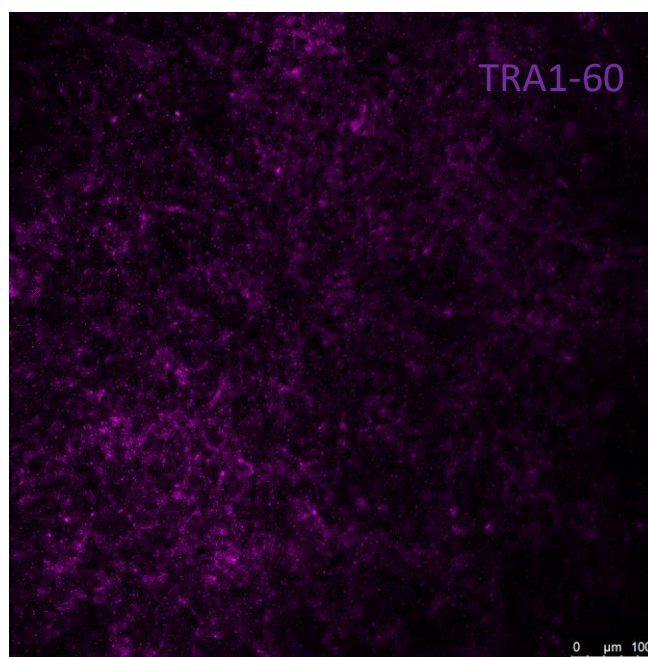
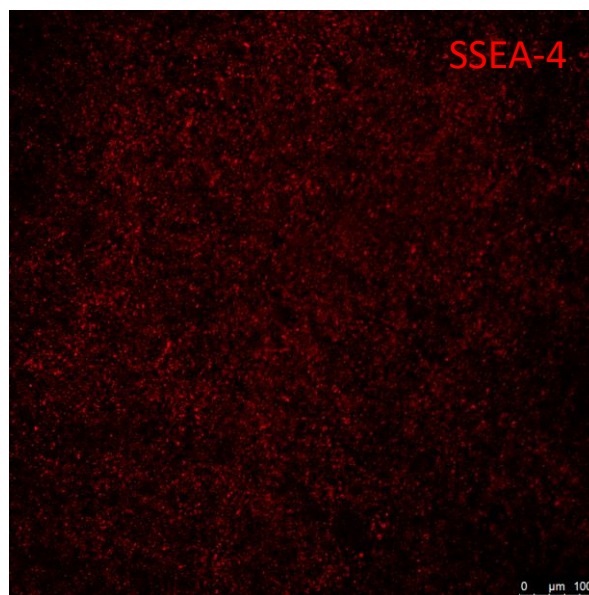
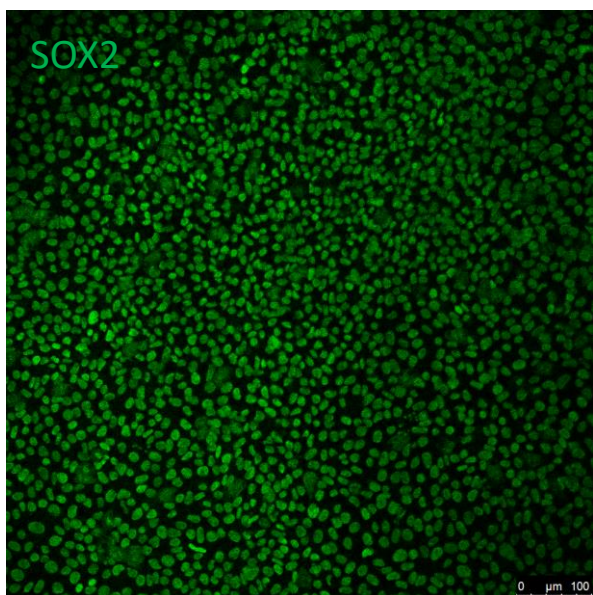
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



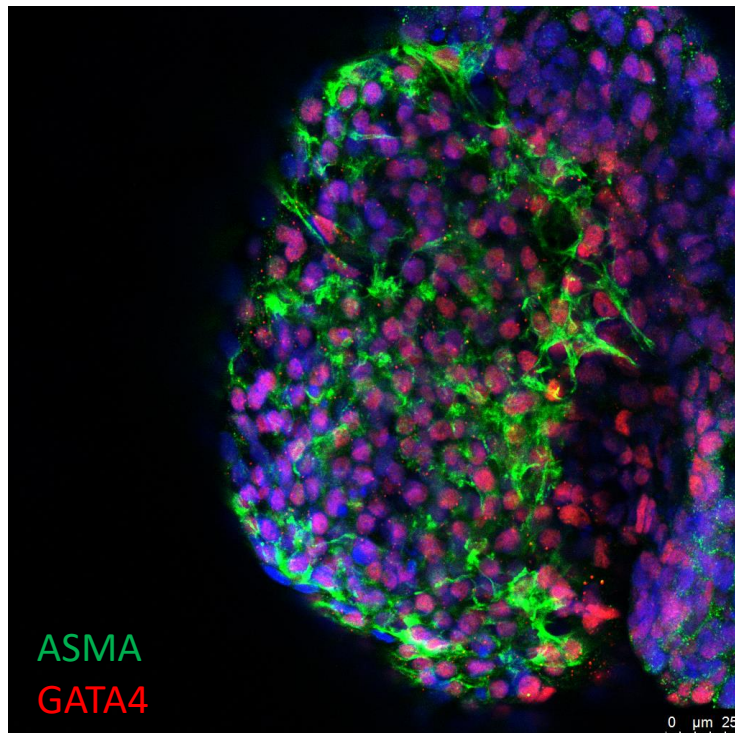
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

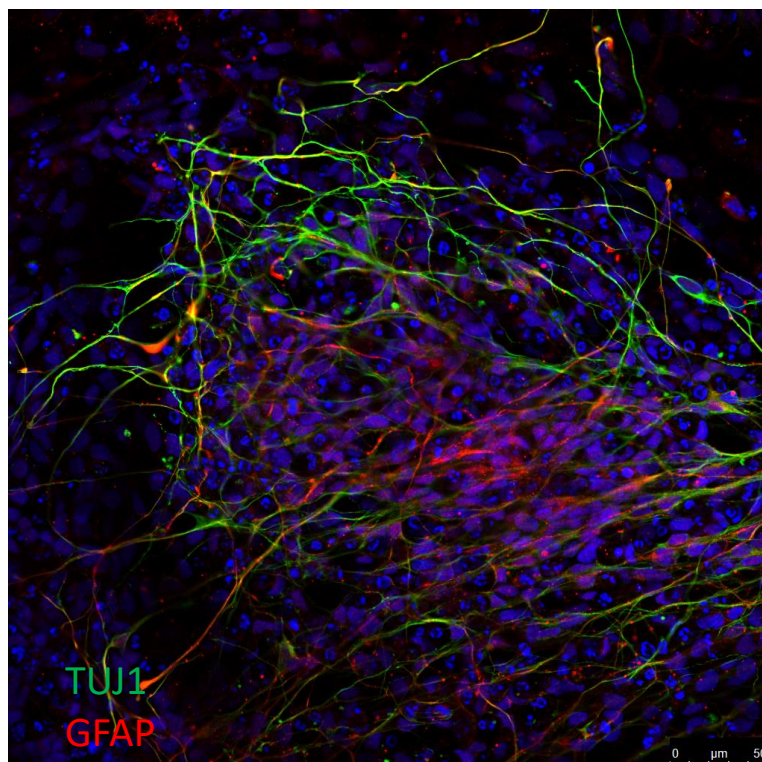


Anexo 2

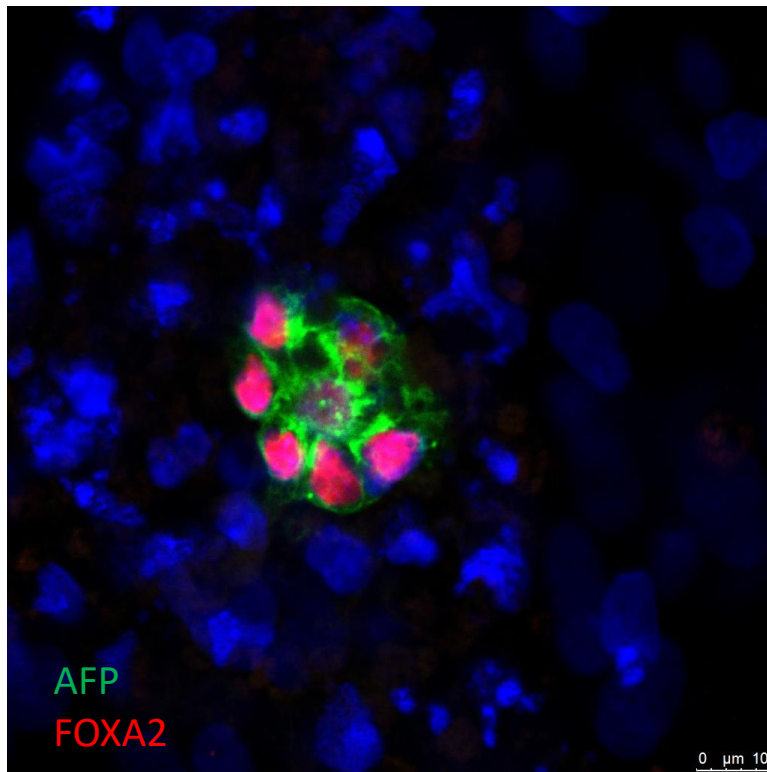
Diferenciación *in vitro*



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASMA** y **GATA4**



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



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



Anexo 3

Cariotipo

CYTOGENETICS STUDY

Case name: 21850835

NHC: CT0449

Name: TAC PBiPS1-Sv4F-3 p12

Department: IDIBELL

Sample: CM

Date: 7/8/2022



Case: 21850835 Slide: 2 Cell: 3F

Result: 46,XX



Anexo 4

Resultado microsatélites

P-CMR[C]

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Línea celular	Loci STRs analizados									
	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX
TAC PBiPS1-Sv4F-3 p13	6; 7	31.2; 33.2	11	11; 14	12	9; 12	11; 12	X	18; 19	8; 11

P-CMR[C]

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Línea celular	Loci STRs analizados									
	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX
PBMCs P.S43N-1, 02.03.22	6; 7	31.2; 33.2	11	11; 14	12	9; 12	11; 12	X	18; 19	8; 11

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en las células de sangre periférica de las que procede.



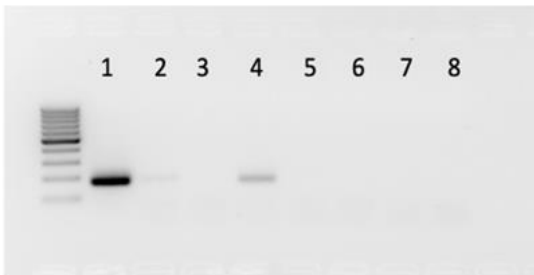
Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación

RT-PCR SENDAI 2.0 28/06/2022

1. Fb PMM2 Sv-Infected, 05.03.2021
2. TAC PBiPS1-Sv4F-2 (TAC-2) p7
3. TAC PBiPS1-Sv4F-3 (TAC-3) p10
4. TAC PBiPS1-Sv4F-6 (TAC-6) p10
5. TAC PBiPS1-Sv4F-8 (TAC-8) p11
6. Sample NO RT
7. Rb20234-C17 p12 (NEGATIVE CONTROL)
8. H2O

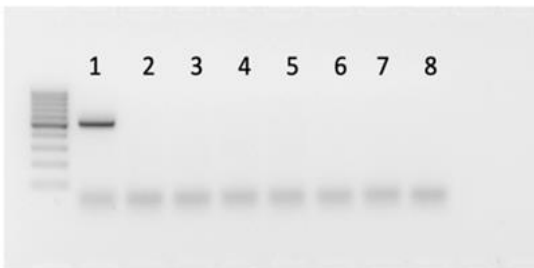
Sev (181 pb)



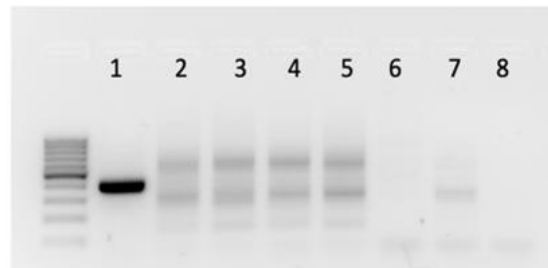
C- Myc (532 pb)



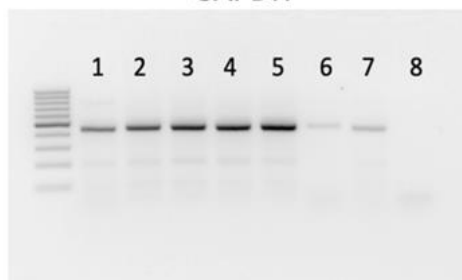
KOS (528 pb)



Klf4 (410 pb)



GAPDH

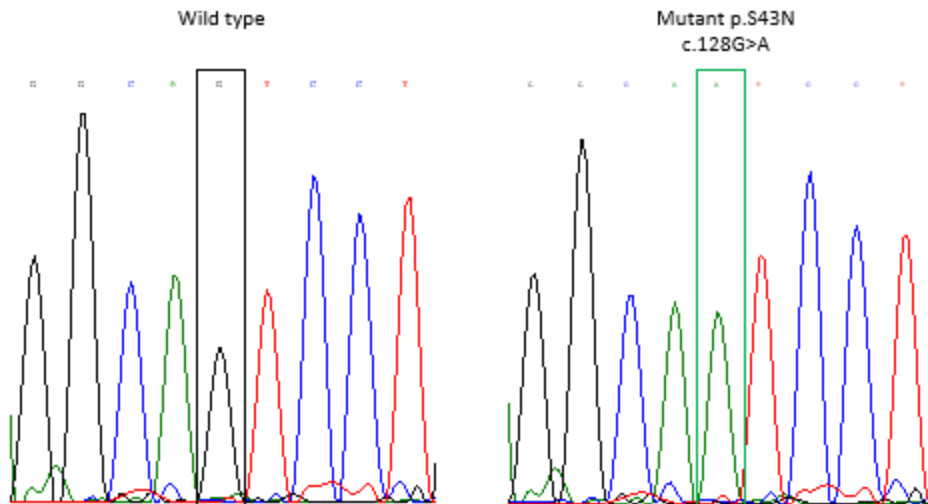


Ausencia de los transgenes de reprogramación. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH



Anexo 6

Comprobación de la presencia de la mutación



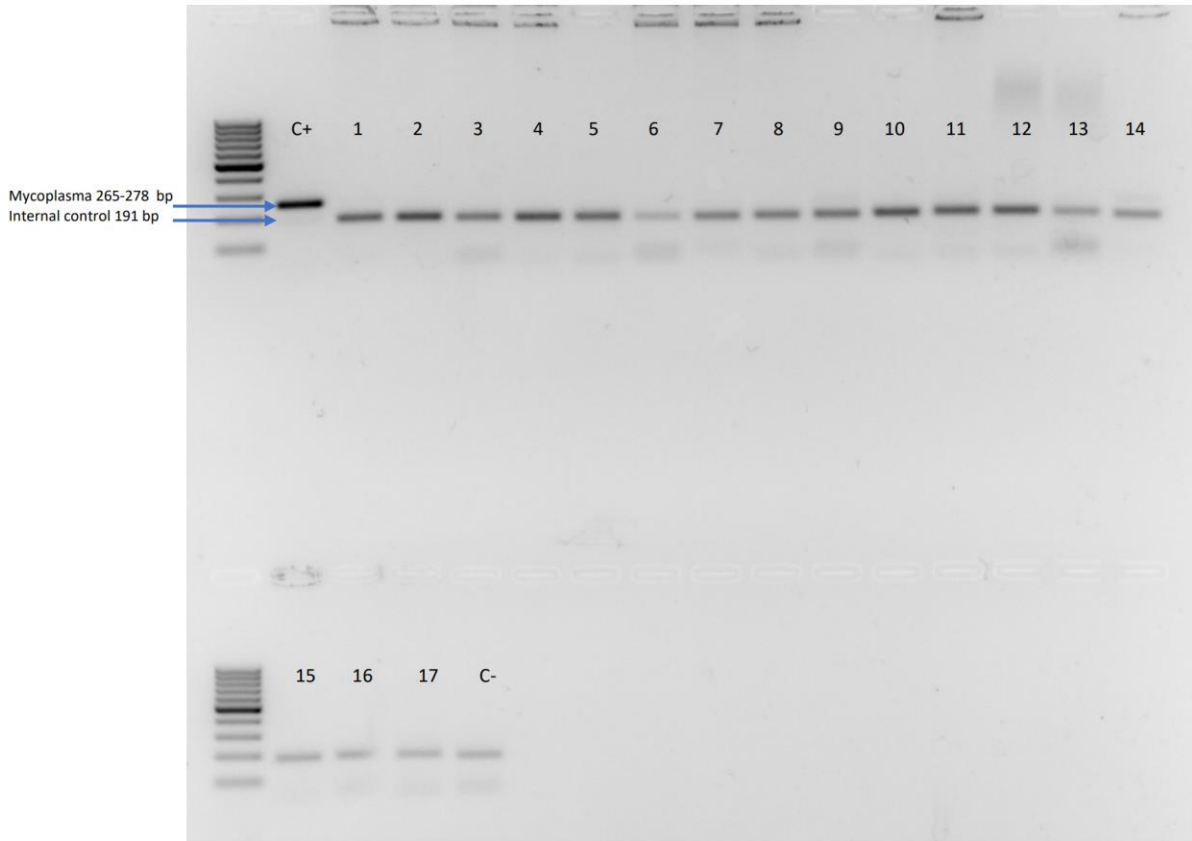
Resultados de la secuenciación en la línea de iPSC generada en la que se observa la mutación p.s43N c.128G>A que muestra el paciente.



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 20/07/2022



2. TAC PBiPS1-Sv4F-3 p12