



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR **PMM2-CDG FiPS48-Sv4F-7** 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

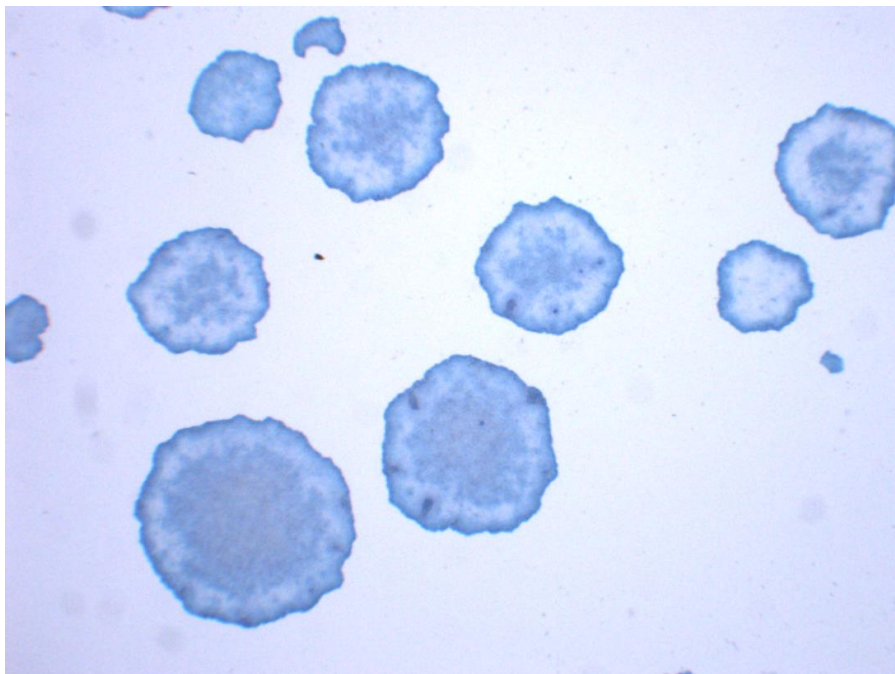
Anexo 6: Comprobación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

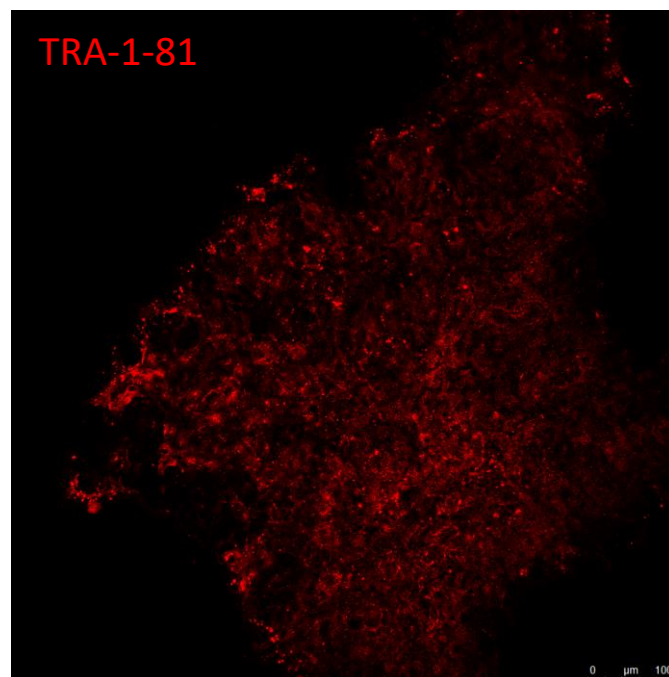
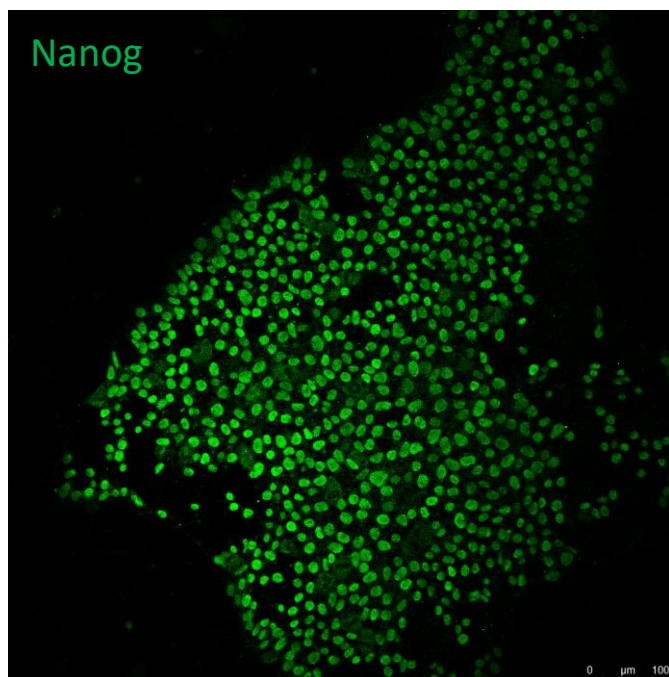


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

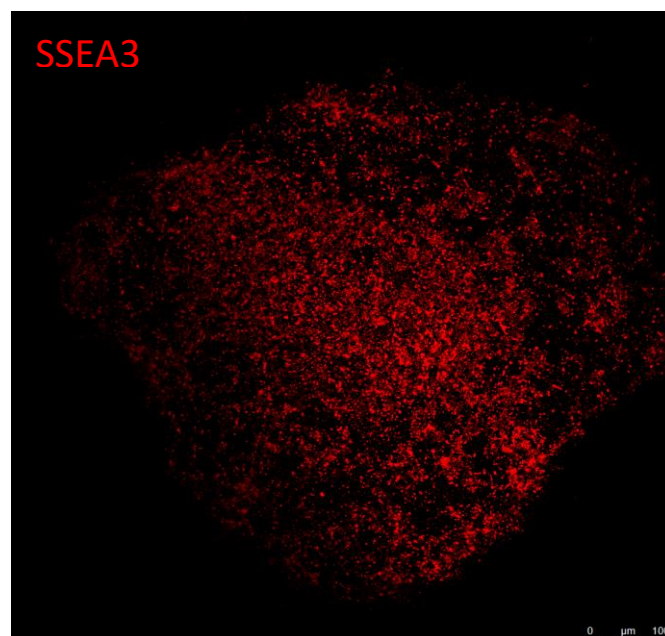
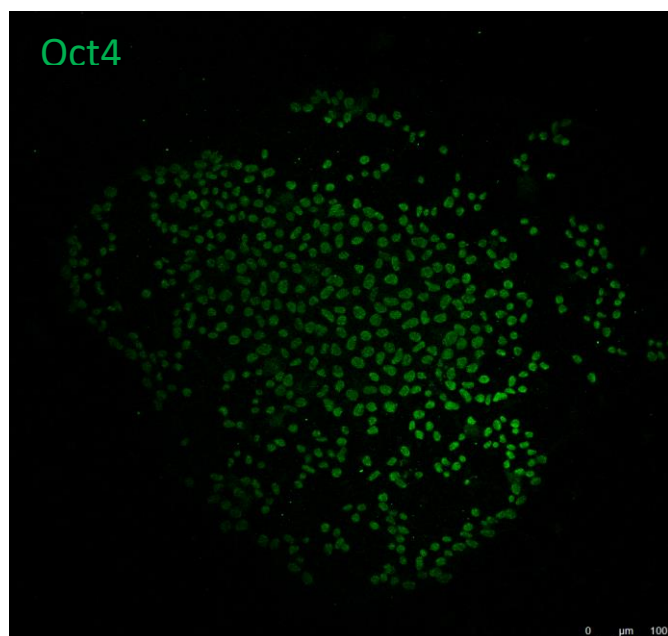


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



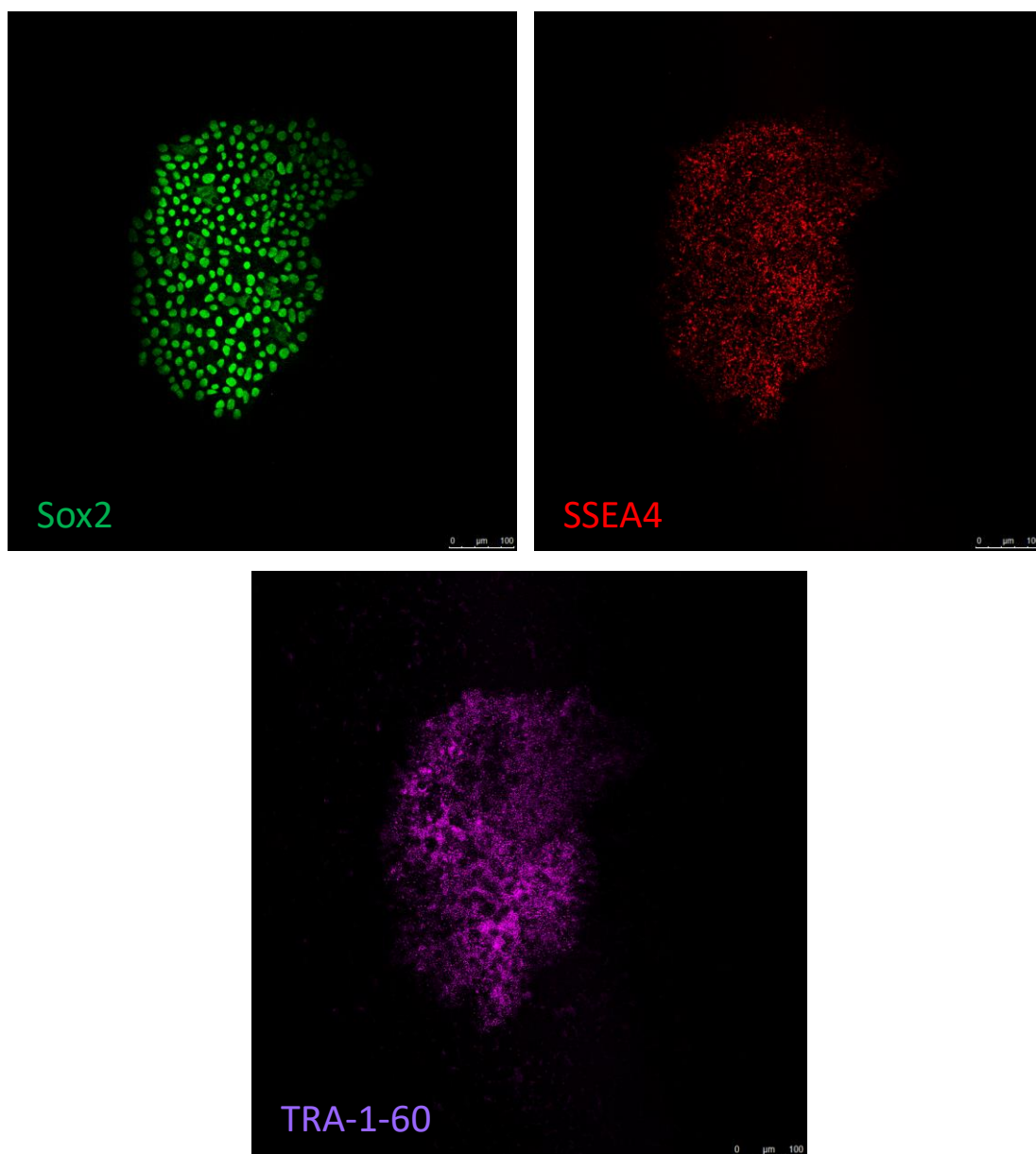
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



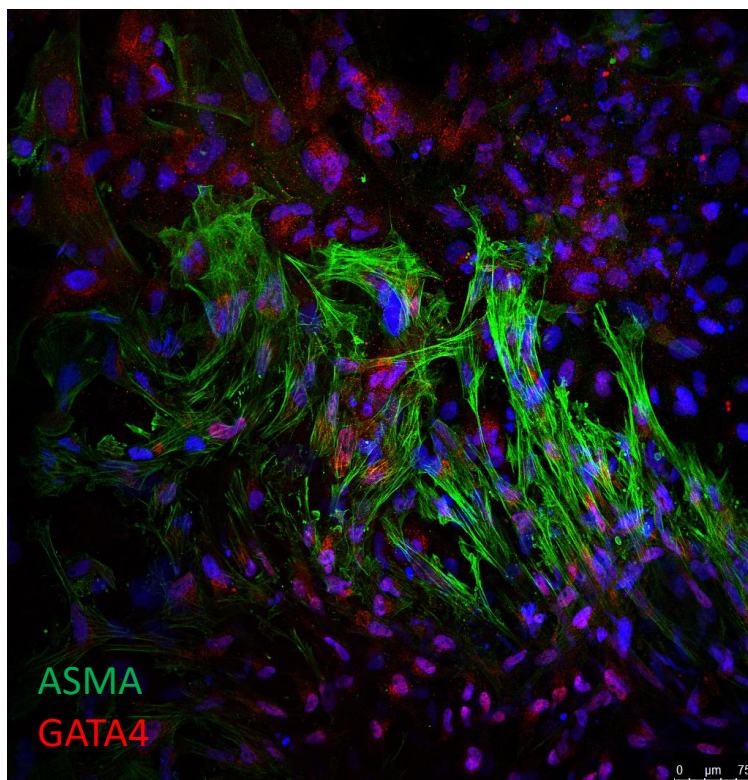
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

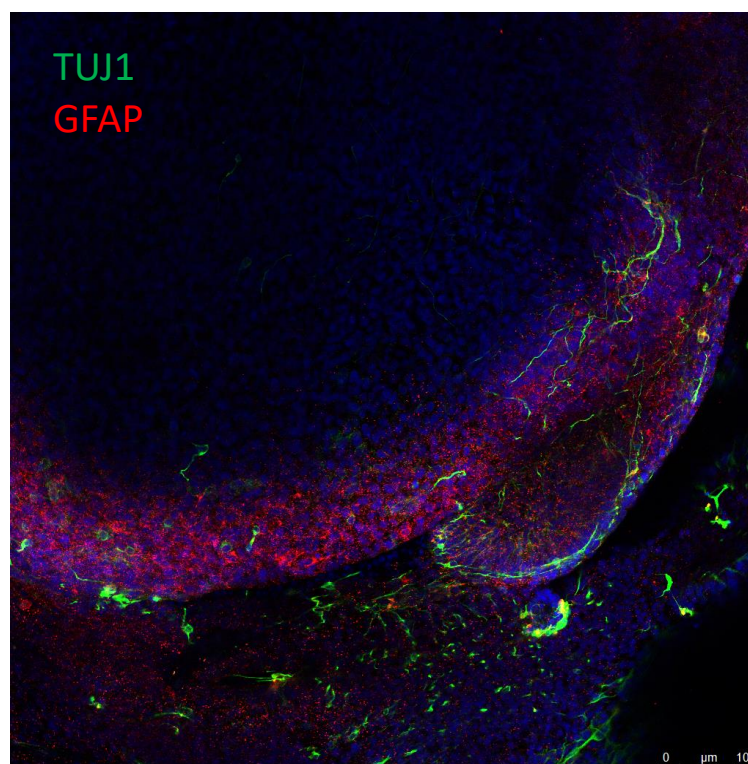


Anexo 2

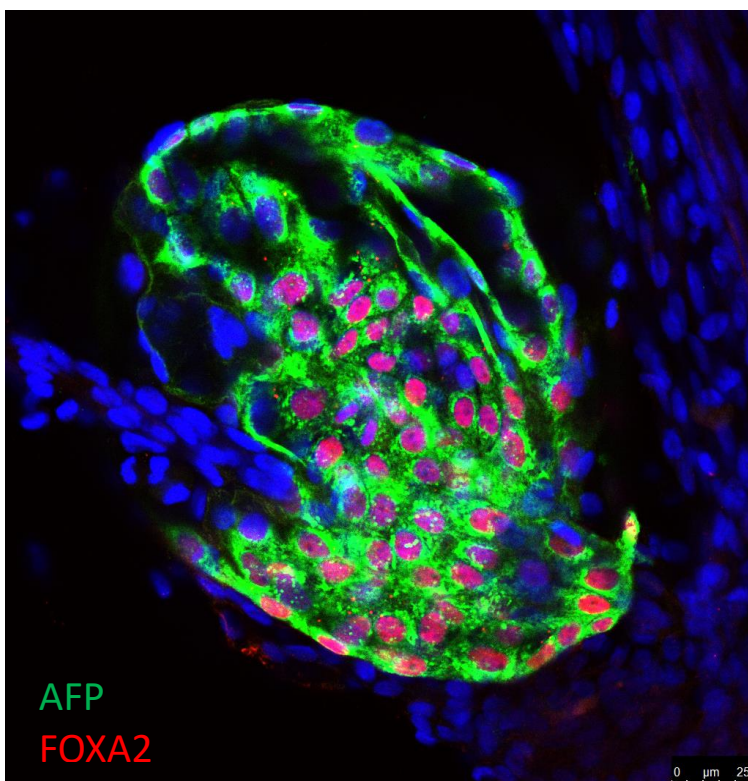
Diferenciación *in vitro*



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

ESTUDIO CITOGENETICO

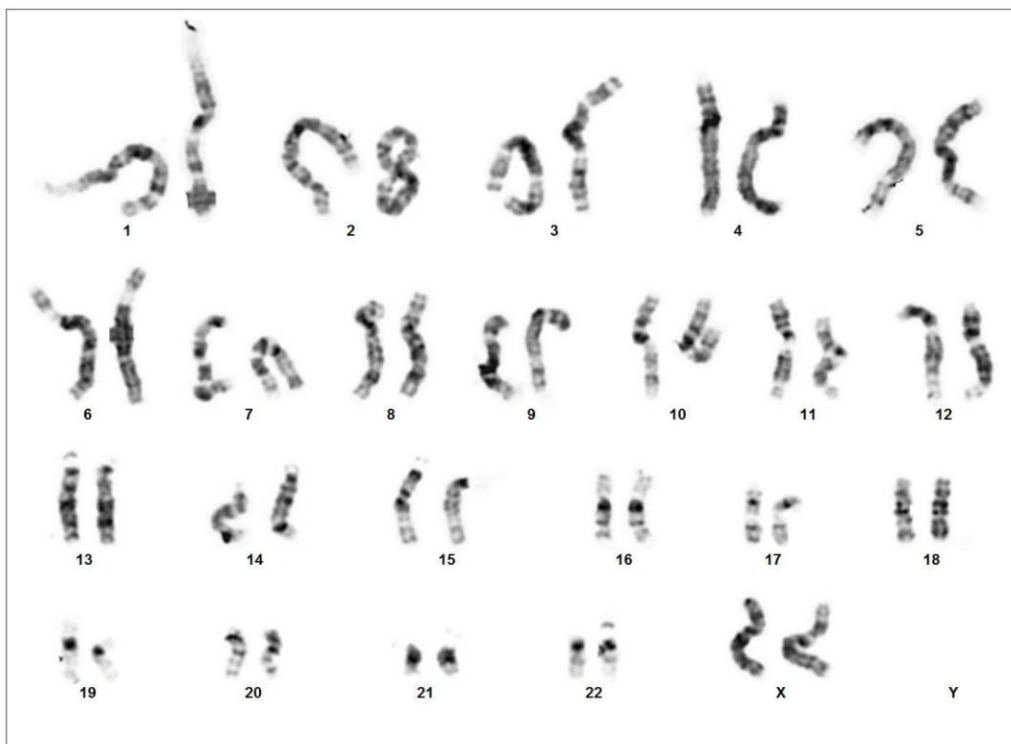
Case name: 11581073

Servicio: IDIBELL

NHC: CT0253

Tipo de muestra: CM

Nombre y Apellidos: PMM2-CDG FiPS48-Sv4F-7p13



Case: 11581073 Slide: 2 Cell: 1

Resultado: 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	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
- PMM2-CDG FiPS48-Sv4F-7 p11	6; 9	30; 32.2	12	11; 12	10	11	10	X	16; 17	8

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	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
FB20484, pase 8, 1M cells, 10.02.21.	6; 9	30; 32.2	12	11; 12	10	11	10	X	16; 17	8

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en los fibroblastos de los que procede.

Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación

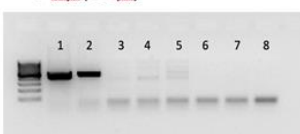
RT-PCR SENDAI 2.0 16/04/21

1. Control + SENDAI 2.0
2. CDG FIPS48- Sv4F-1 p7
3. CDG FIPS48- Sv4F-3 p7
4. CDG FIPS48- Sv4F-4 p7
5. CDG FIPS48- Sv4F-6 p7
6. Sample NO RT
7. Rb20234-C17 p12 (NEGATIVE CONTROL EPISOMAL SAMPLE)
8. H2O

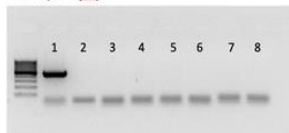
Sev (181 pb)



C- Myc (532 pb)



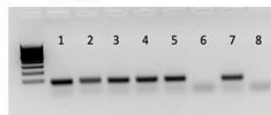
KOS (528 pb)



Klf4 (410 pb)



GAPDH



RT-PCR SENDAI 2.0 23.04.21

1. Control + SENDAI 2.0
2. CDG FIPS48-Sv4F-7 p7
3. CDG FIPS48-Sv4F-8 p8
4. Sample NO RT
5. Rb20234-C17 p12 (NEGATIVE CONTROL EPISOMAL SAMPLE)
6. H2O

Sev (181 pb)



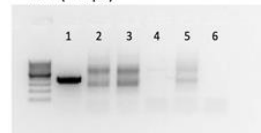
C- Myc (532 pb)



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

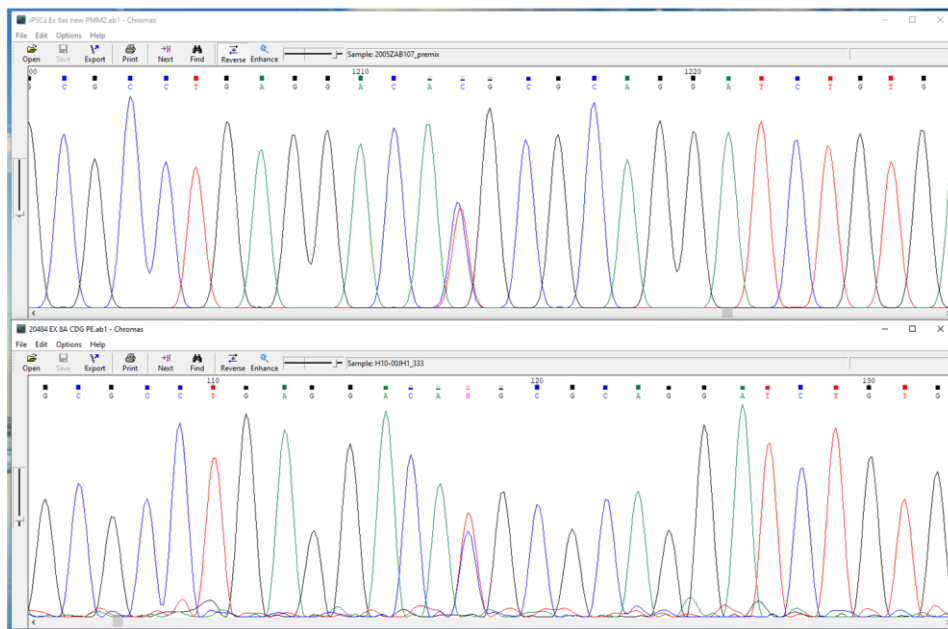


Anexo 6

Comprobación de la presencia de la mutación

↓ p.T237M (c.710 C>T)

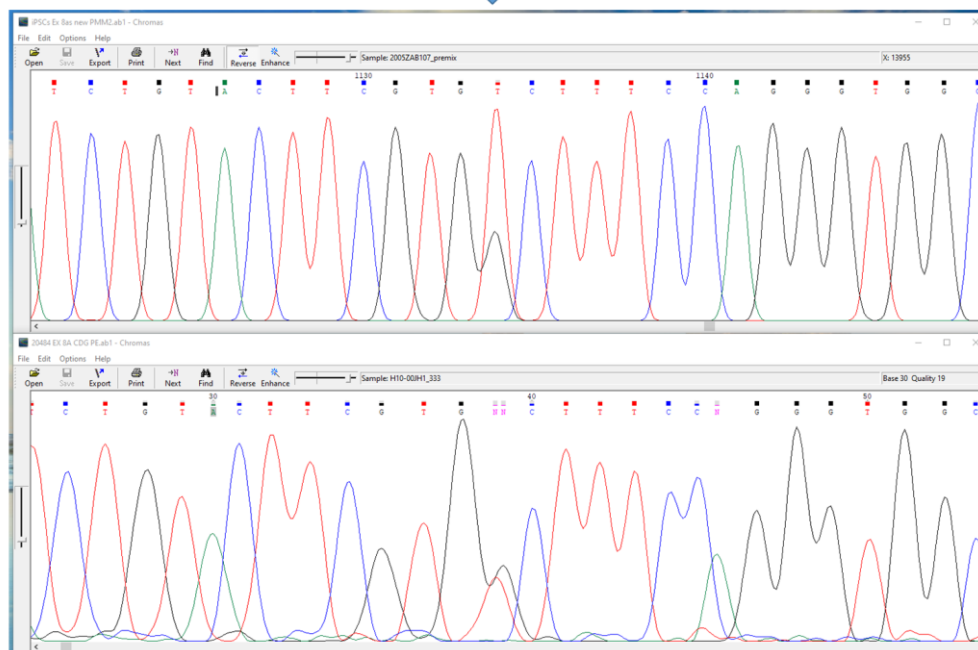
PMM2-CDG
FiPS48-Sv4F-7



Fibroblasts

↓ c.640-9 T>G

PMM2-CDG
FiPS48-Sv4F-7



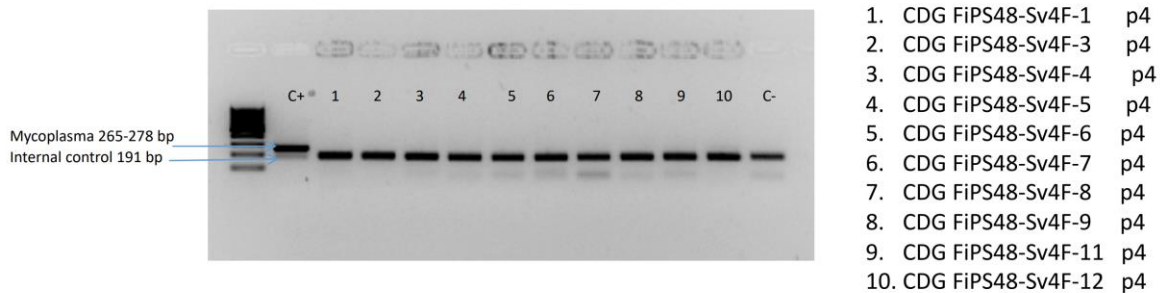
Fibroblasts



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 25/03/2021



P-CMR[C]