



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **ATTR CM PBiPS2-Sv4F-16** 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

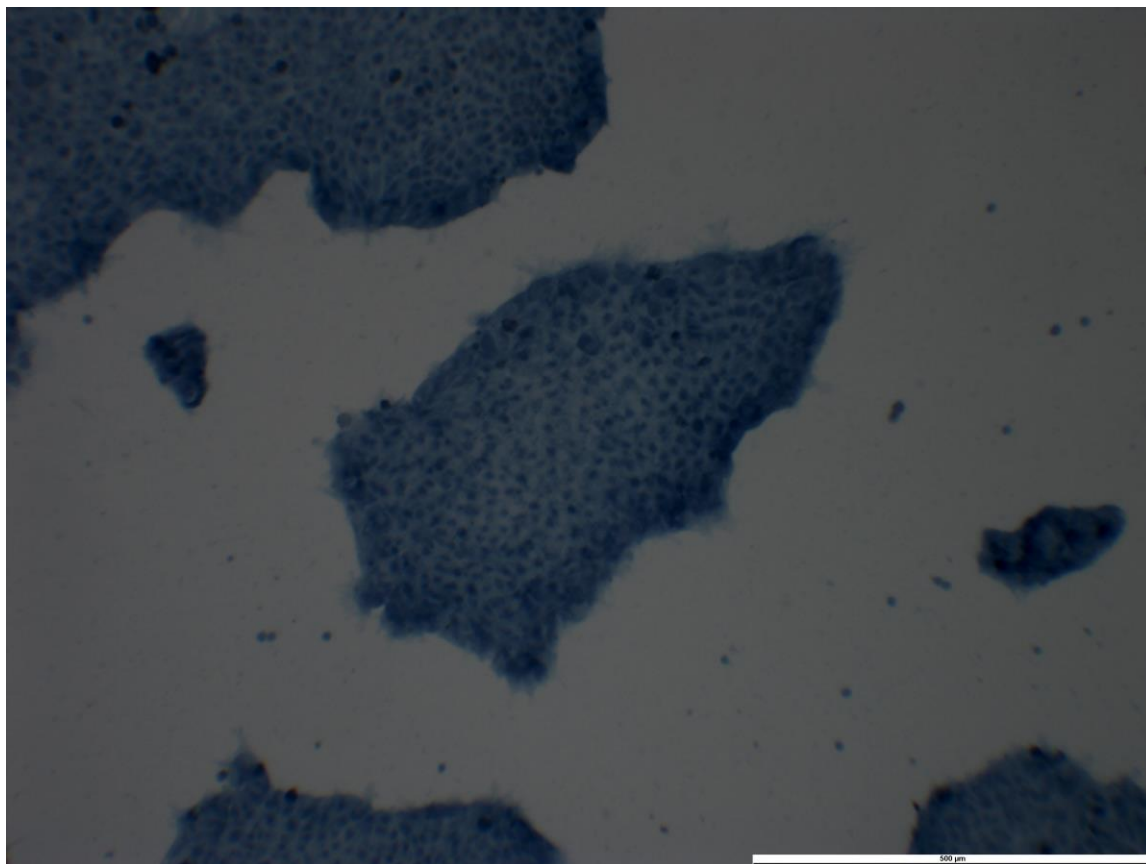
Anexo 6: Comprobación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

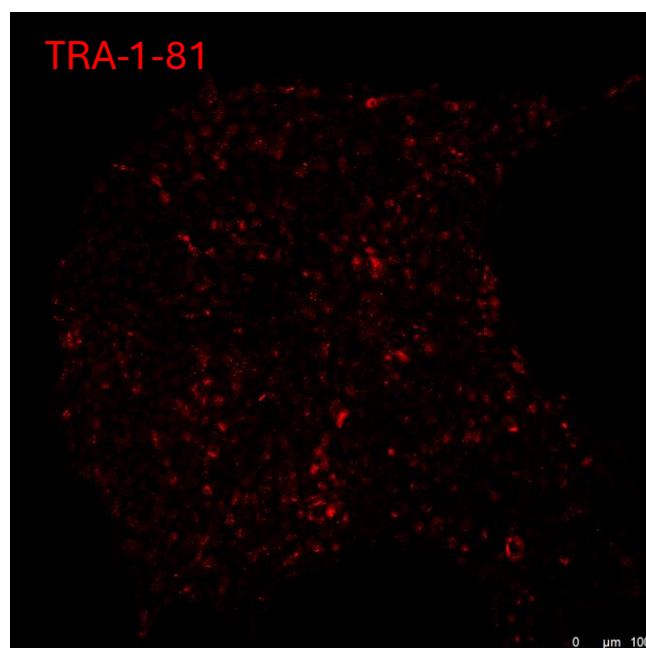
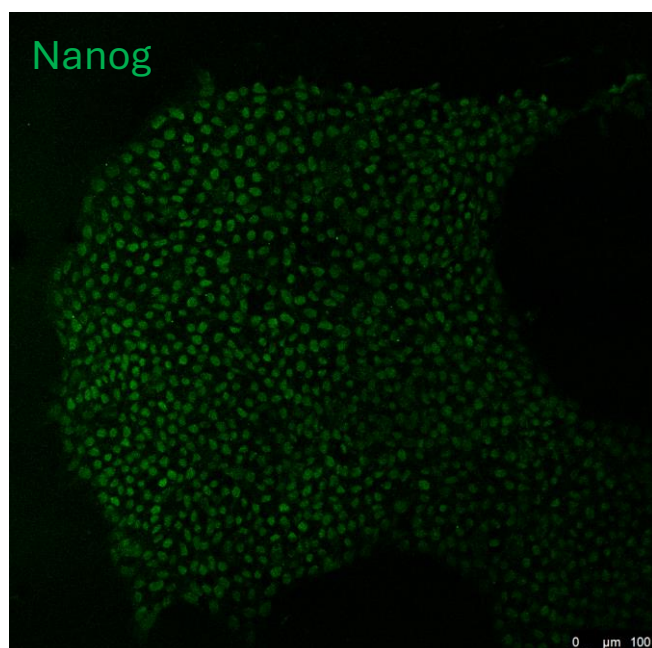


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

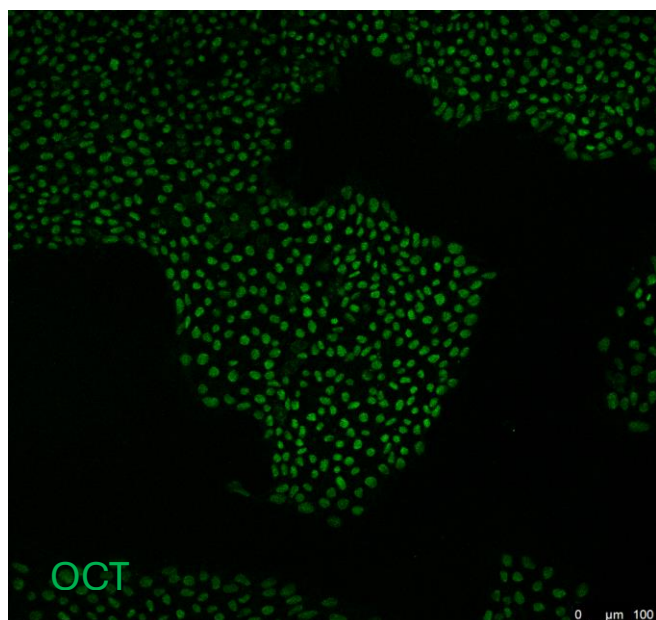


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



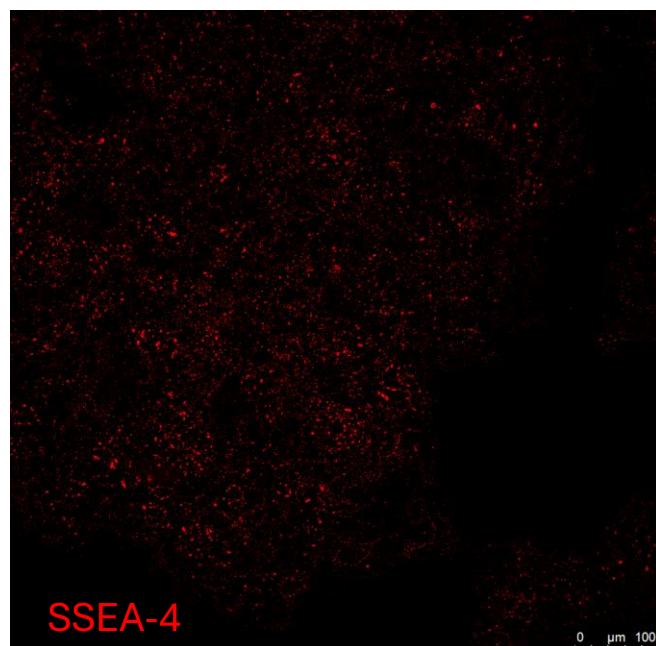
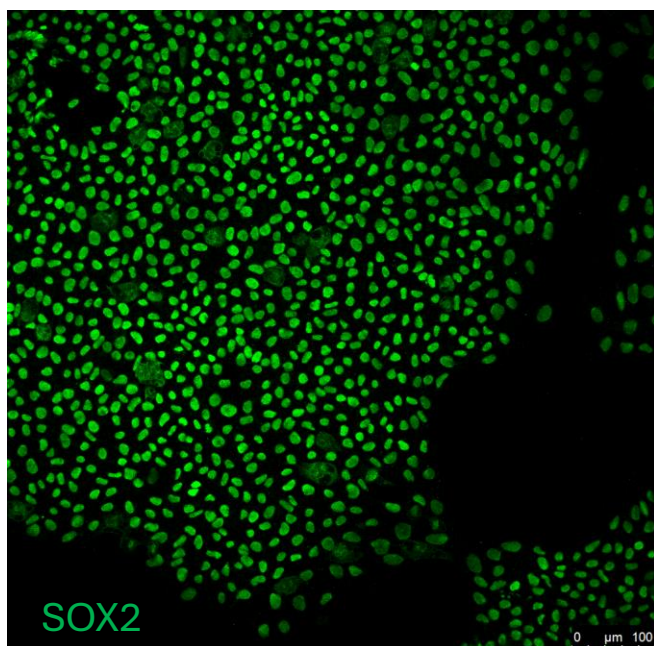
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



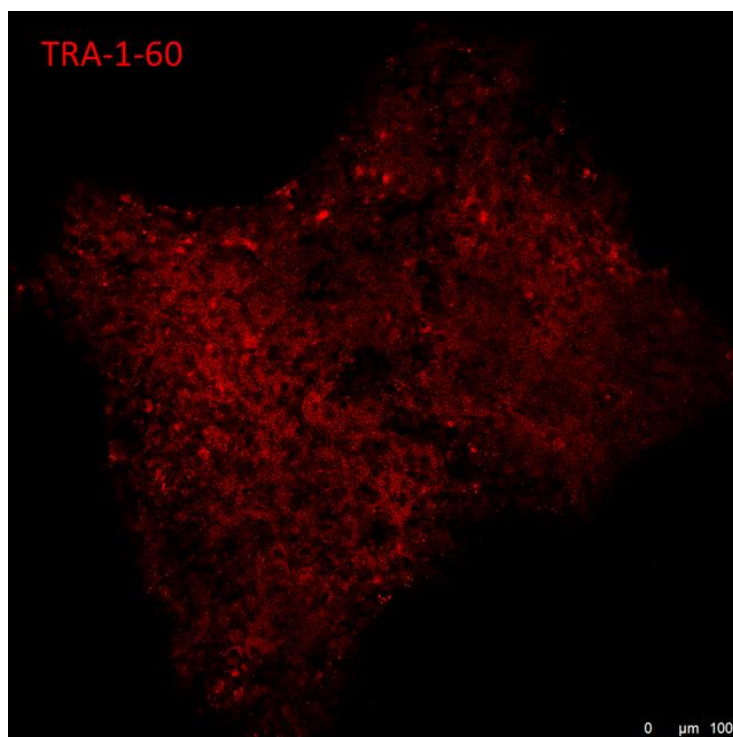
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4



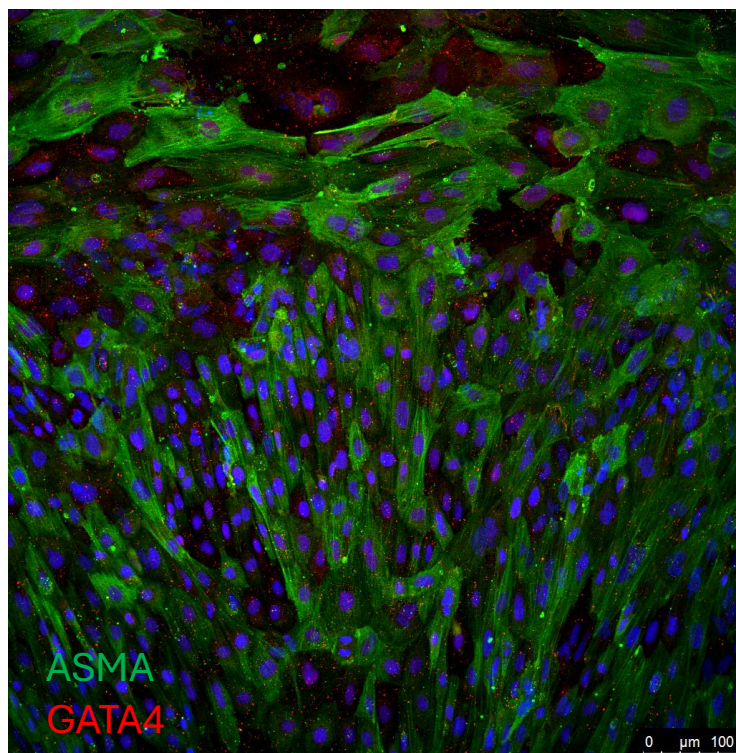
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

TRA1-60

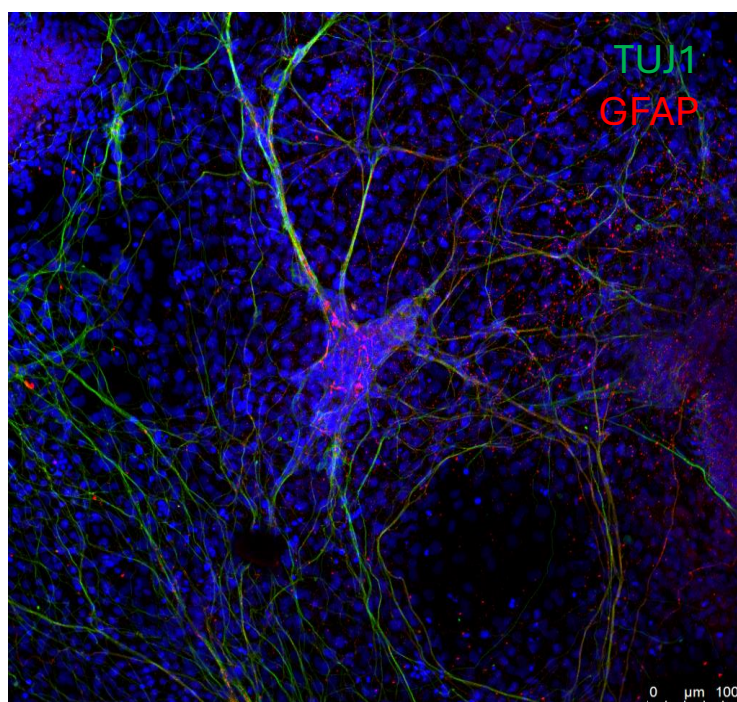


Anexo 2

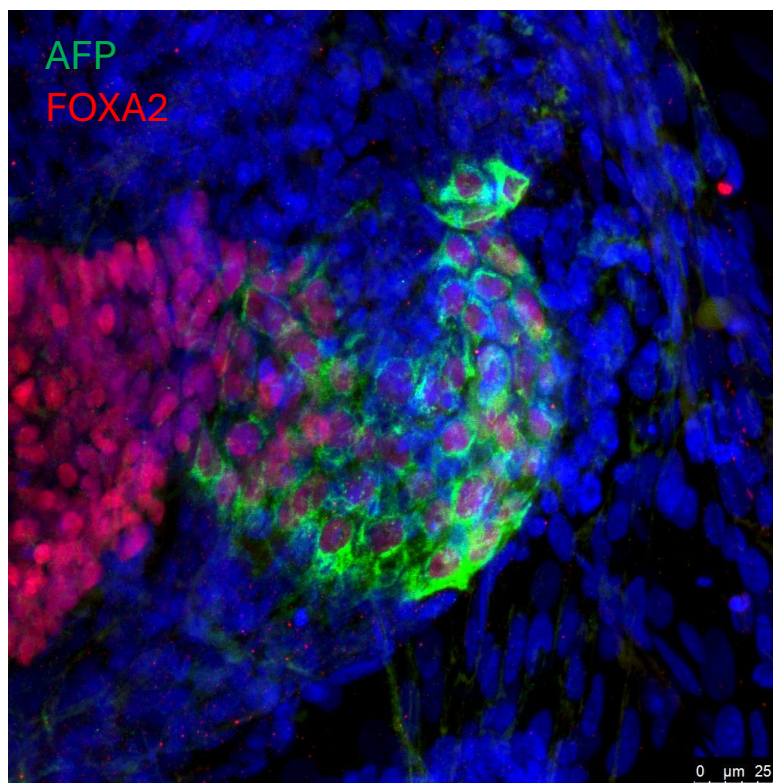
Diferenciación *in vitro*



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: 40570568

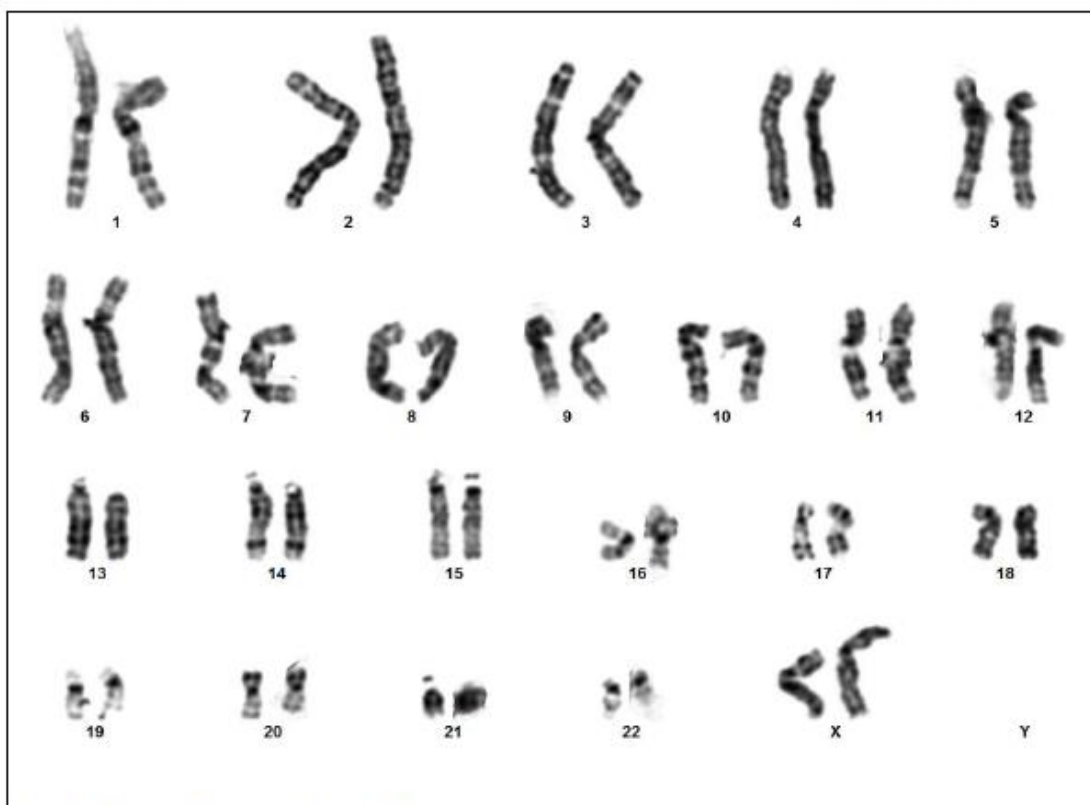
Name: ATTR CM PBiPS2-Sv4F-16 p7

NHC: CT0739

Department: IDIBELL

Date: 3/7/2024

Sample: CM



Case: 40570568 Slide: 2 Cell: 4

Result: 46,XX



Anexo 4

Resultado microsatélites

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

Mostra:	Identificació	ID Ambar	Típus de mostra
ATTR CM PBIPS2-SV4F-16 P9	1335110	1335110	Extracte DNA

Descripció de l'estudi

L'estudi de consisteix en l'anàlisi de microsatèl·lits o "short tandem repeats" (STR) de DNA procedent determinades línies cel·lulars. El procediment seguit ha estat el següent:

- . PCR - Amplificació de 15 regions de DNA (STR- short tandem repeats) amb els Kit de Genotipat AmpFLSTR® Identifier® Plus PCR Amplification Kit. La combinació d'aquestes 15 regions constitueix el perfil genètic (impressió digital genètica)
- . Electroforesi capil·lar – Lectura del perfil genètic de la mostra.
- . Software d'anàlisi – Assignació del perfil genètic.

Resultats

Marcadors Genètics	Localització cromosòmica	Al·lels mostra 1335110	
D8S1179	8	14	15
D21S11	21q11.2-q21	29	32,2
D7S820	7q11.21-22	9	10
CSF1PO	5q33.3-34	11	11
D3S1358	3p	15	18
TH01	11p15.5	9	9,3
D13S317	13q22-31	8	12
D16S539	16q24-qter	9	9
D2S1338	2q35-37.1	23	24
D19S433	19q12-13.1	12	14
VWA	12p12-pter	16	16
TPOX	2p23-2per	8	8
D18S51	18q21.3	12	20
D5S818	5q21-31	10	12
FGA	4q28	21	21
AMELOGENINA*	X: p22.1-22.3- Y: p11.2	X	X

*Amelogenina: Resultat al·lel relatiu al sexe cromosòmic: XX (sexe femení); XY (sexe masculí)

L'Hospitalet del Llobregat, 09/05/2024



Dr. J.V. Martinez Mas
Director de Laboratorio

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

Mostra: **Identificació** **ID Ambar** **Tipus de mostra**
PBMCS CAR282-C2 1221800 Extracte DNA

Descripció de l'estudi

L'estudi de consisteix en l'anàlisi de microsatèl·lits o "short tandem repeats" (STR) de DNA procedent determinades línies cel·lulars. El procediment seguit ha estat el següent:

- . PCR - Amplificació de 15 regions de DNA (STR- short tandem repeats) amb els Kit de Genotipat AmpFLSTR® Identifier® Plus PCR Amplification Kit. La combinació d'aquestes 15 regions constitueix el perfil genètic (impressió digital genètica)
- . Electroforesi capil·lar – Lectura del perfil genètic de la mostra.
- . Software d'anàlisi – Assignació del perfil genètic.

Resultats

Marcadors Genètics	Localització cromosòmica	Al·lels mostra 1221800	
D8S1179	8	14	15
D21S11	21q11.2-q21	29	32.2
D7S820	7q11.21-22	9	10
CSF1PO	5q33.3-34	11	11
D3S1358	3p	15	18
TH01	11p15.5	9	9.3
D13S317	13q22-31	8	12
D16S539	16q24-qter	9	9
D2S1338	2q35-37.1	23	24
D19S433	19q12-13.1	12	14
VWA	12p12-pter	16	16
TPOX	2p23-2per	8	8
D18S51	18q21.3	12	20
D5S818	5q21-31	10	12
FGA	4q28	21	21
AMELOGENINA*	X: p22.1-22.3- Y: p11.2	X	X

*Amelogenina: Resultat al·lel relatiu al sexe cromosòmic: XX (sexe femení); XY (sexe masculí)

L'Hospitalet del Llobregat, 17/01/2024



Dr. J.V.Martinez Mas
Director de Laboratorio

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en las PBMC de las que procede.



Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación

RT-PCR SENDAI 2.0

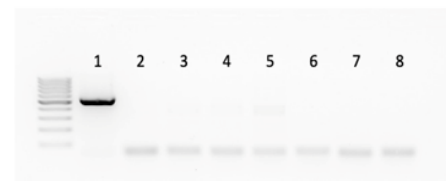
12/02/2024

1. POSITIVE CONTROL
2. ATTR CM PBiPS2_Sv4F-11 p7
3. ATTR CM PBiPS2_Sv4F-13 p6
4. ATTR CM PBiPS2_Sv4F-15 p5
5. ATTR CM PBiPS2_Sv4F-16 p5
6. Sample NO RT
7. NEGATIVE CONTROL
8. H2O

Sev (181 pb)



C- Myc (532 pb)



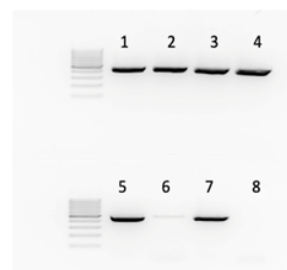
KOS (528 pb)



Klf4 (410 pb)



GAPDH

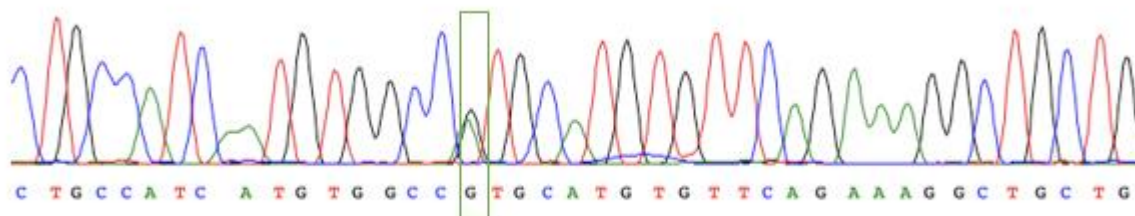


Ausencia de los transgenes de reprogramación. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH



Anexo 6

Comprobación de la presencia de la mutación



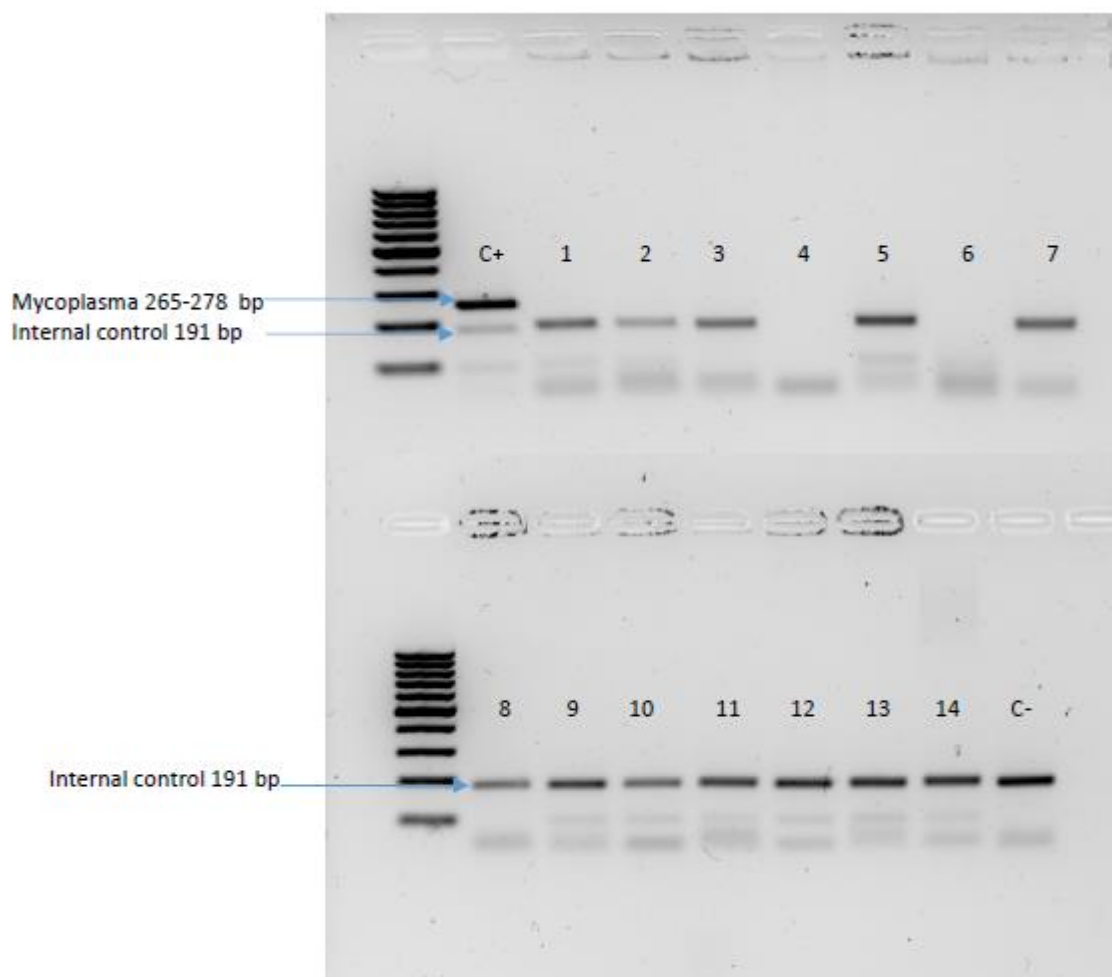
Detection of the mutation in ATTR-CM PBiPS2-Sv4F-16 line. The presence of the c.148G>A mutation in the TTR gene was confirmed by gDNA extraction and Sanger sequencing. Heterozygous mutation, protein variant Val30Met (p.Val50Met). Codon change: GTG>ATG.



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 03/04/2024



8. ATTR CM PBiPS2-Sv4F-16 p7