



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **ATTR CM PBiPS6-Sv4F-10** 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

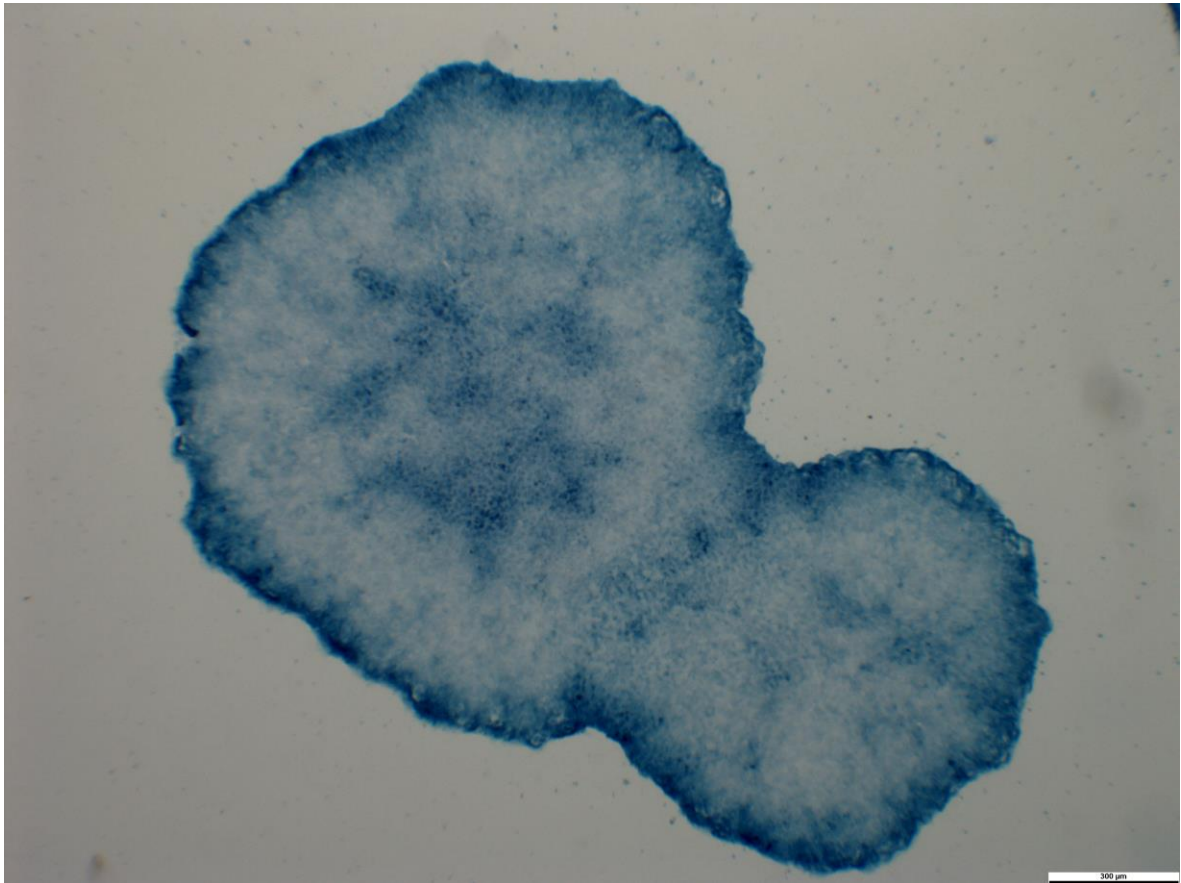
Anexo 6: Comprobación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

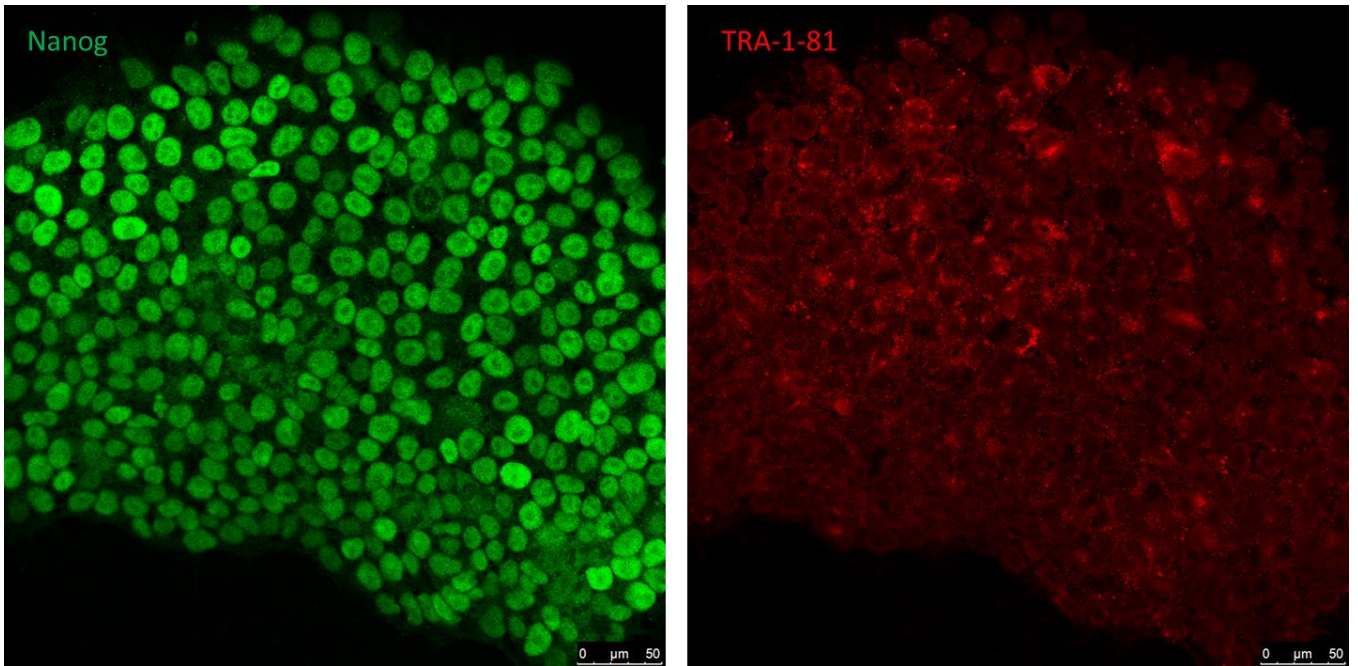


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

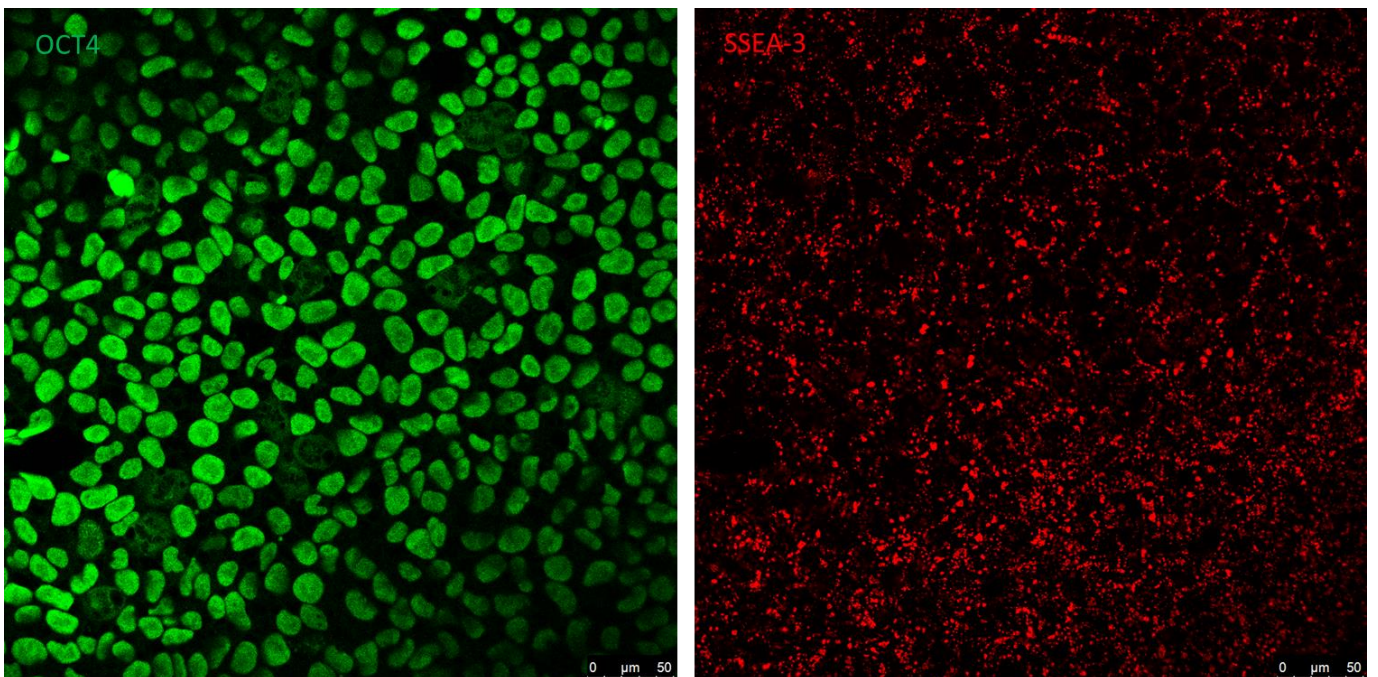


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



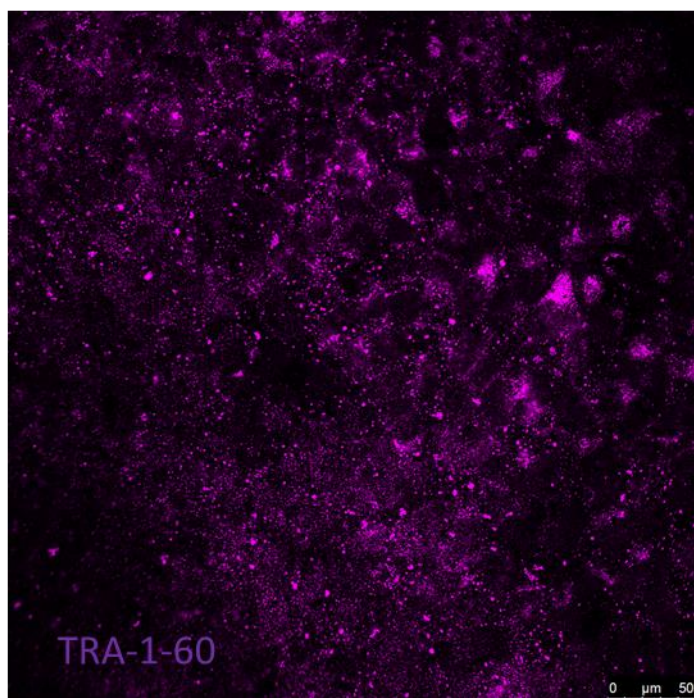
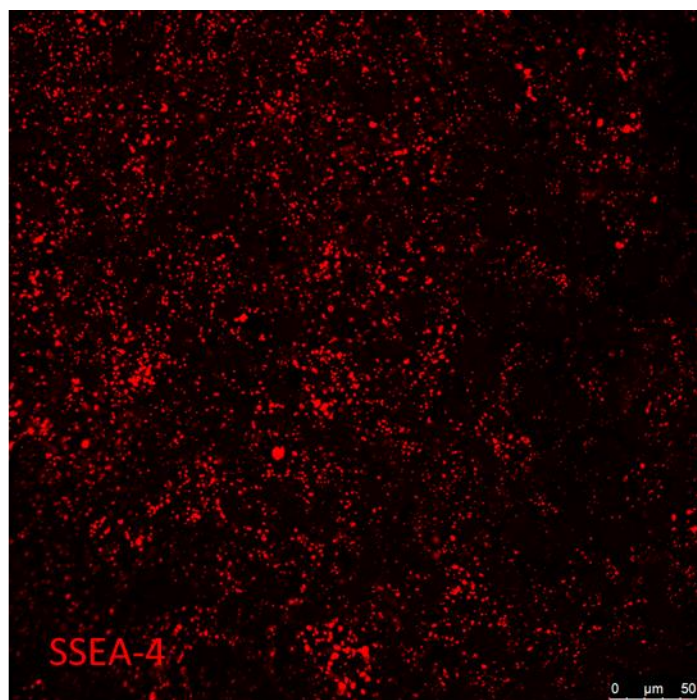
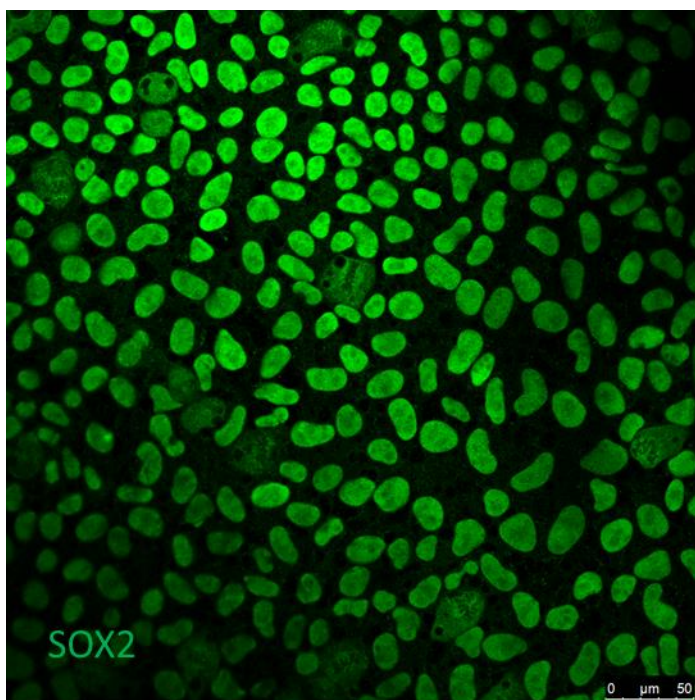
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



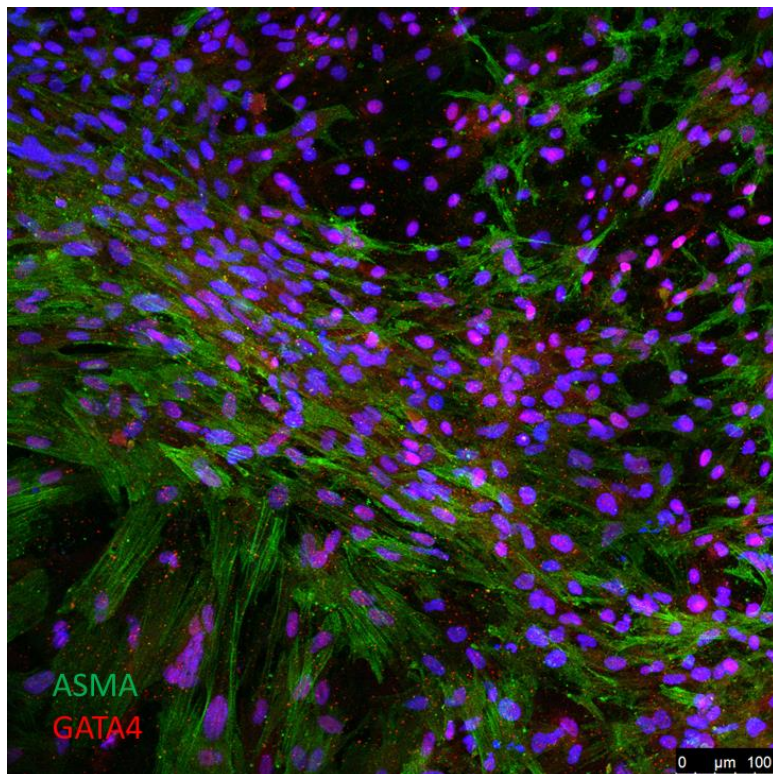
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

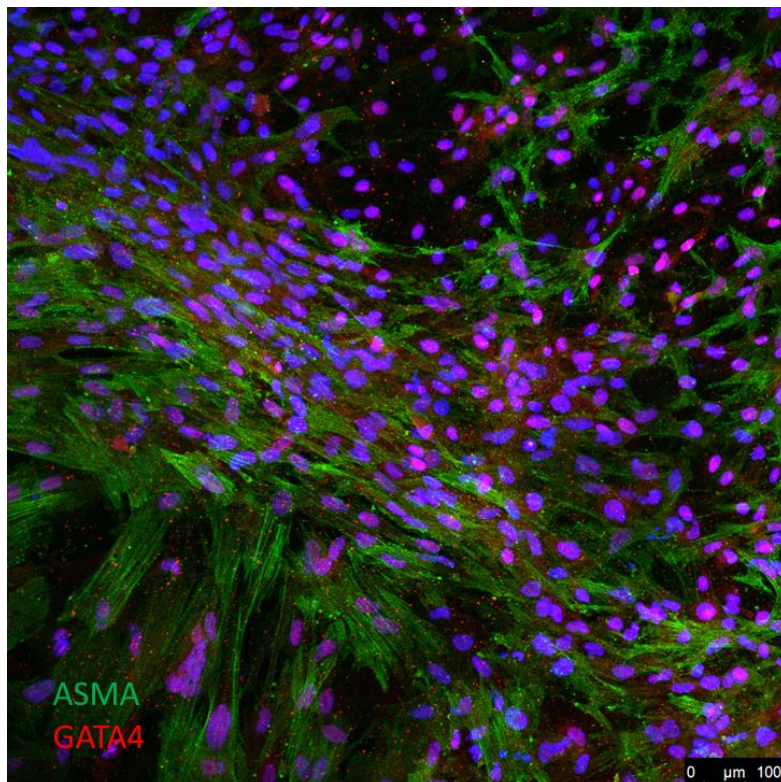


Anexo 2

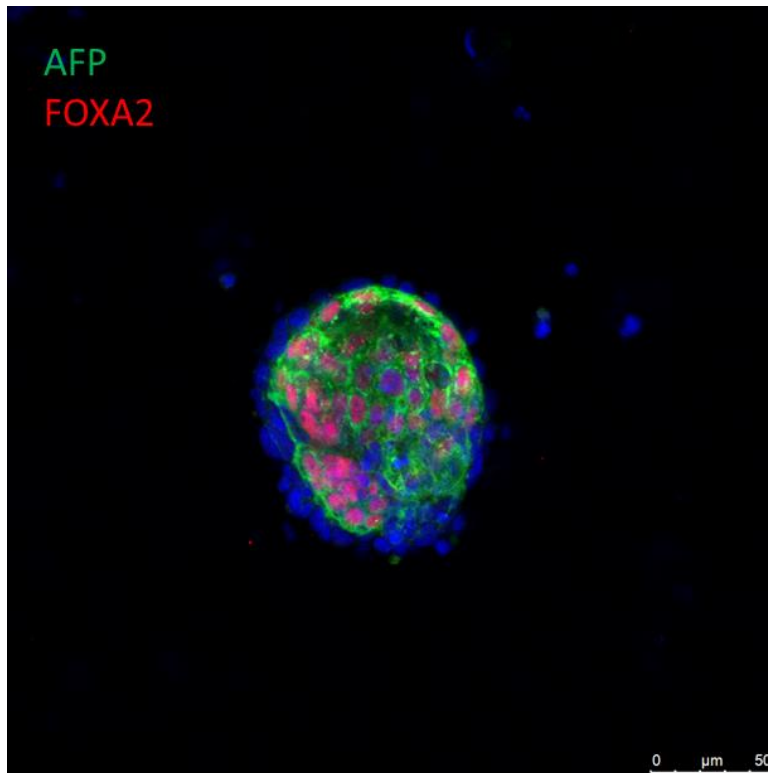
Diferenciación *in vitro*



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: 42360473

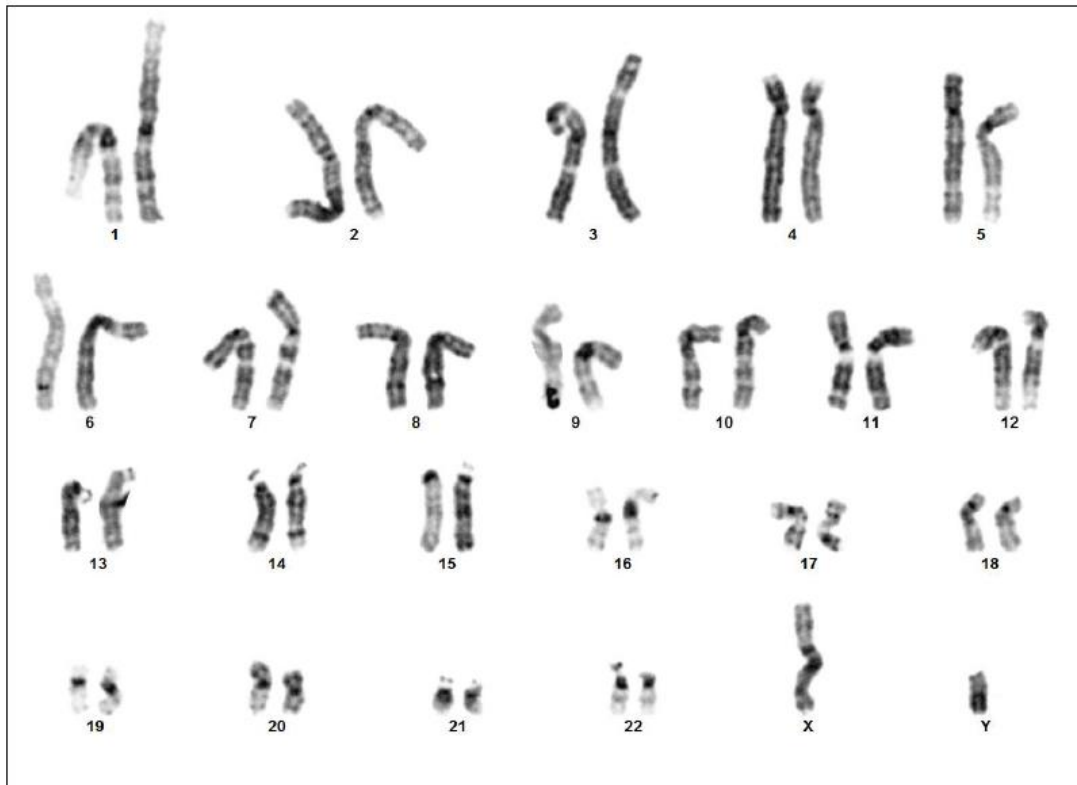
Department: IDIBELL

Name: ATTR CM-PBiPS6-Sv4F-10 p10

Date: 9/10/2024

NHC: CT0884

Sample: CM



Case: 42360473 Slide: 2 Cell: 6F

Result: 46,XY



Anexo 4

Resultado microsátélites

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

<u>Mostra:</u>	<u>Identificació</u> ATTR CM PBIPS6-SV4F-10 P12	<u>ID Ambar</u> 1335140	<u>Tipus de mostra</u> Extracte DNA
----------------	--	----------------------------	--

Descripció de l'estudi

L'estudi de consisteix en l'anàlisi de microsatèl·lits o "short tandem repeats" (STR) de DNA procedent de 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® Identifiler® 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 1335140	
D8S1179	8	13	15
D21S11	21q11.2-q21	28	29
D7S820	7q11.21-22	10	11
CSF1PO	5q33.3-34	10	13
D3S1358	3p	15	17
TH01	11p15.5	8	9,3
D13S317	13q22-31	10	12
D16S539	16q24-qter	9	9
D2S1338	2q35-37.1	22	23
D19S433	19q12-13.1	14	15
VWA	12p12-pter	14	16
TPOX	2p23-2per	8	8
D18S51	18q21.3	12	15
D5S818	5q21-31	11	13
FGA	4q28	21	24
AMELOGENINA*	X: p22.1-22.3- Y: p11.2	X	Y

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

L'Hospitalet del Llobregat, 05/11/2024

Dr. J.V.Martinez Mas
Director de Laboratorio

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

Mostra: Identificació PB2174879, 28.05.2024 ID Ambar 1335119 Tipus de mostra Extracte DNA

Descripció de l'estudi

L'estudi de consisteix en l'anàlisi de microsatèl·lits o "short tandem repeats" (STR) de DNA procedent de 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 1335119	
D8S1179	8	13	15
D21S11	21q11.2-q21	28	29
D7S820	7q11.21-22	10	11
CSF1PO	5q33.3-34	10	13
D3S1358	3p	15	17
TH01	11p15.5	8	9,3
D13S317	13q22-31	10	12
D16S539	16q24-qter	9	9
D2S1338	2q35-37.1	22	23
D19S433	19q12-13.1	14	15
VWA	12p12-pter	14	16
TPOX	2p23-2per	8	8
D18S51	18q21.3	12	15
D5S818	5q21-31	11	13
FGA	4q28	21	24
AMELOGENINA*	X: p22.1-22.3- Y: p11.2	X	Y

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

L'Hospitalet del Llobregat, 14/06/2024



Dr. J.V.Martínez Mas
Director de Laboratorio

Anàlisi de microsatèl·lits en la línia de hiPSC y en los fibroblastos de los que procede.



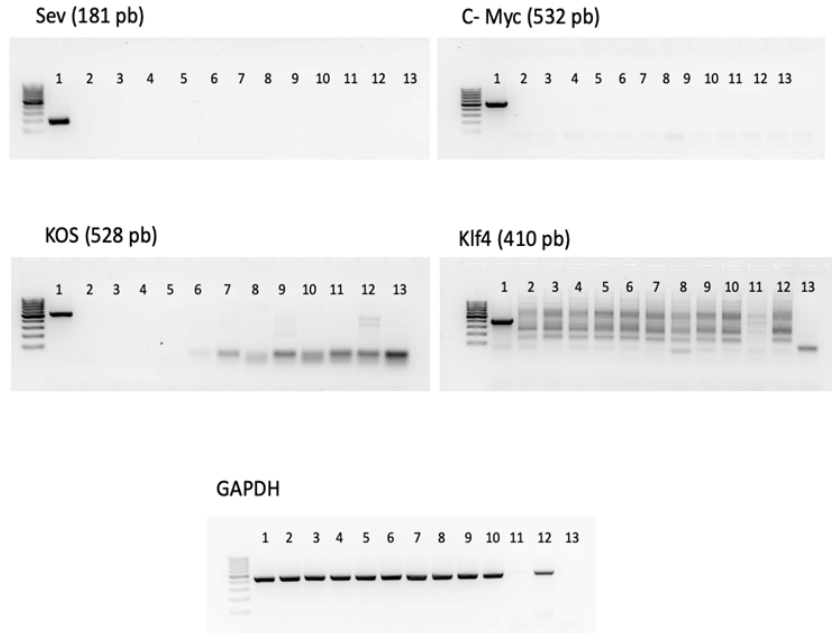
Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación

RT-PCR SENDAI 2.0

08/08/2024

1. POSITIVE CONTROL
2. ATTR-CM PBiPS5 Sv4F-2, p8, 02.08.24
3. ATTR-CM PBiPS5 Sv4F-3, p9, 01.08.24
4. ATTR-CM PBiPS5 Sv4F-5, p8, 31.07.24
5. ATTR-CM PBiPS5 Sv4F-6, p7, 24.07.24
6. ATTR-CM PBiPS6 Sv4F-4, p7, 22.07.24
7. ATTR-CM PBiPS6 Sv4F-7, p7, 26.07.24
8. ATTR-CM PBiPS6 Sv4F-8, p7, 22.07.24
9. ATTR-CM PBiPS6 Sv4F-10, p8, 02.08.24
10. S PBiPS1919-Sv4F-14, p13, 22.07.24
11. Sample NO RT
12. NEGATIVE CONTROL
13. H2O

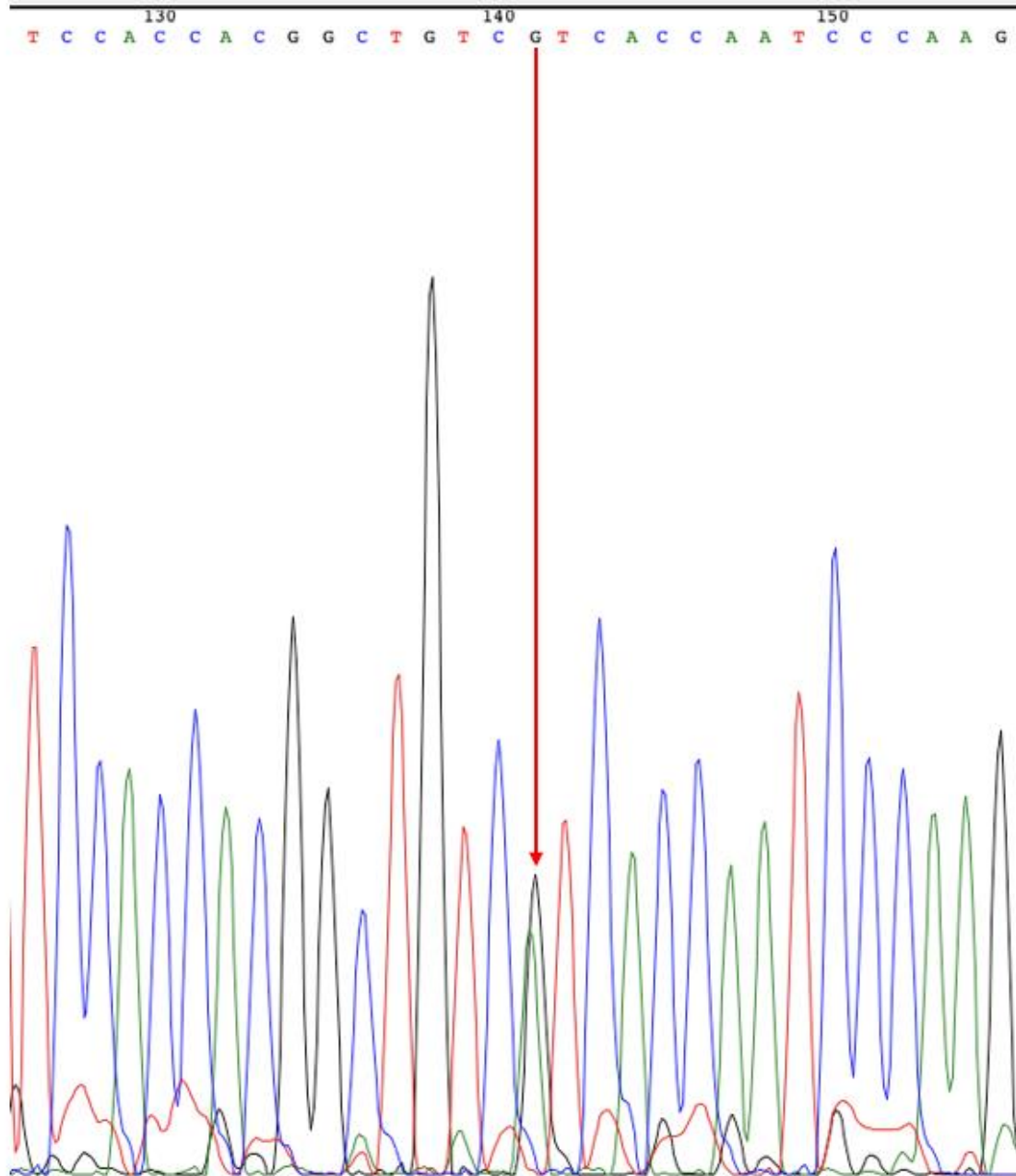


Ausencia de los transgenes de reprogramación. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH



Anexo 6

Comprobación de la presencia de la mutación



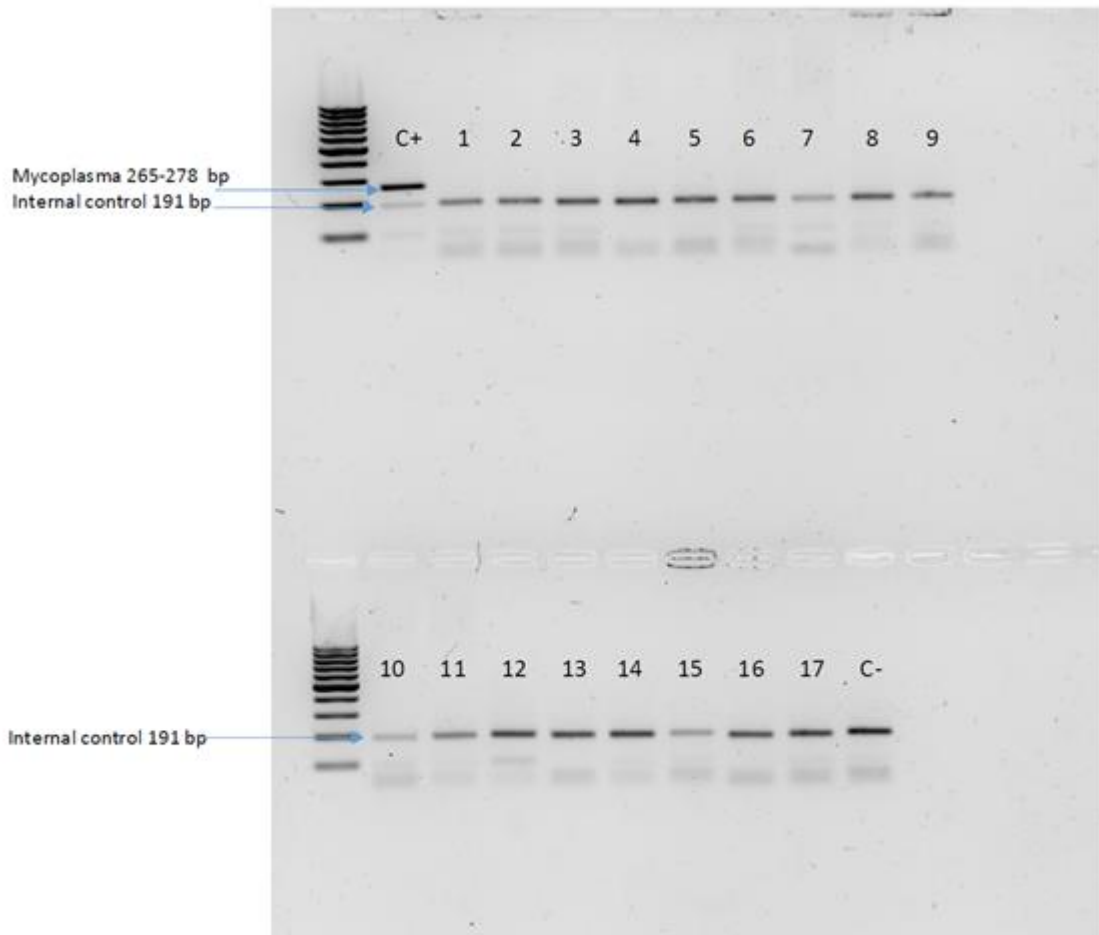
Detection of the mutation in ATTR-CM PBiPS6-Sv4F-10 line. The presence of the c.424G>A mutation in the TTR gene was confirmed by gDNA extraction and Sanger sequencing. Heterozygous mutation, protein variant Val122Ile (p.Val142Ile). Codon change: GTC>ATC (Exon 4).



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 02/10/2024



- 8. ATTR CM PBiPS6_Sv4F_10 p10
- 9. ATTR CM PBiPS5_Sv4F-3 p12