



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR **WFS1 FiPS 04-Ep6F-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

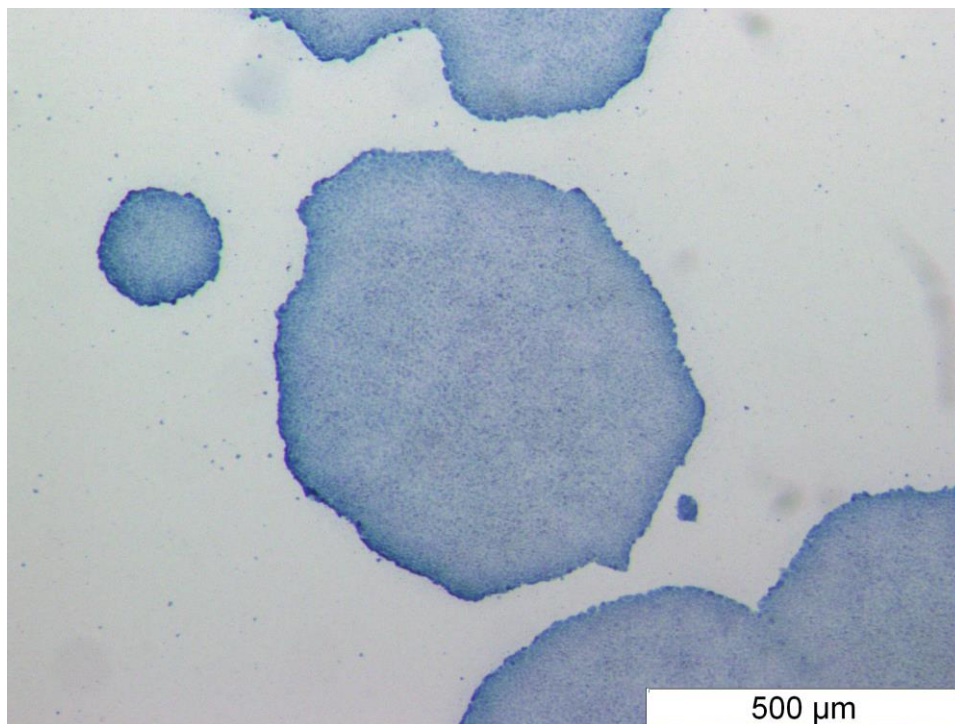
Anexo 6: Comprobación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

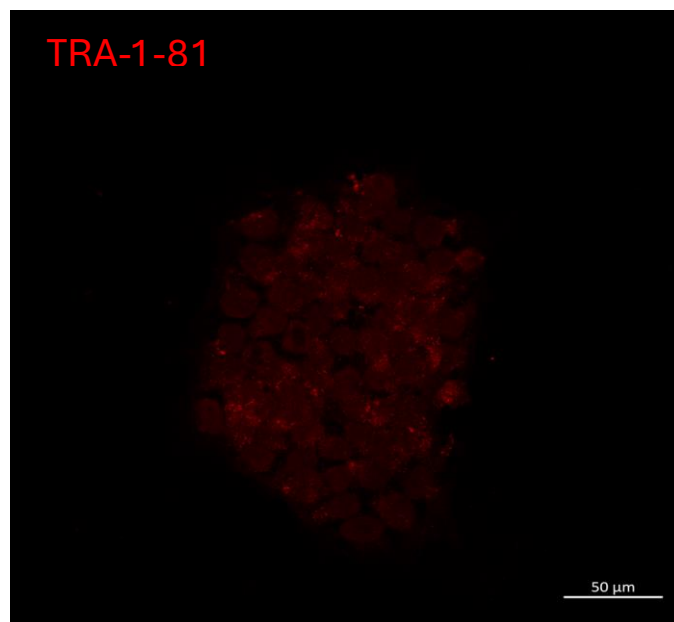
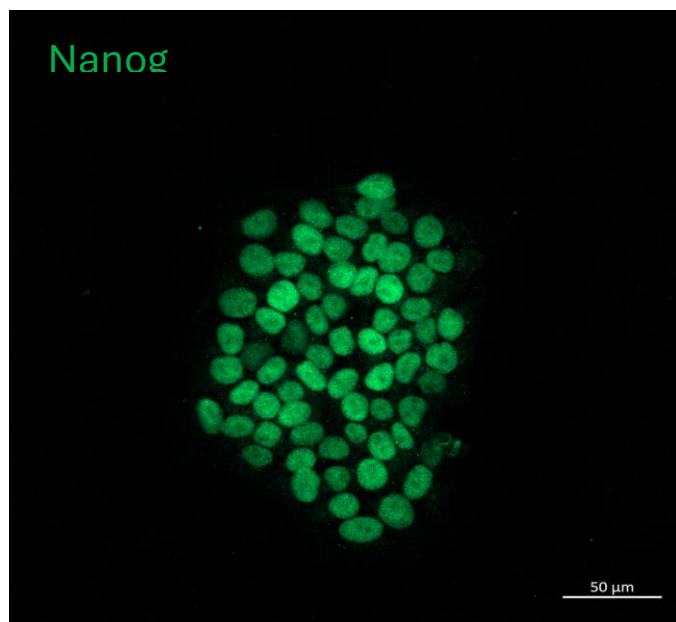


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

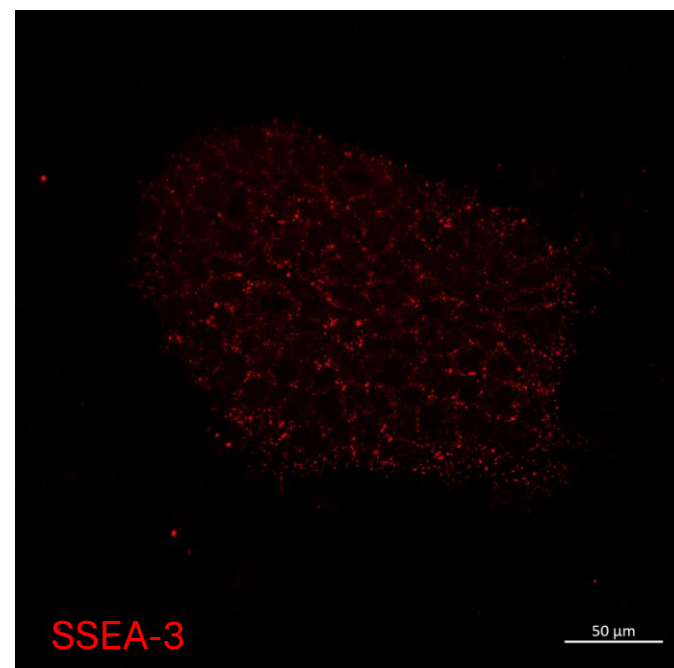
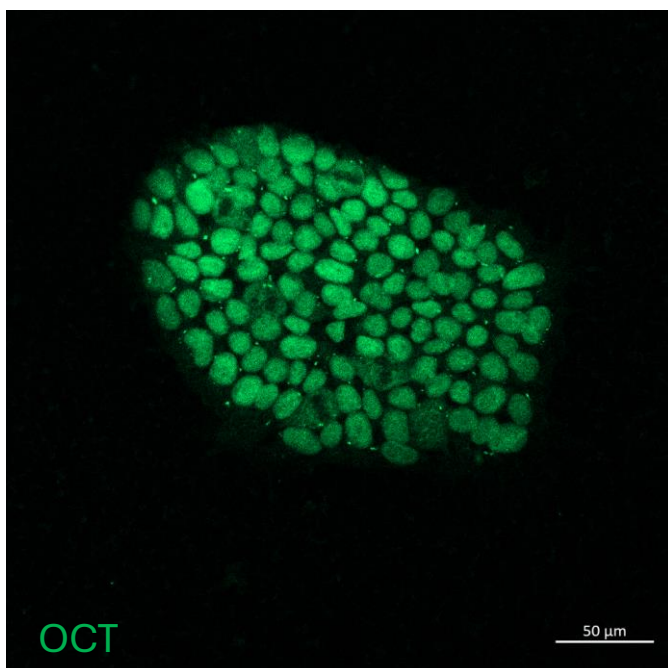


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



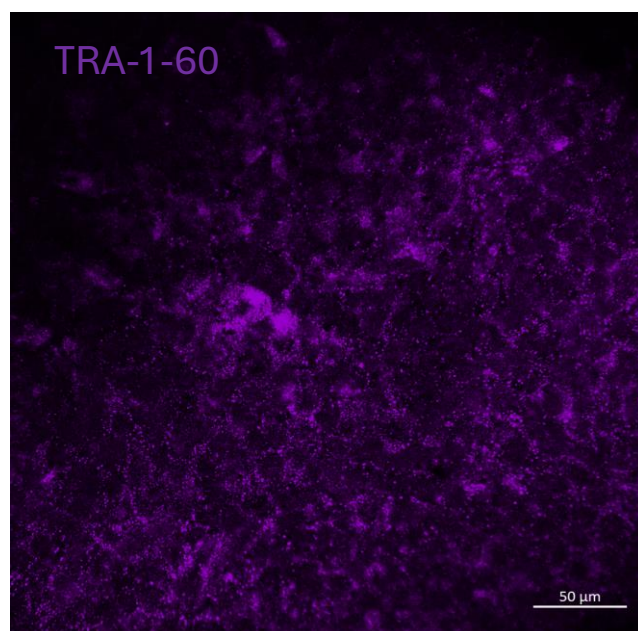
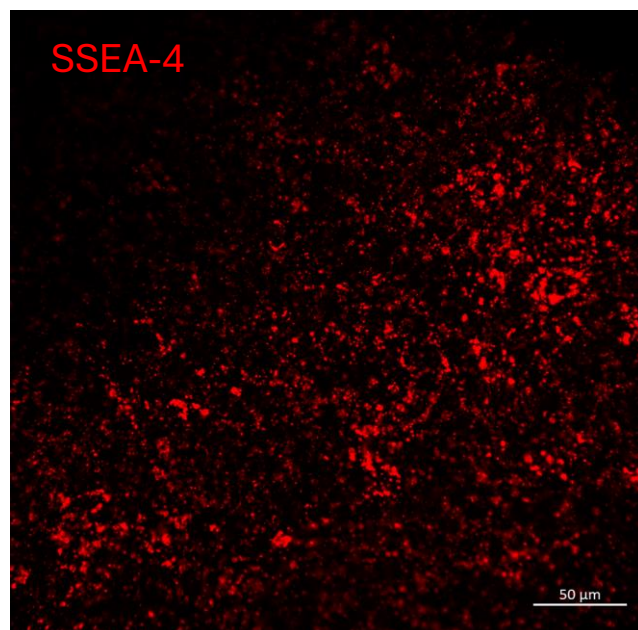
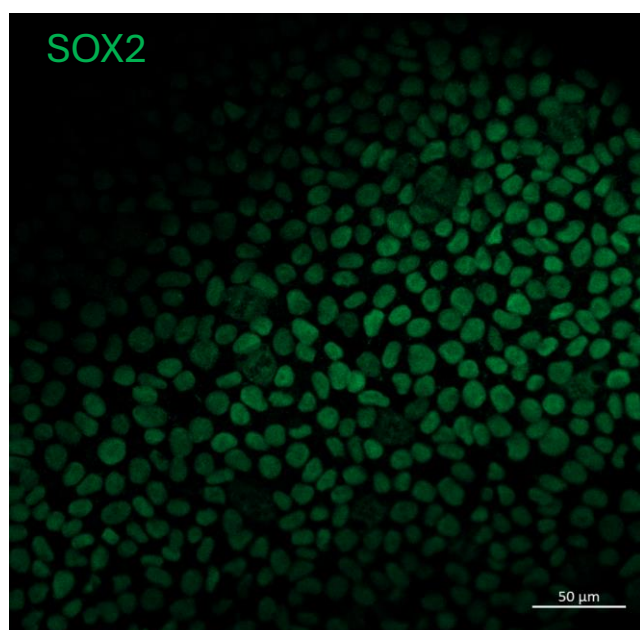
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



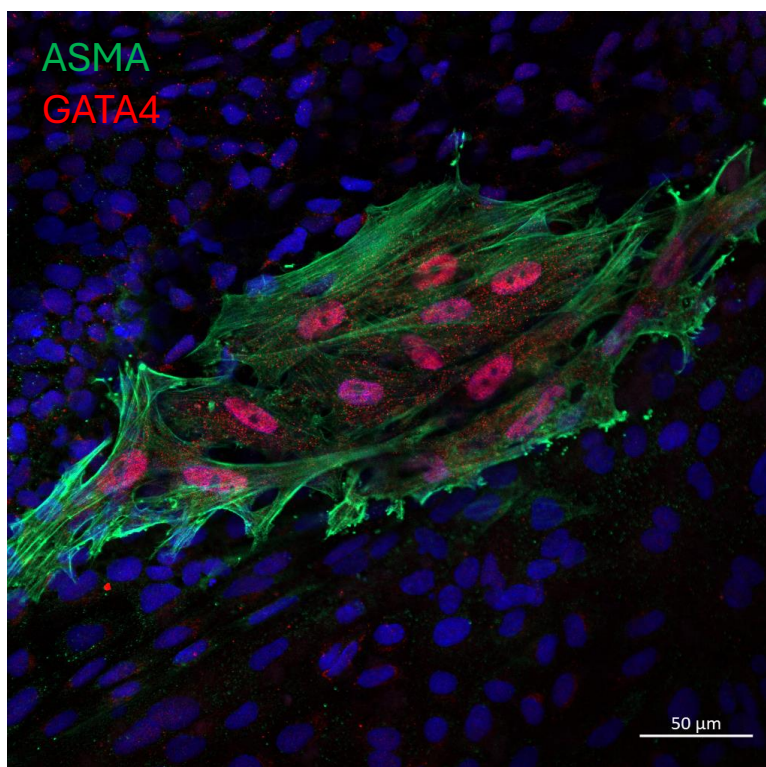
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

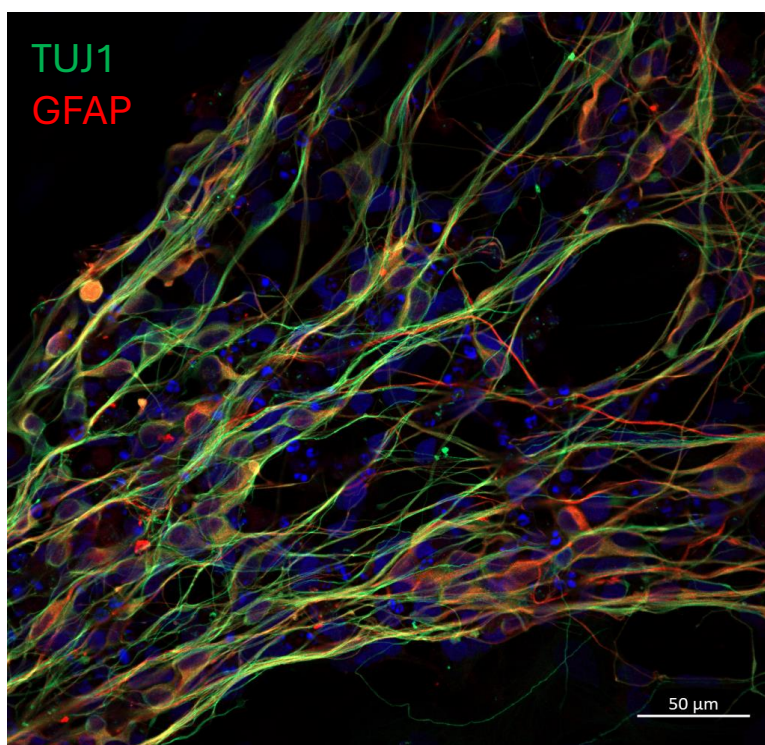


Anexo 2

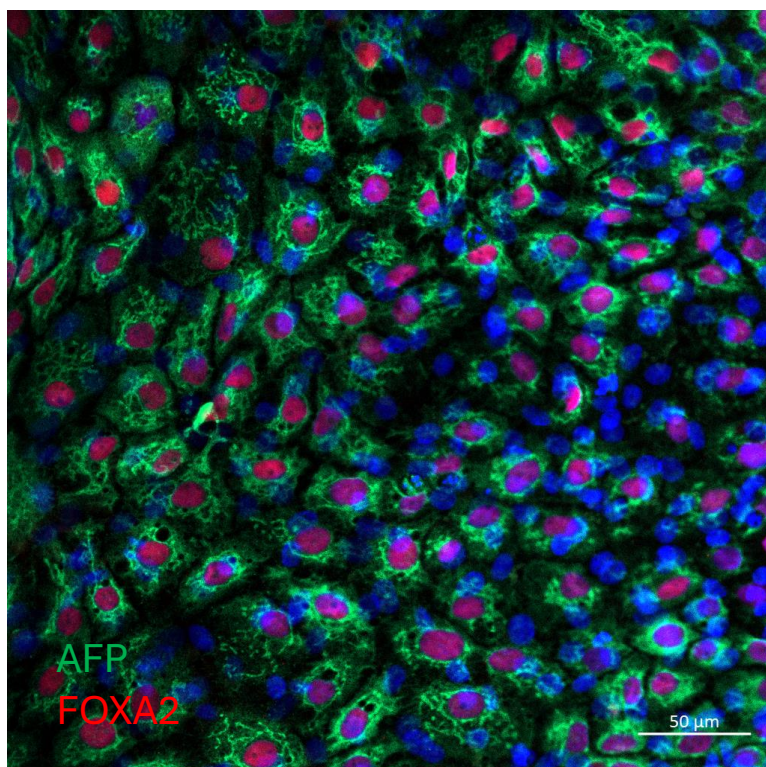
Diferenciación *in vitro*



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: 31730456

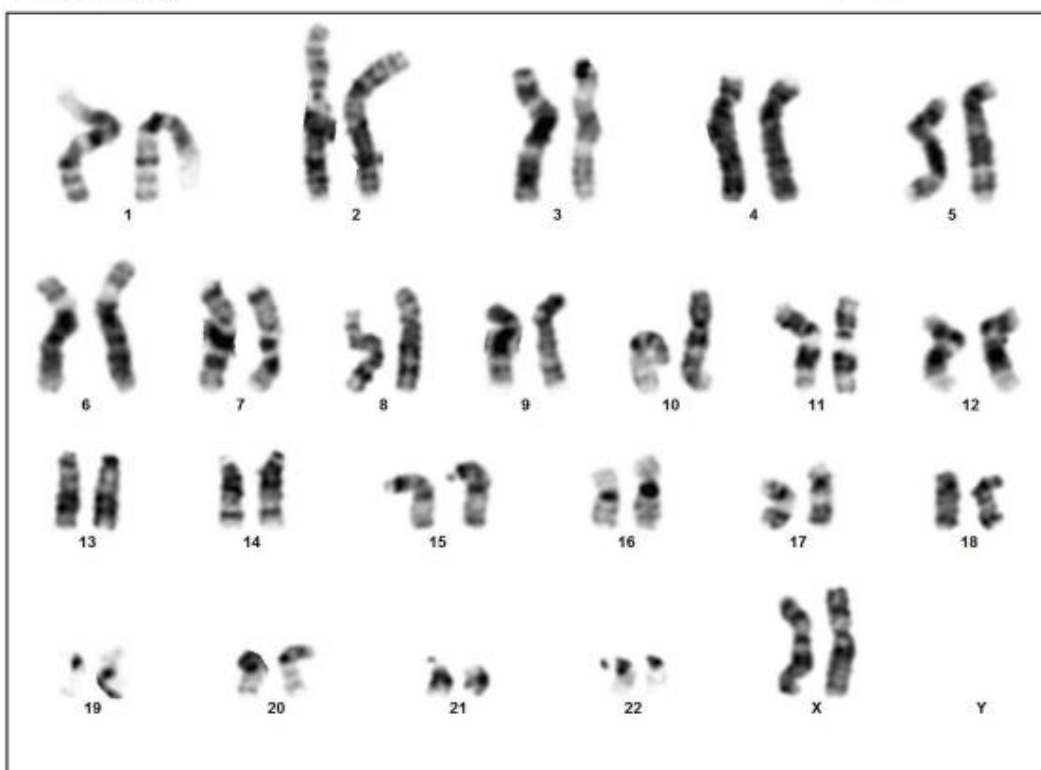
Name: WFS1 FiPS04-Ep6F-10 p10

NHC: CT0623

Department:

Date: 7/5/2023

Sample: CM



Case: 31730456 Slide: 3 Cell: 4

Result: 46,XX



Anexo 4

Resultado microsatelites

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

Mostra:	Identificació	ID Ambar	Tipus de mostra
	WFS1 FIPS04-EP6F-10 P13	1221768	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 1221768	
D8S1179	8	12	12
D21S11	21q11.2-q21	31	32,2
D7S820	7q11.21-22	9	9
CSF1PO	5q33.3-34	10	12
D3S1358	3p	16	17
TH01	11p15.5	9	9,3
D13S317	13q22-31	10	13
D16S539	16q24-qter	9	12
D2S1338	2q35-37.1	23	25
D19S433	19q12-13.1	12	15
VWA	12p12-pter	15	18
TPOX	2p23-2per	8	11
D18S51	18q21.3	14	16
D5S818	5q21-31	11	13
FGA	4q28	22	22,2
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, 29/08/2023



Dr. J.V.Martinez Mas
Director de Laboratorio

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
Fb CBK21904, P5, 28.02.23	9; 9.3	31; 32.2	11; 13	10; 13	9	9, 12	10; 12	X	15; 18	8; 11

Barcelona, a 27 de abril de 2023

Laboratorio Biología Molecular

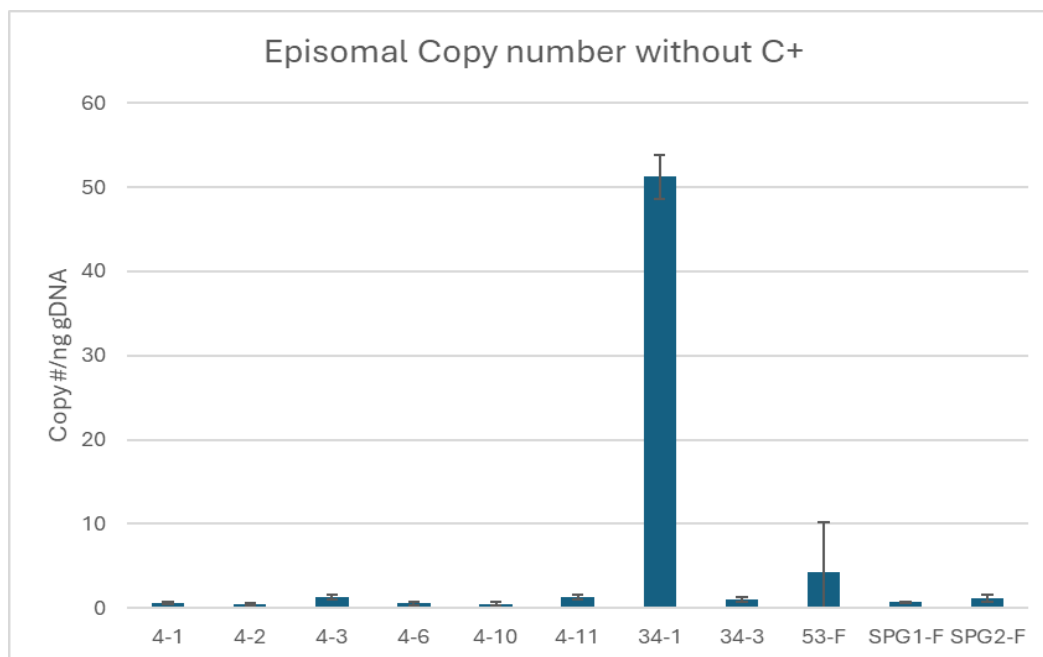
P-CMRC

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

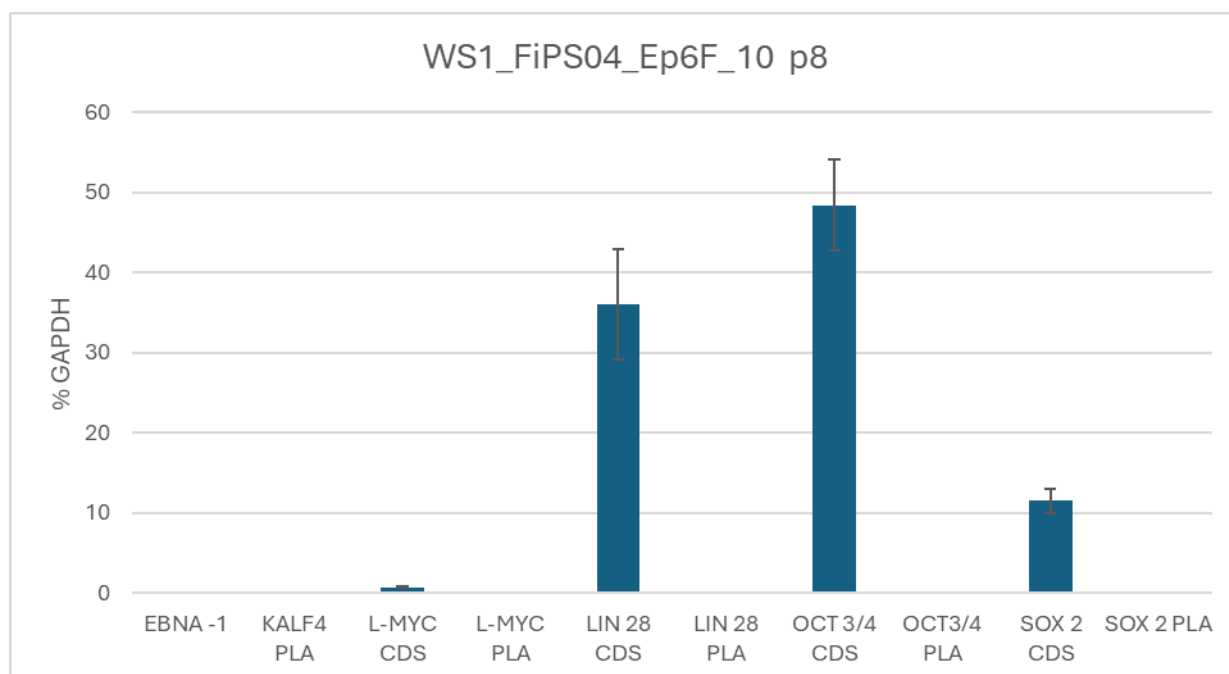


Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación



QRT-PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC (4-10 corresponde a la abreviación de WFS1 FiPS04-Ep6F-10) y en fibroblastos control no-nucleofectados (**SPG1F** y **SPG2F**).



Niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) en la línea WFS1 FiPS04-Ep6F-10.



Anexo 6

Comprobación de la presencia de la mutación

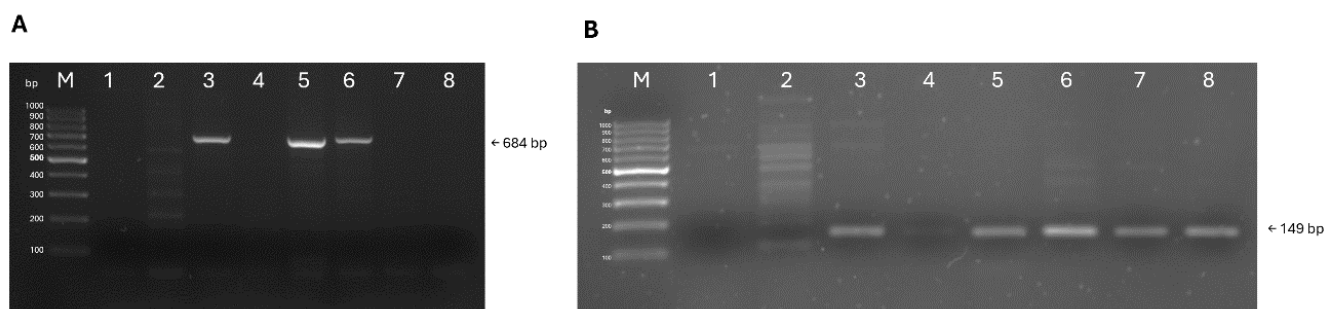


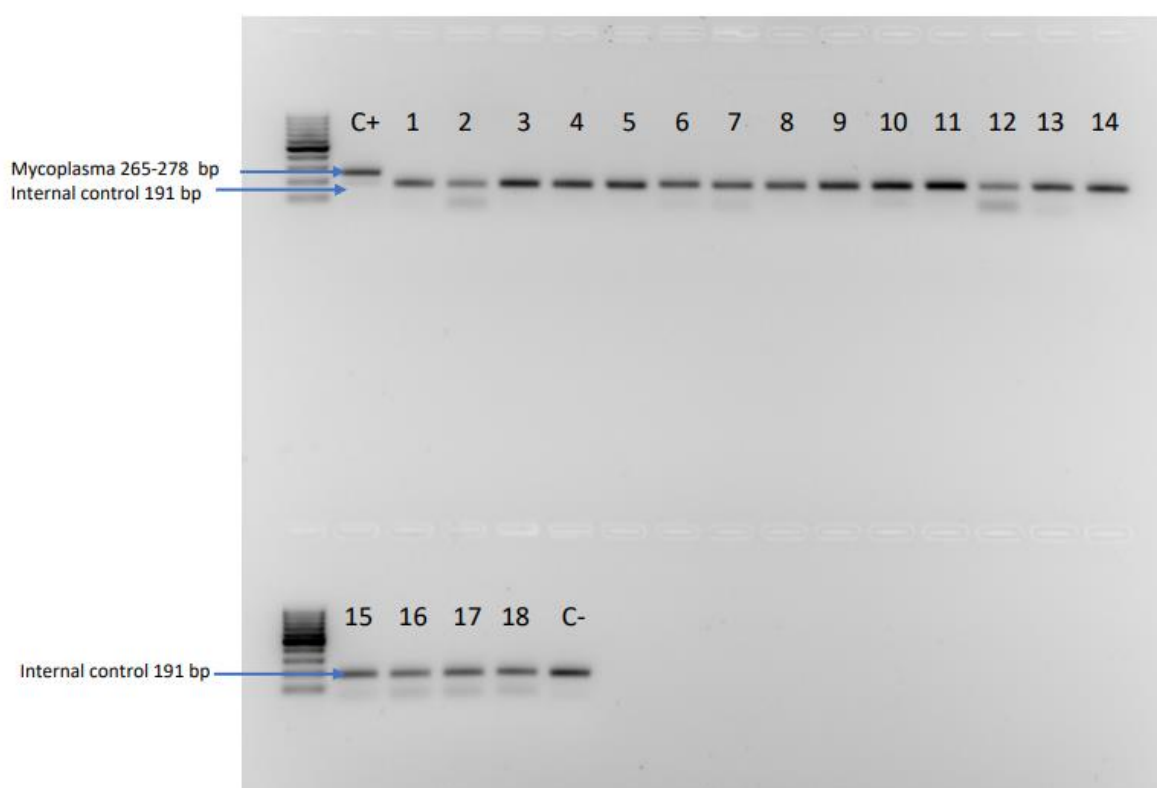
Fig 1. Comprobación por PCR de la presencia de las mutaciones c.1294C>G (p.Leu432Val) y c.1463_1474dup. Geles de electroforesis de productos de PCR obtenidos al amplificar para comprobar si hay presencia de **(A)** la mutación c.1294C>G (p.Leu432Val). Esta mutación se encuentra en la línea de fibroblastos CBK21904 (carril 3) y es mantenida en ambos clones de iPSCs derivados de esta línea, WFS1 FiPS04-Ep6F-03 (carril 5) y WFS1 FiPS04-Ep6F-10 (carril 6). La mutación c.1463_1474dup **(B)** se encuentra presente en la línea de fibroblastos, CBK21904 (carril 3) y por tanto en los clones WFS1 FiPS04-Ep6F-03 (carril 5) y WFS1 FiPS04-Ep6F-10 (carril 6), derivados de la primera. En ambas imágenes los carriles corresponden a las mismas muestras. El carril M es la GeneRuler 100bp DNA Ladder (ThermoFisher), el carril 1 es un blanco y el 2 una muestra de DNA de una línea que no presenta ninguna de estas mutaciones (C-).



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 14/06/2023



- 14. WFS1 FiPS34 Ep6F #3 p9
- 15. WFS1 FiPS04 Ep6F #3 p9
- 16. WFS1 FiPS04 Ep6F #6 p9
- 17. WFS1 FiPS04 Ep6F #10 p9