



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **NDD PBiPS1-Sv4F-1** 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

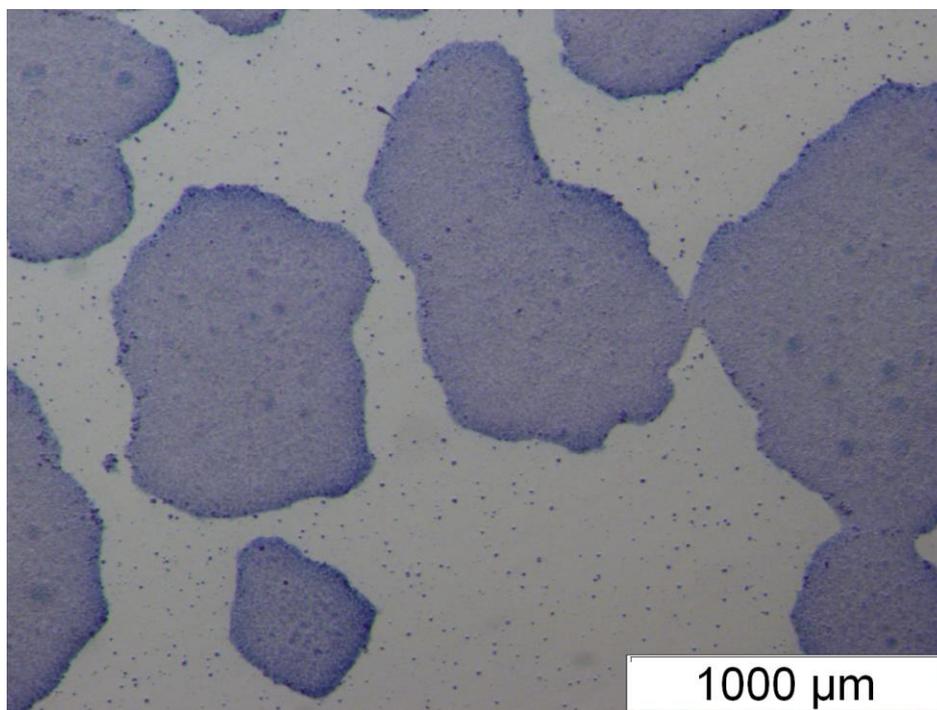
Anexo 6: Comprobación de la presencia de la mutación

Anexo 6: Resultado test de micoplasma

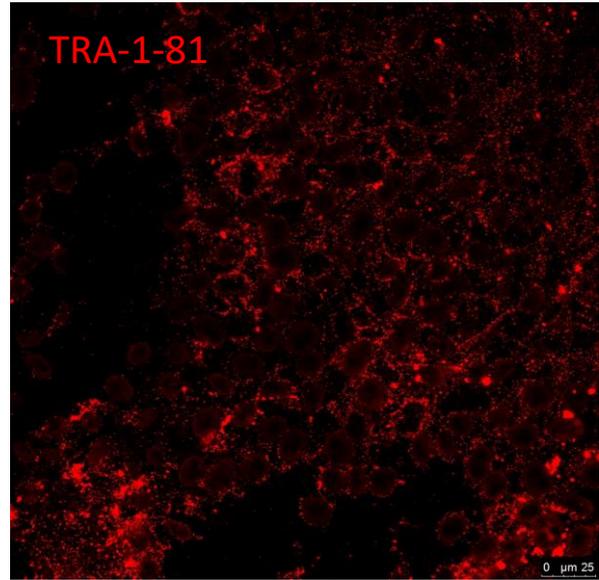
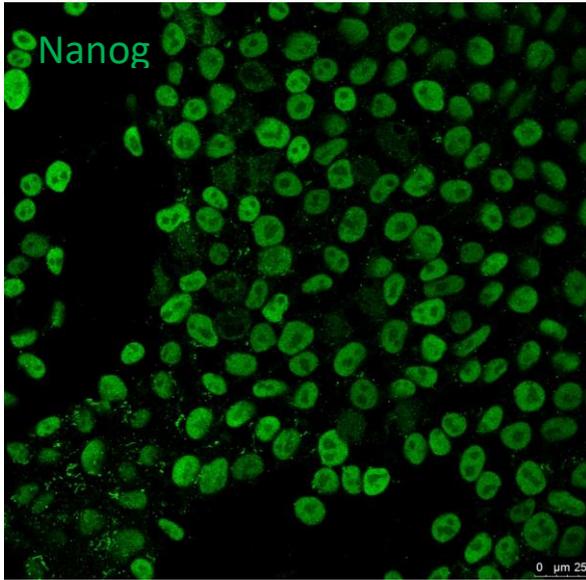


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

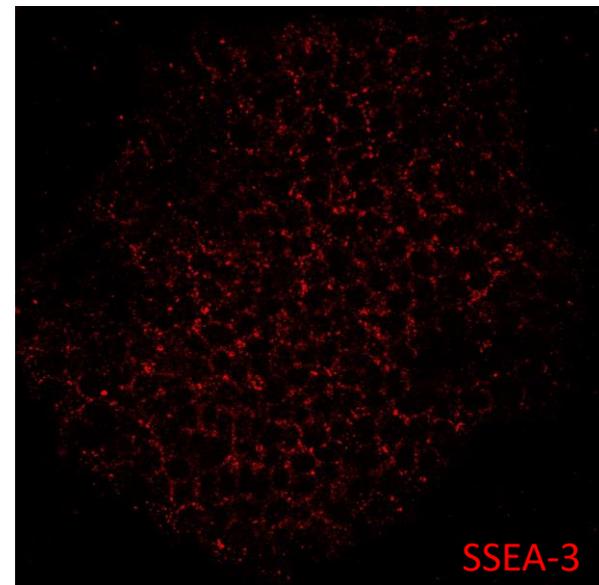
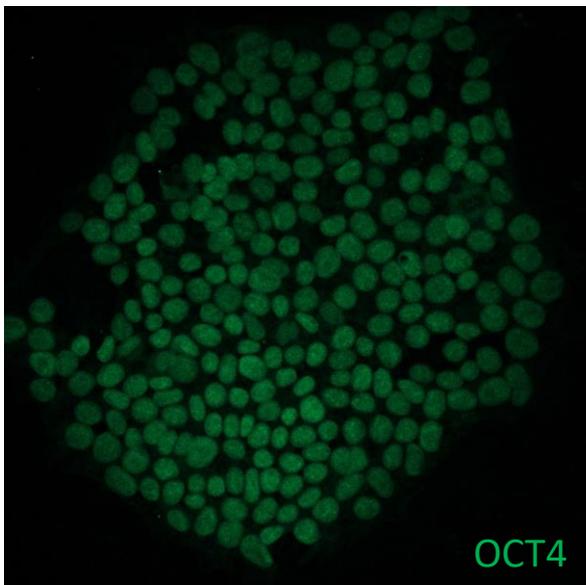


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



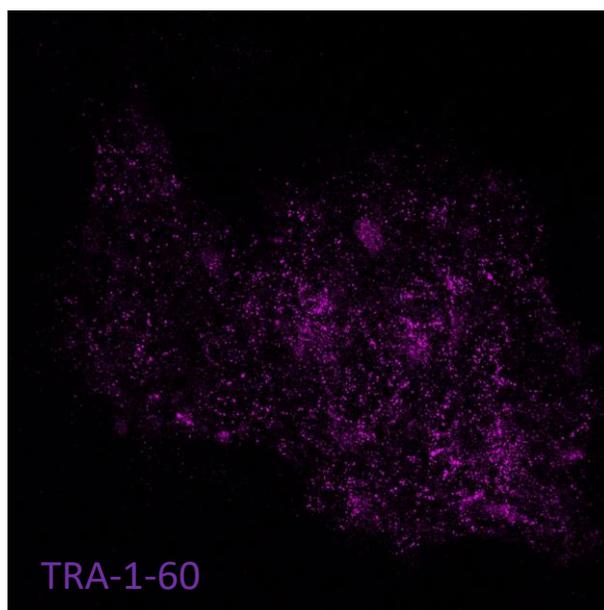
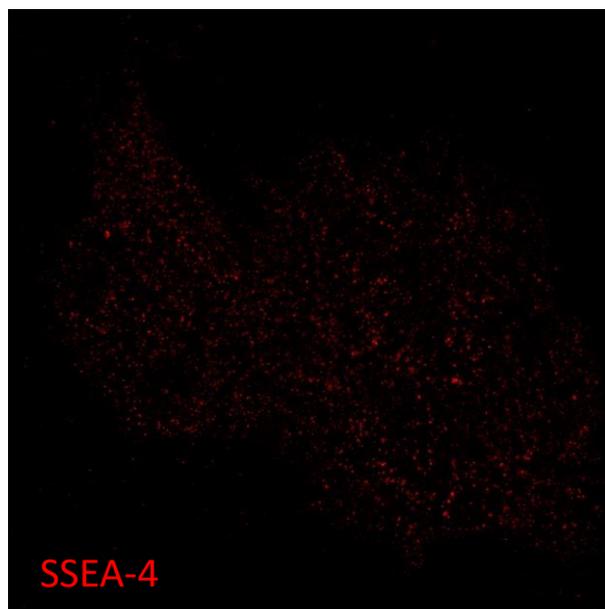
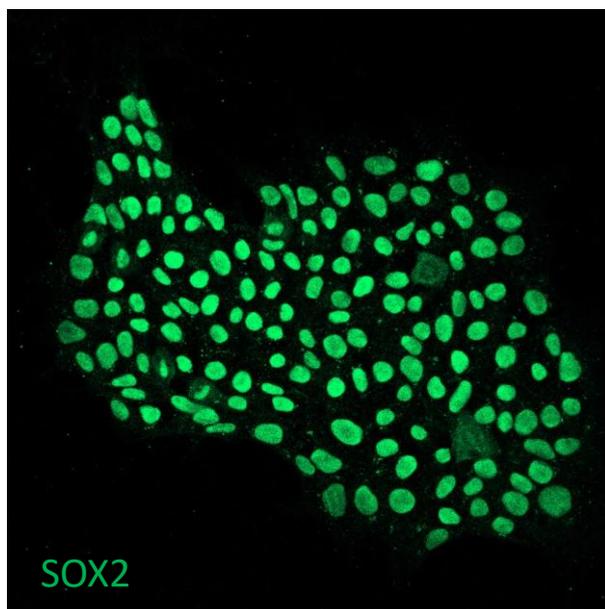
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



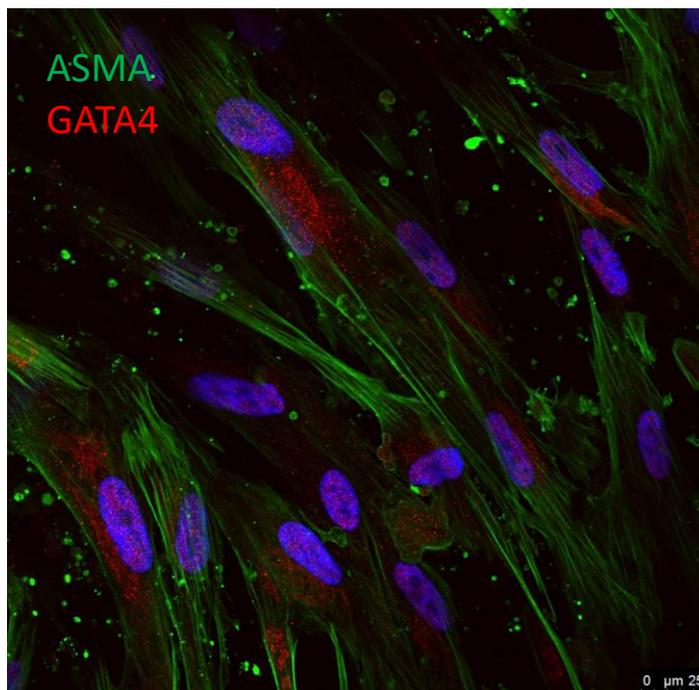
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

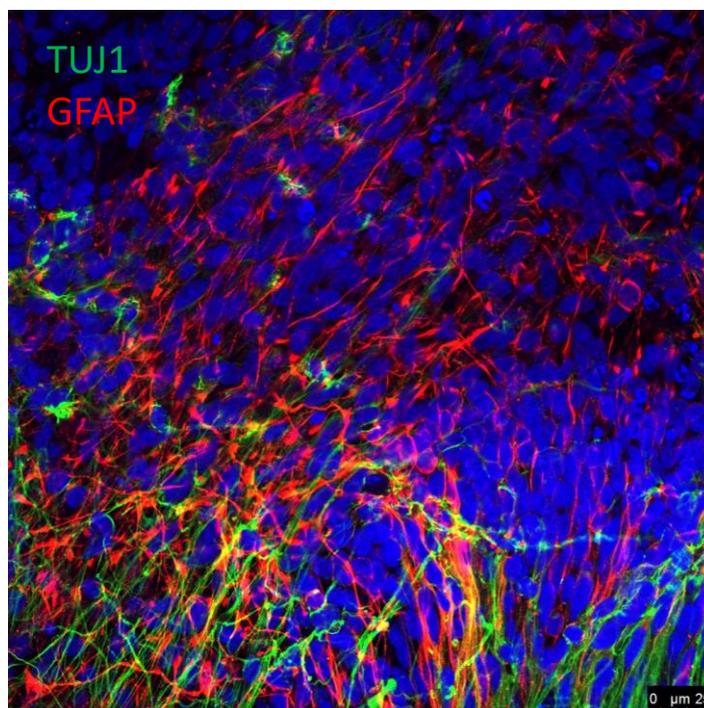


Anexo 2

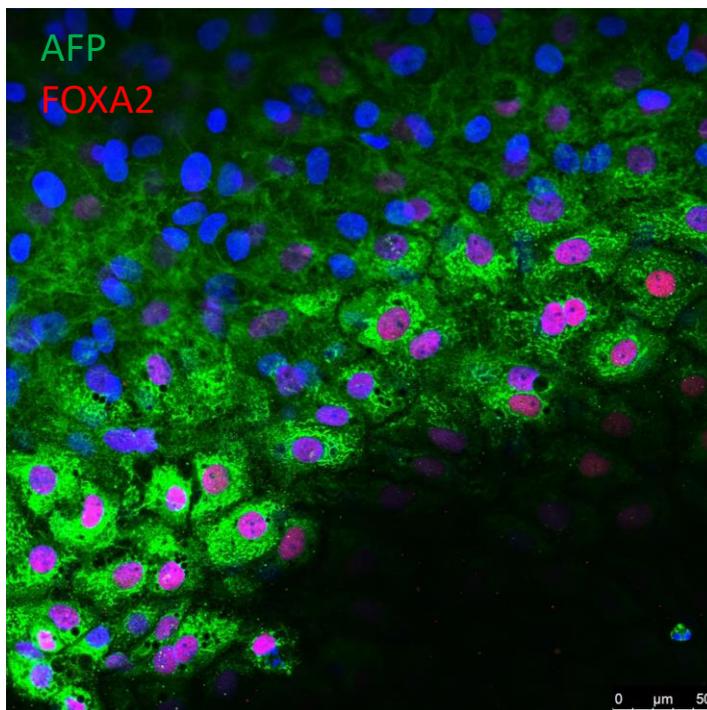
Diferenciación *in vitro*



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: 31380563

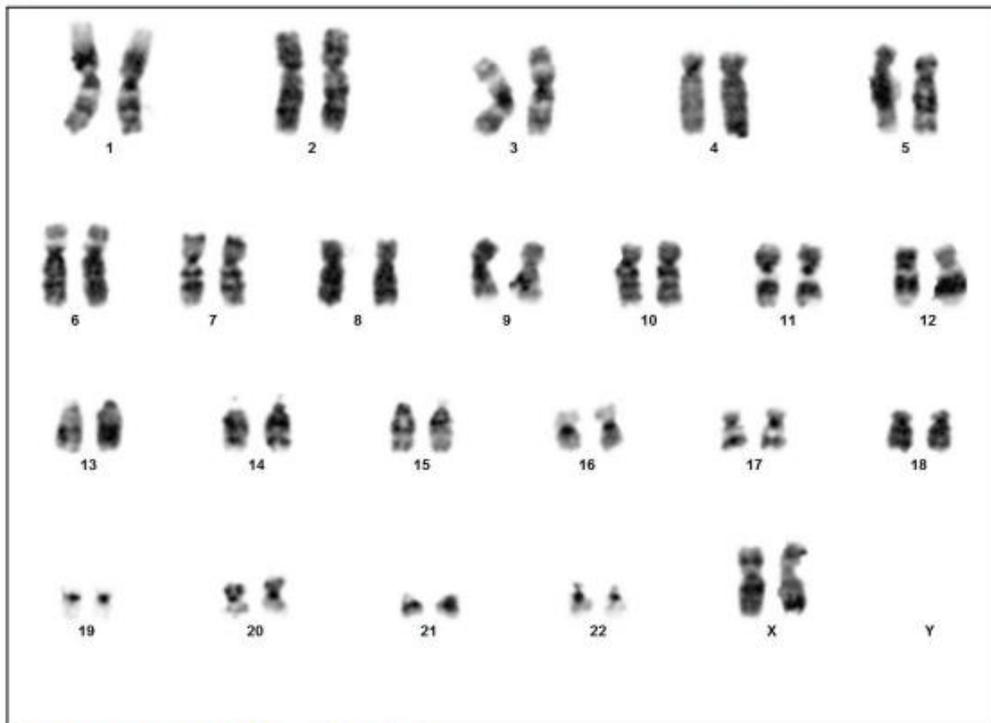
Name: NDD PBiPS1-Sv4F-1

NHC: CT0606

Department: IDIBELL

Date: 6/12/2023

Sample: CM



Case: 31380563 Slide: 2 Cell: 3F

Result: 46,XX



Anexo 4

Resultado microsátélites

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

Mostra:	Identificació NDD1 PBIPS1-SV4F-1 P14	ID Ambar 1221737	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 1221737	
D8S1179	8	14	14
D21S11	21q11.2-q21	31,2	33,2
D7S820	7q11.21-22	8	12
CSF1PO	5q33.3-34	11	12
D3S1358	3p	15	15
TH01	11p15.5	7	7
D13S317	13q22-31	9	10
D16S539	16q24-qter	11	12
D2S1338	2q35-37.1	17	17
D19S433	19q12-13.1	13	15
VWA	12p12-pter	15	16
TPOX	2p23-2per	8	8
D18S51	18q21.3	13	19
D5S818	5q21-31	8	11
FGA	4q28	23	26
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, 04/07/2023



Dr. J.V. Martínez 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
PB_CSB (sangre)	7	31.2; 33.2	8; 11	9; 10	8; 12	11; 12	11;12	X	15; 16	8

Barcelona, a 20 de enero de 2023

Laboratorio Biología Molecular

P-CMRC

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



Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación

RT-PCR SENDAI 2.0
28/04/23

1. PMM2 FB20484 Sv-Inf, 0,5M cells
2. RRMS_PBiPS13_Sv4F_1 p10
3. RRMS_PBiPS13_Sv4F_3 p9
4. NDD_PBiPS1_Sv4F_1 p8
5. NDD_PBiPS1_Sv4F_4 p8
6. NDD_PBiPS1_Sv4F_9 p8
7. NDD_PBiPS1_Sv4F_12 p7
8. NF1_FiPS227_Sv4F_12 p7
9. Sample NO RT
10. NEGATIVE CONTROL
11. H2O

Sev (181 pb)



C- Myc (532 pb)



KOS (528 pb)



Klf4 (410 pb)



GAPDH

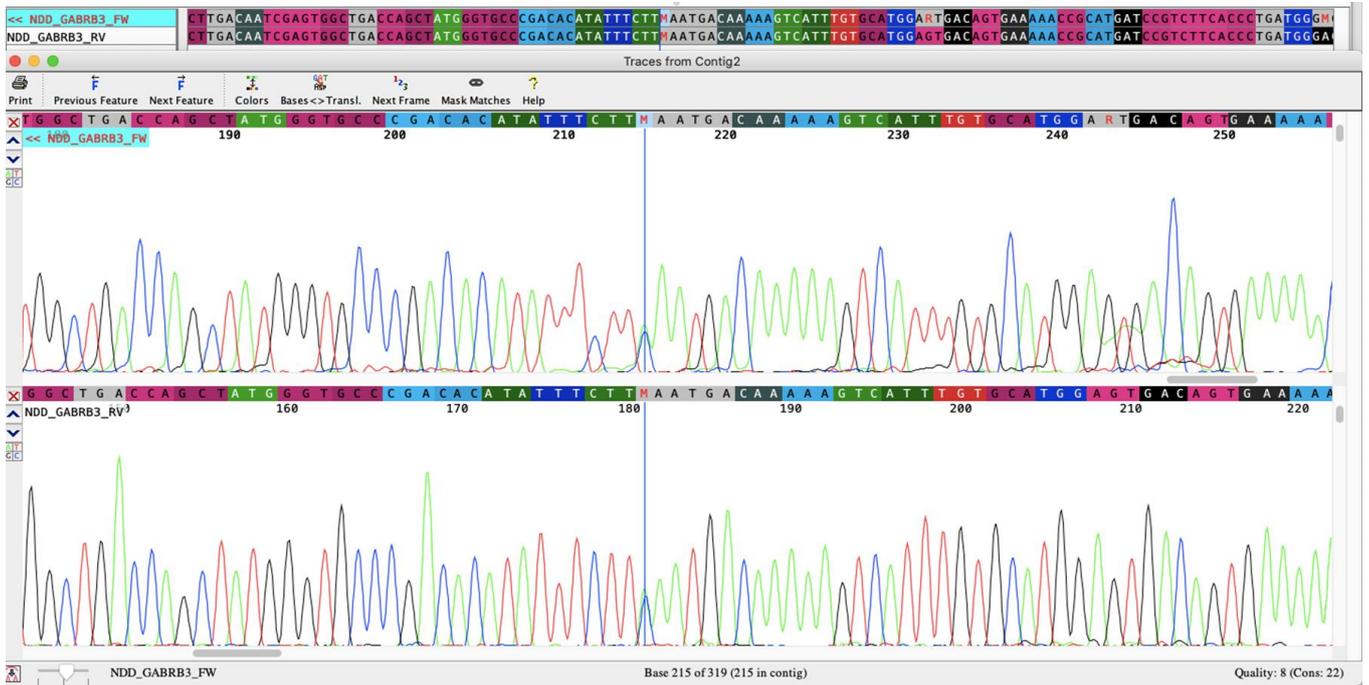


Ausencia de los transgenes de reprogramación. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH



Anexo 6

Comprobación de la presencia de la mutación



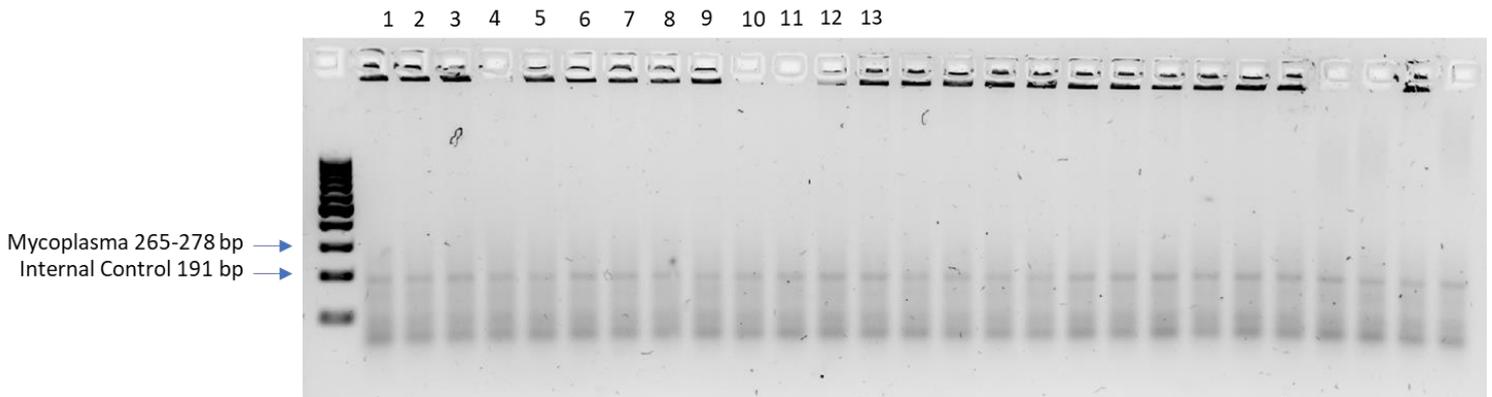
Resultado de la secuenciación de las células de la paciente y de la línea de iPSC generada donde se observa que se mantiene la mutación en heterocigosis.



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

TEST DE MICOPLASMA 20230302



- 1- MICOP 230007
- 2- MICOP 230008
- 3- MICOP 230009
- 4- MICOP 230010: NDD PBiPS1-Sv4F-1
- 5- MICOP 230011
- 6- MICOP 230012
- 7- MICOP 230013
- 8- MICOP 230014
- 9- MICOP 230015
- 10- MICOP 230016