



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR **PKU FiPS81-Sv4F-2** 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

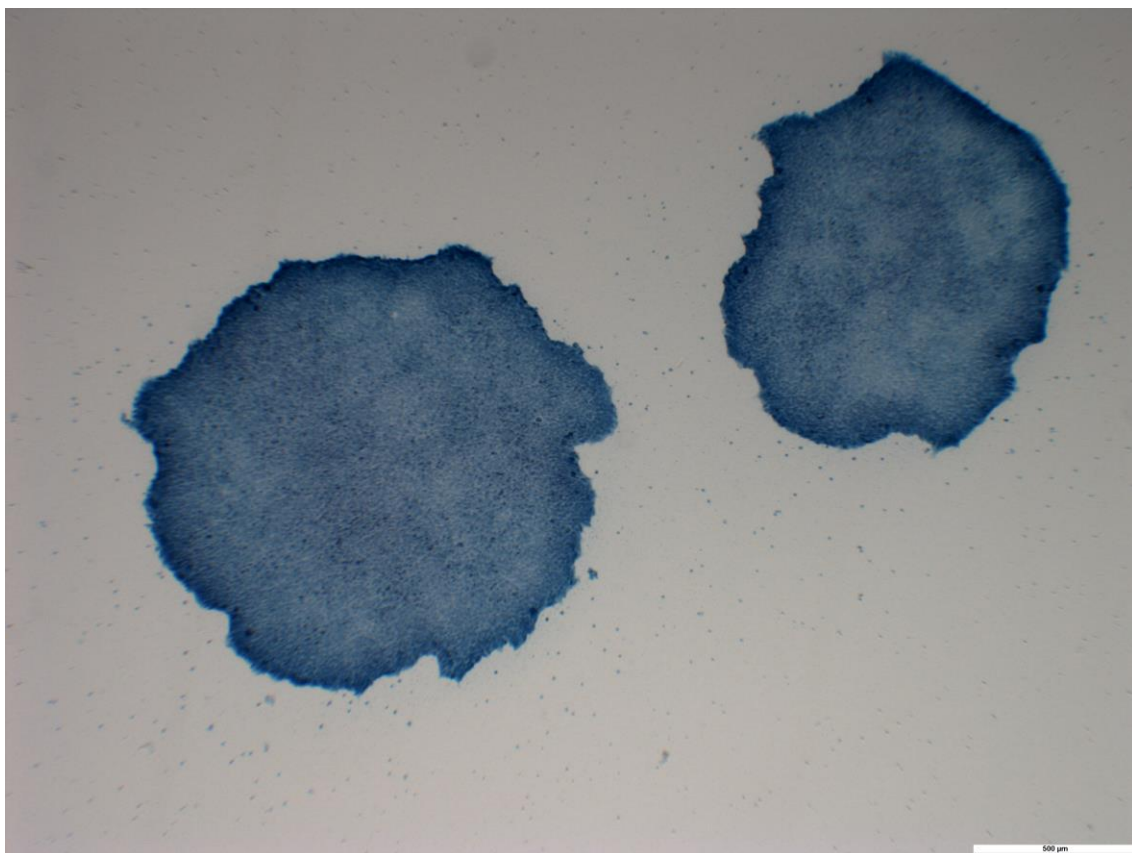
Anexo 6: Comprobación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

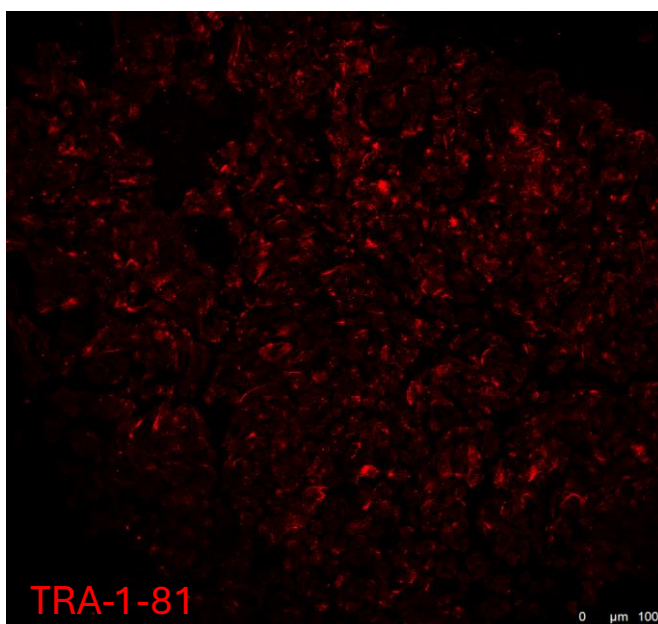
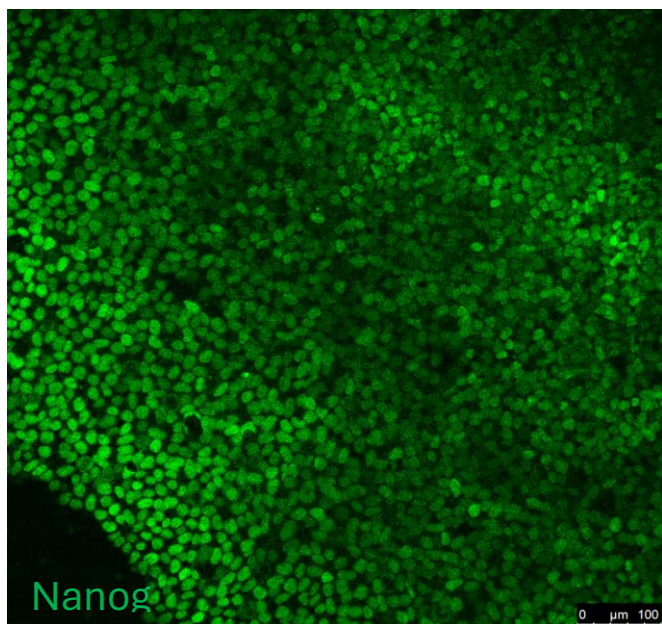


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

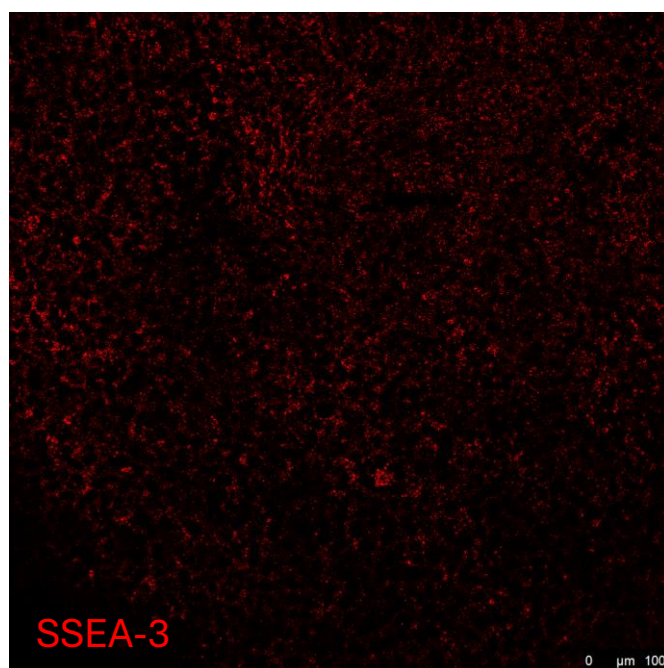
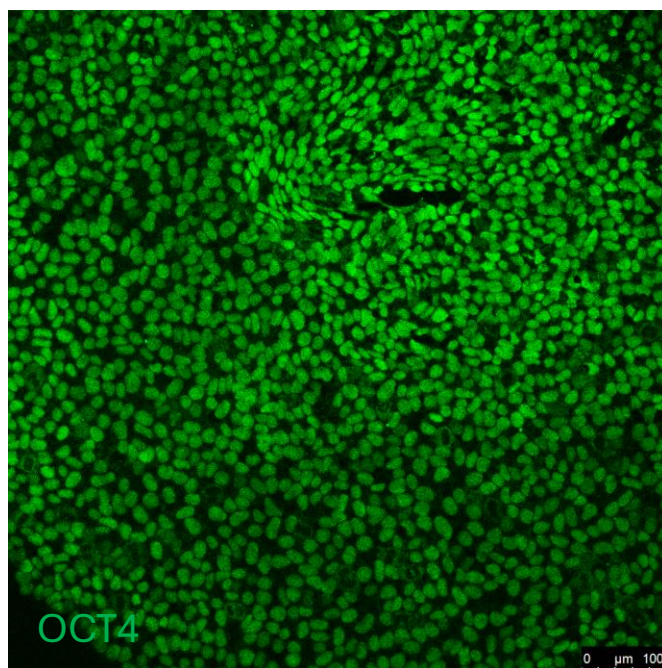


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



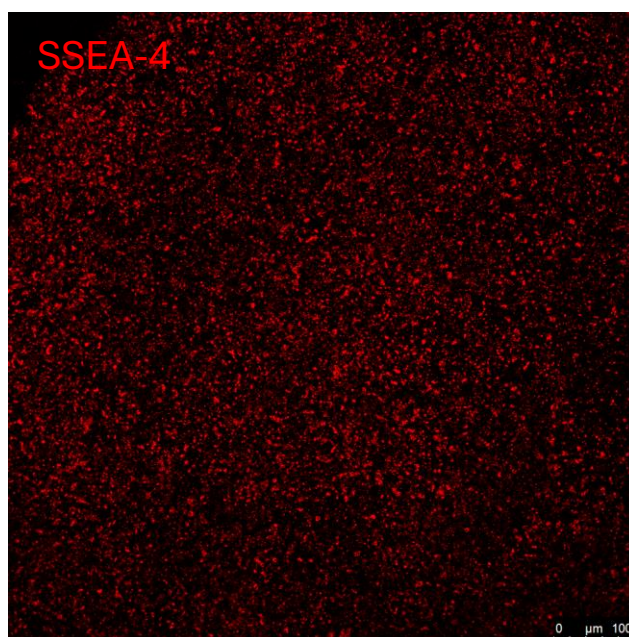
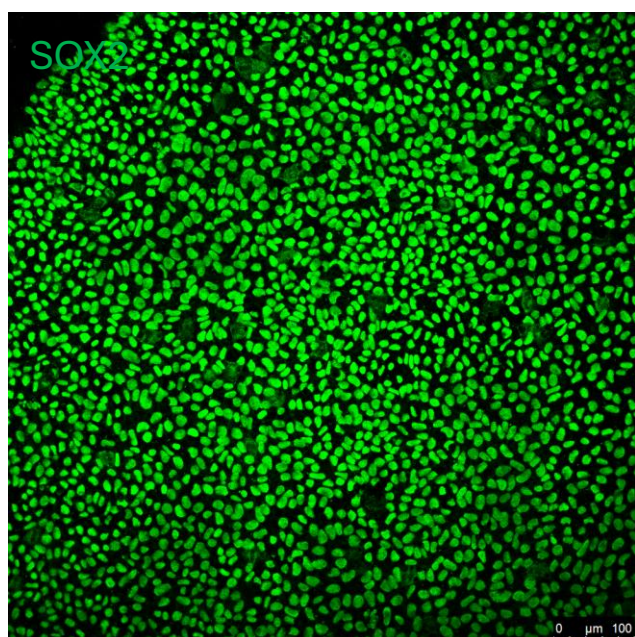
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



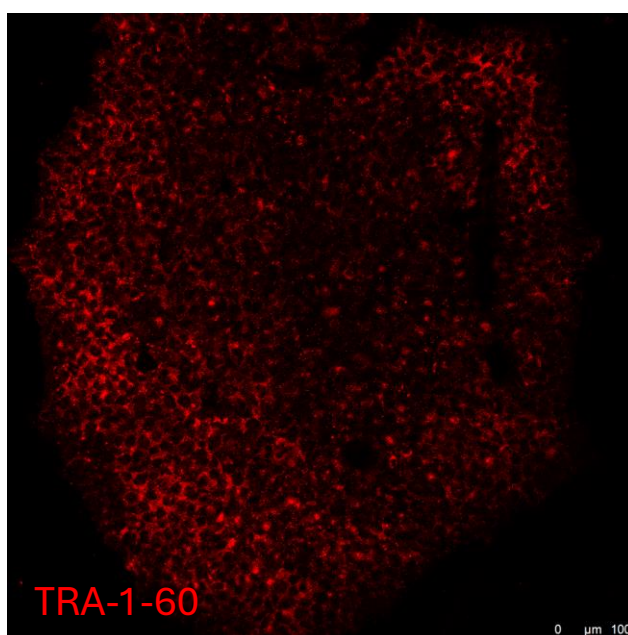
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4



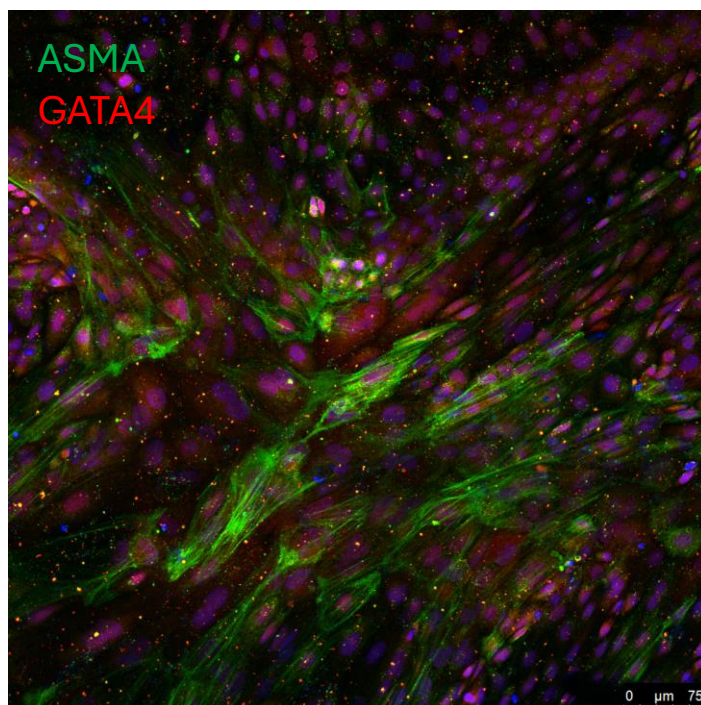
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

TRA1-60

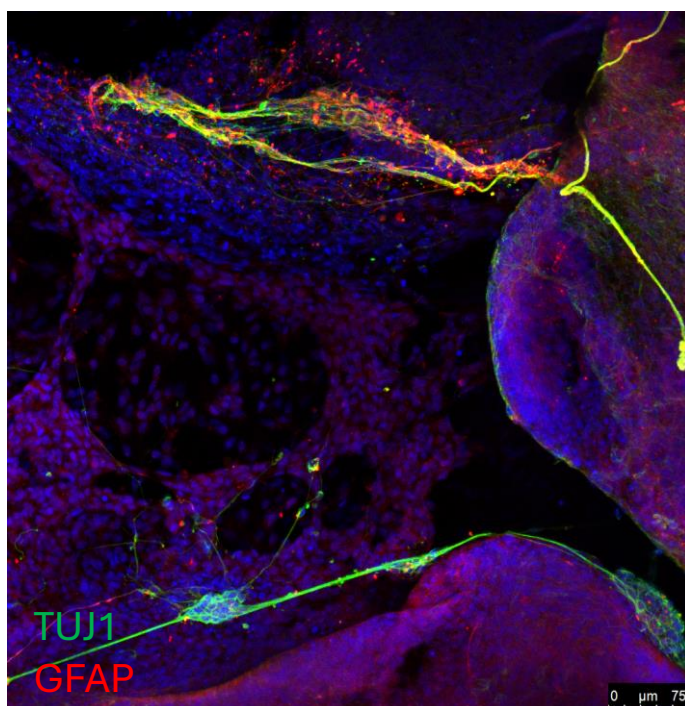


Anexo 2

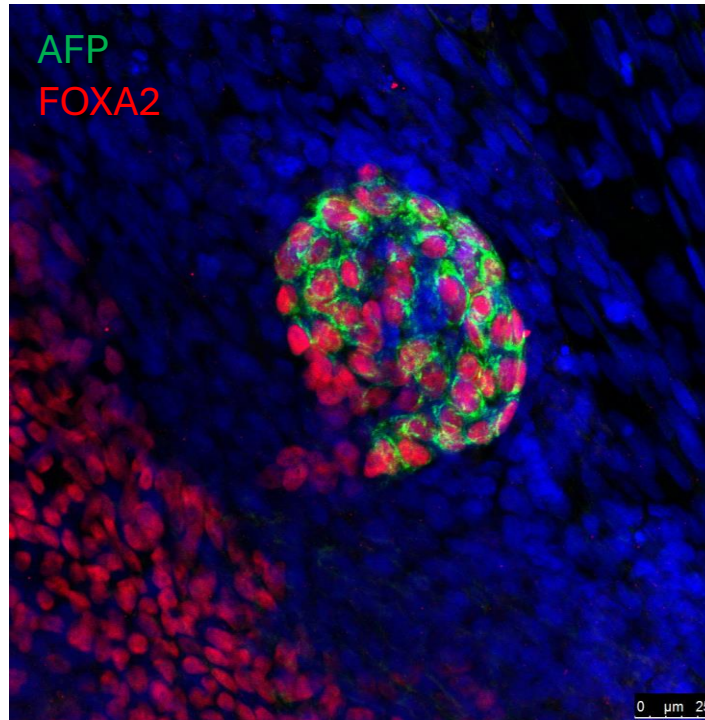
Diferenciación *in vitro*



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: 33390621

Name: PKU FiPS81-Sv4F-2 p8

NHC: CT0707

Department: IDIBELL

Date: 12/19/2023

Sample: CM



Case: 33390621 Slide: 1 Cell: 1F

Result: 46,XY



Anexo 4

Resultado microsatélites

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

	Identificació	ID Ambar	Tipus de mostra
Mostra:	PKU FIPS81-SV4F-2 P10	1335100	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 1335100	
D8S1179	8	12	14
D21S11	21q11.2-q21	30	31
D7S820	7q11.21-22	10	12
CSF1PO	5q33.3-34	11	12
D3S1358	3p	15	16
TH01	11p15.5	6	9.3
D13S317	13q22-31	9	14
D16S539	16q24-qter	11	12
D2S1338	2q35-37.1	20	24
D19S433	19q12-13.1	14	14
VWA	12p12-pter	16	17
TPOX	2p23-2per	8	9
D18S51	18q21.3	13	14
D5S818	5q21-31	11	14
FGA	4q28	22	27
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, 27/02/2024



Dr. J.V.Martinez Mas

ESTUDI DE MICROSATÈL-LITS (STRs)

Mostra: **Identificació** **ID Ambar** **Tipus de mostra**
 FB 36781, P1, 0.6M CELLS, 14.09.23 1221777 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 1221777	
D8S1179	8	12	14
D21S11	21q11.2-q21	30	31
D7S820	7q11.21-22	10	12
CSF1PO	5q33.3-34	11	12
D3S1358	3p	15	16
TH01	11p15.5	6	9,3
D13S317	13q22-31	9	14
D16S539	16q24-qter	11	12
D2S1338	2q35-37.1	20	24
D19S433	19q12-13.1	14	14
VWA	12p12-pter	16	17
TPOX	2p23-2per	8	9
D18S51	18q21.3	13	14
D5S818	5q21-31	11	14
FGA	4q28	22	27
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, 09/10/2023



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

22/11/23

1. POSITIVE CONTROL
2. PKU PBiPS81-Sv4F-1 p6
3. PKU PBiPS81-Sv4F-2 p6
4. PKU PBiPS81-Sv4F-10 p7
5. PKU PBiPS81-Sv4F-14 p6
6. Sample NO RT
7. NEGATIVE CONTROL
8. H2O

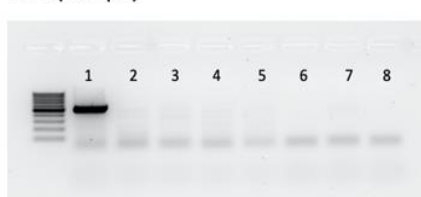
Sev (181 pb)



C- Myc (532 pb)



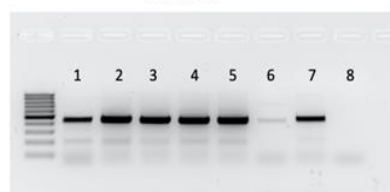
KOS (528 pb)



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

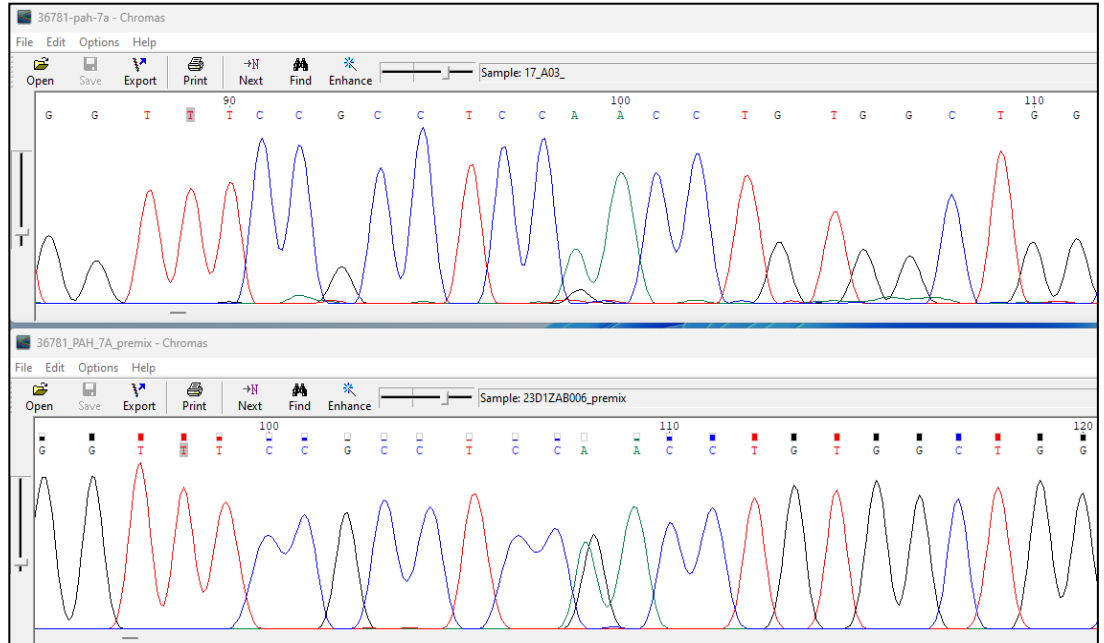
Comprobación de la presencia de la mutación

c.728G>A

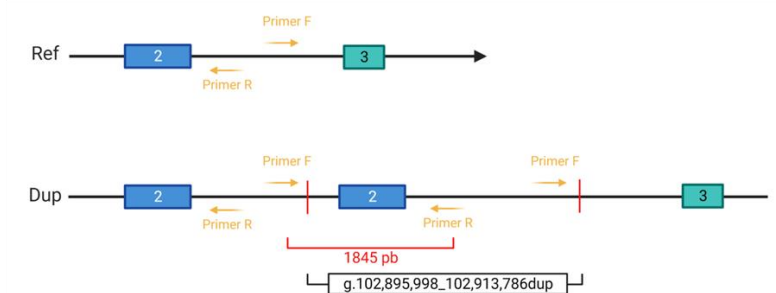
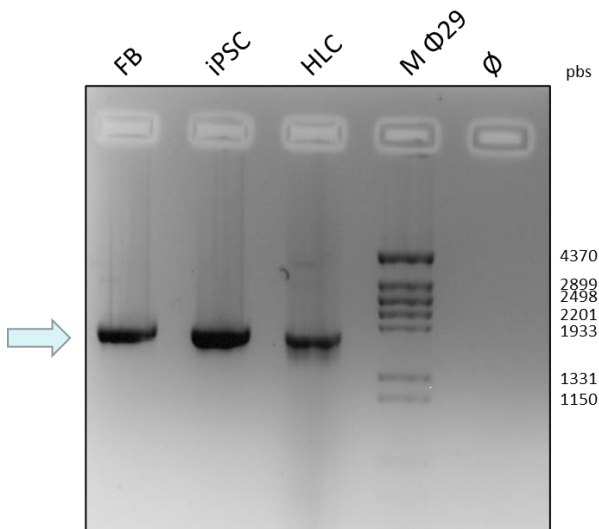


**Fibroblastos
36781**

**iPSC PAH
(PKU FiPS81-
Sv4F-2)**



Confirmación variante missense (NM_000277.3:c.728G>A) en gDNA (fibroblastos e iPSC)



FB: Fibroblastos 36781; iPSC PKU FiPS81-Sv4F-2; HLC: hepatocyte-like cells

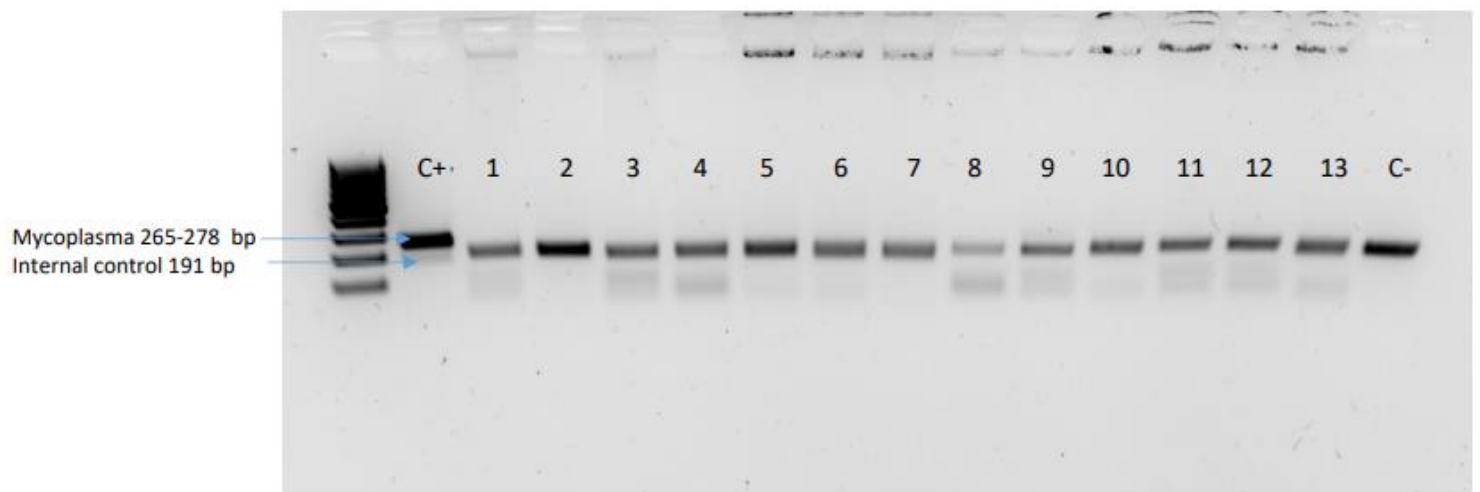
Confirmación variante Chr12(GRCh38):g.102895998_102913786dup en gDNA (fibroblastos, iPSC y HLC del paciente)



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 17/01/2024



4. PKU 81 #2: PKU-FiPS81-Sv4F-2 p7