



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR **WFS1 FiPS 34-Ep6F-3** 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

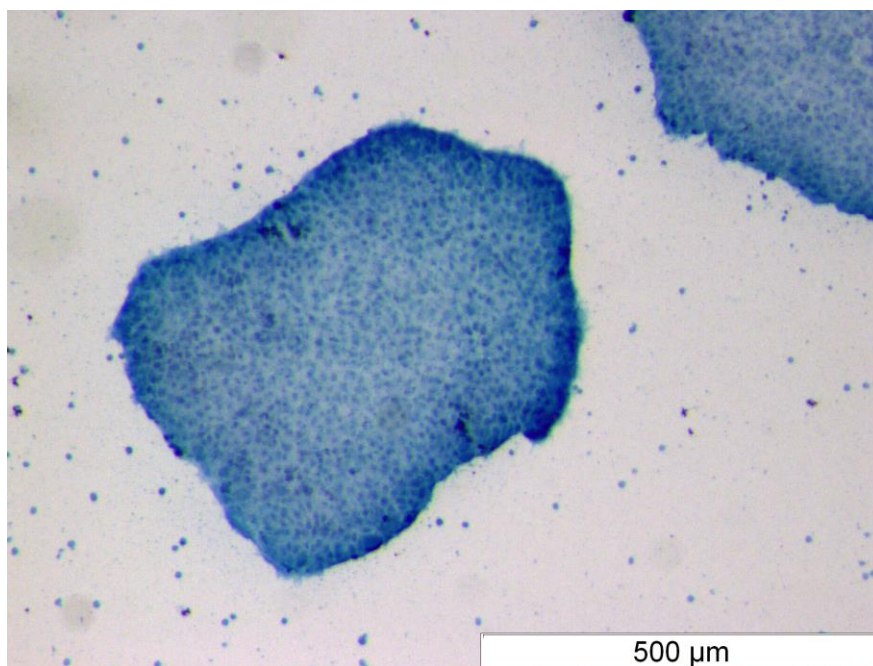
Anexo 6: Comprobación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

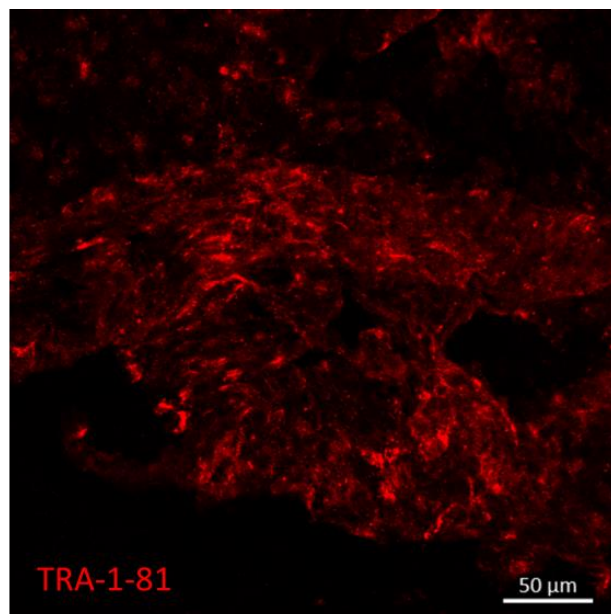
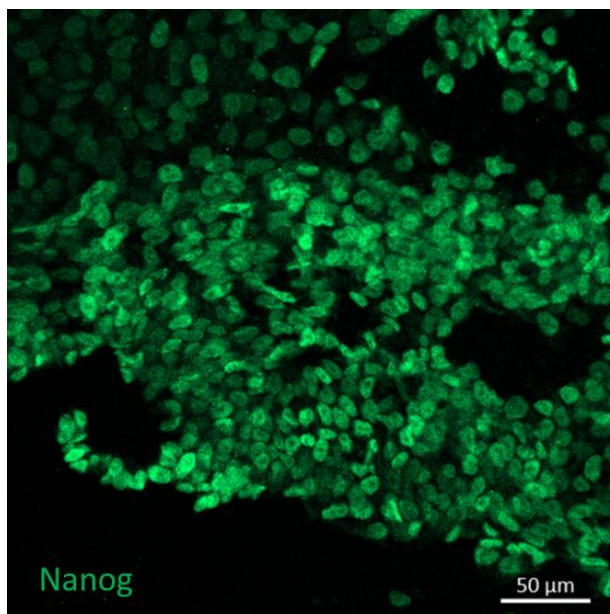


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

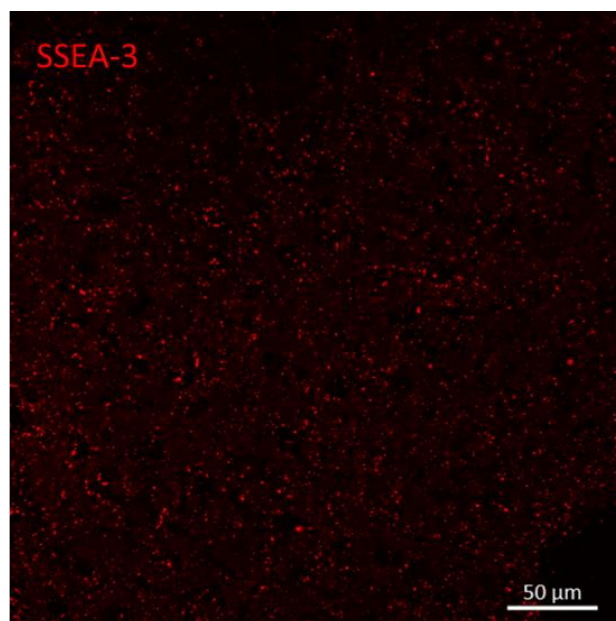
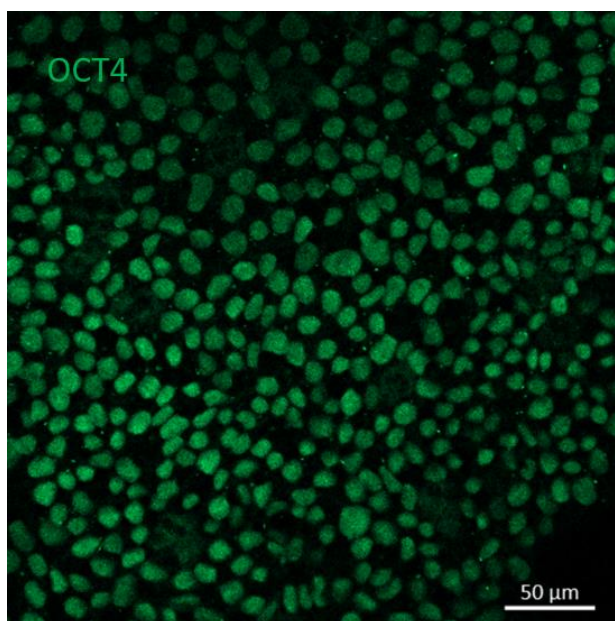


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



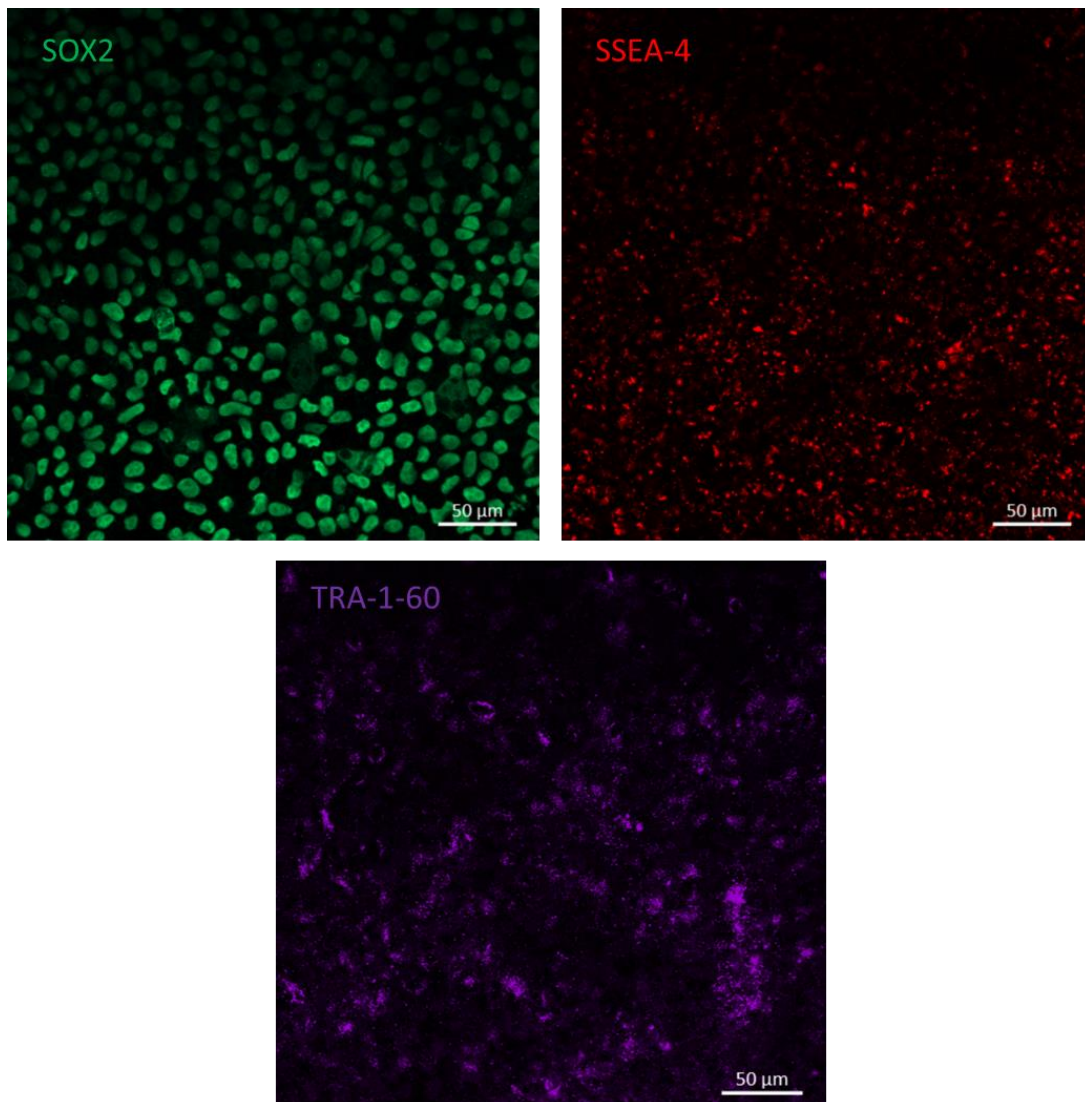
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



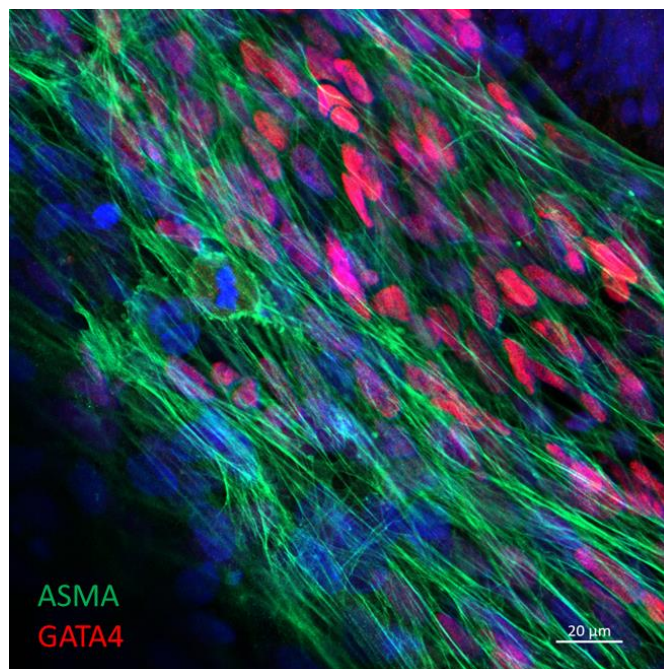
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

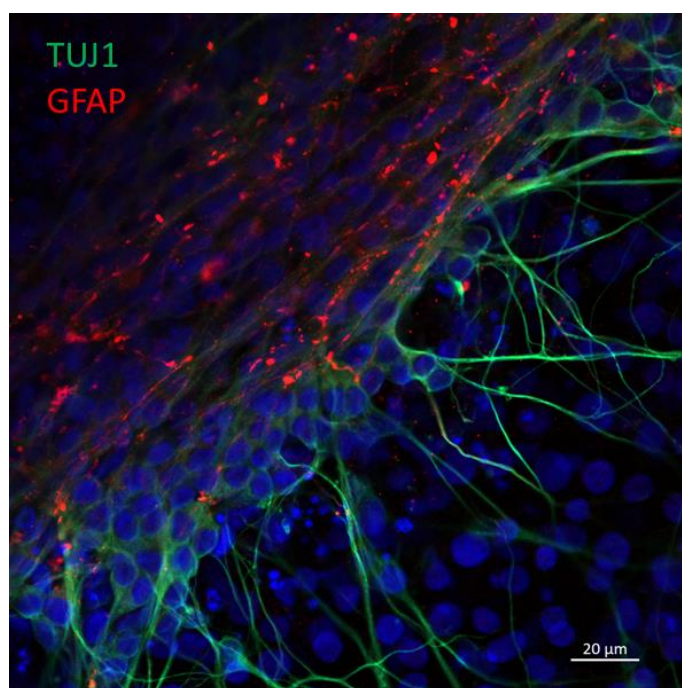


Anexo 2

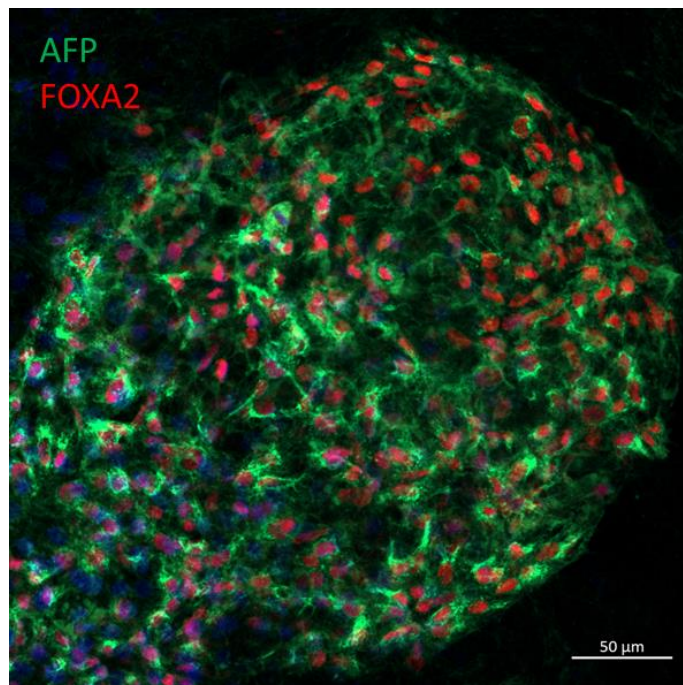
Diferenciación *in vitro*



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: 31670511

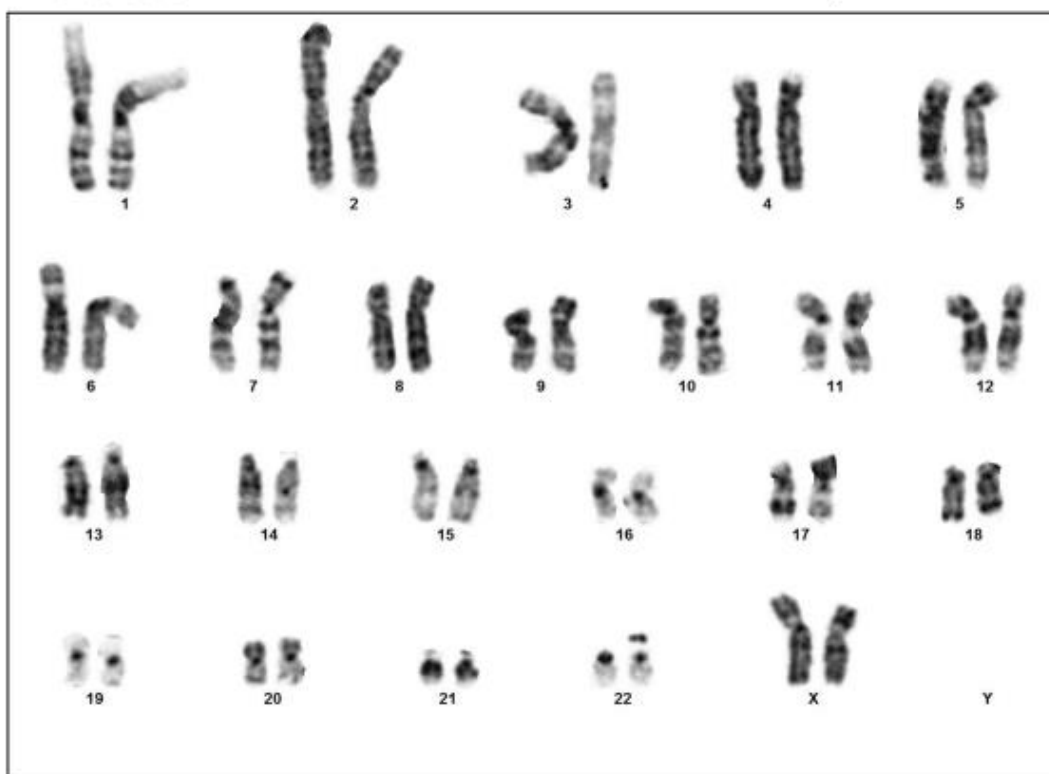
Name: SF1 FiPS34-Ep6F-3 p10

NHC: CT0619

Department: IDIBELL

Date: 7/5/2023

Sample: CM



Case: 31670511 Slide: 2 Cell: 1F

Result: 46,XX



Anexo 4

Resultado microsátélites

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

Mostra:	Identificació	ID Ambar	Tipus de mostra
	WFS1 FIPS34-EP6F-3 P13	1221770	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® 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 1221770	
D8S1179	8	10	12
D21S11	21q11.2-q21	32,2	32,2
D7S820	7q11.21-22	9	11
CSF1PO	5q33.3-34	10	12
D3S1358	3p	16	17
TH01	11p15.5	6	9,3
D13S317	13q22-31	13	13
D16S539	16q24-qter	9	12
D2S1338	2q35-37.1	19	23
D19S433	19q12-13.1	12	14
VWA	12p12-pter	15	18
TPOX	2p23-2per	9	11
D18S51	18q21.3	14	16
D5S818	5q21-31	11	12
FGA	4q28	22,2	23
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 CBK21934, P6, 28.02.23	6; 9.3	32.2	11, 12	13	9; 11	9; 12	10; 12	X	15; 18	9; 11

Barcelona, a 27 de abril de 2023

Laboratorio Biología Molecular

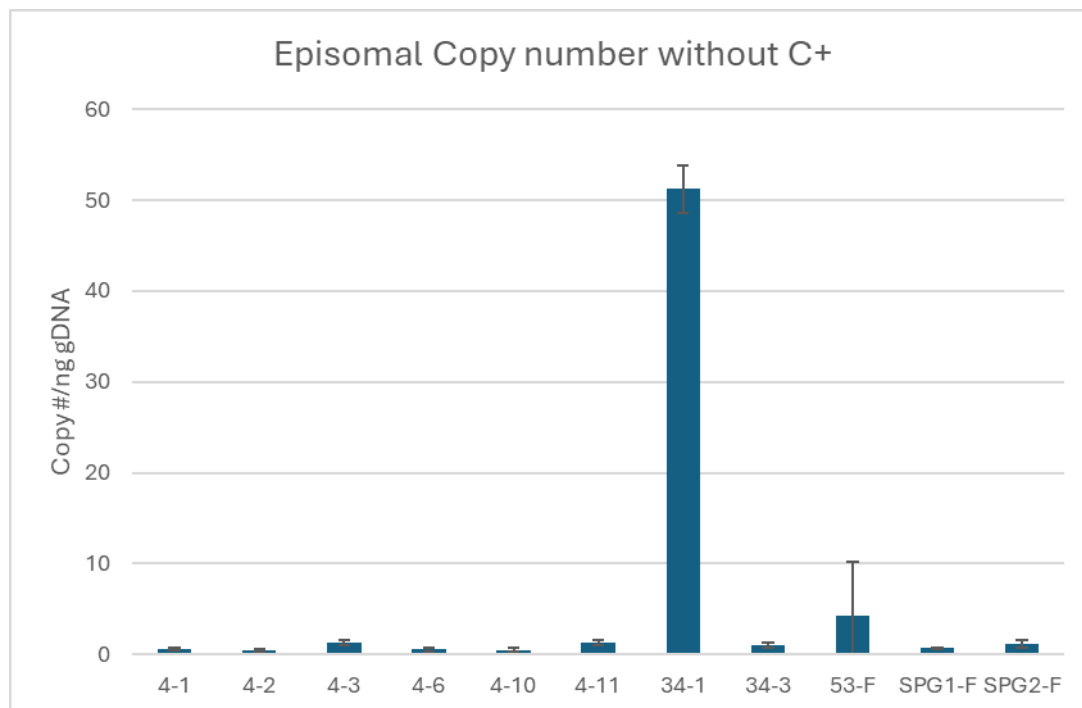
P-CMRC

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

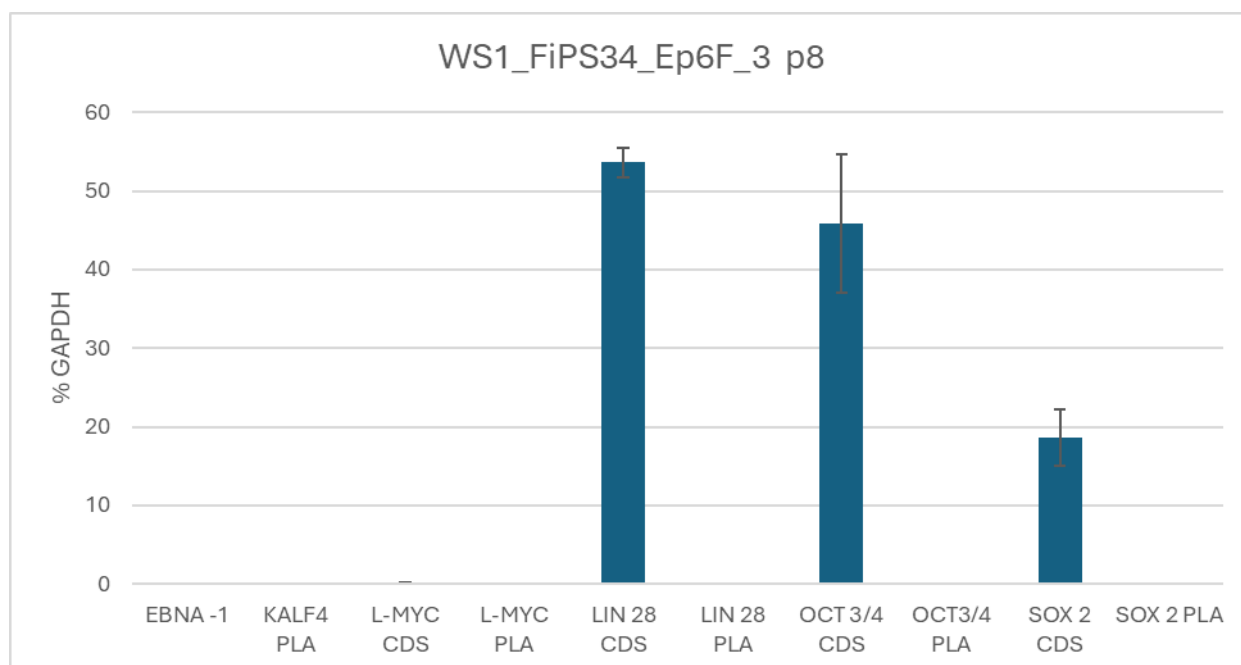


Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación



QRT-PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC (34-3 corresponde a la abreviación de WFS1 FiPS34-Ep6F-3) 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 FiPS34-Ep6F-3.

Anexo 6

Comprobación de la presencia de la mutación

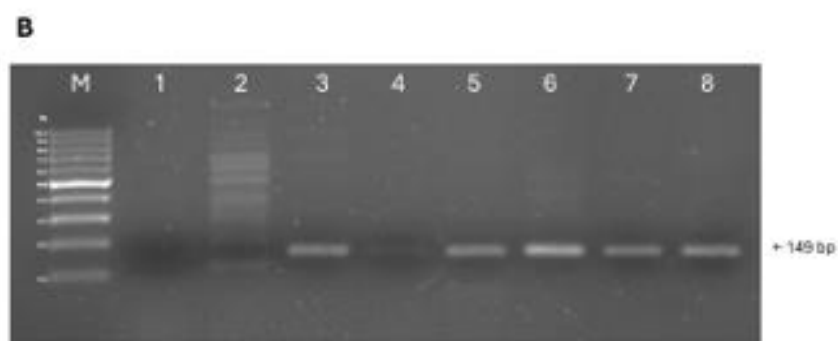


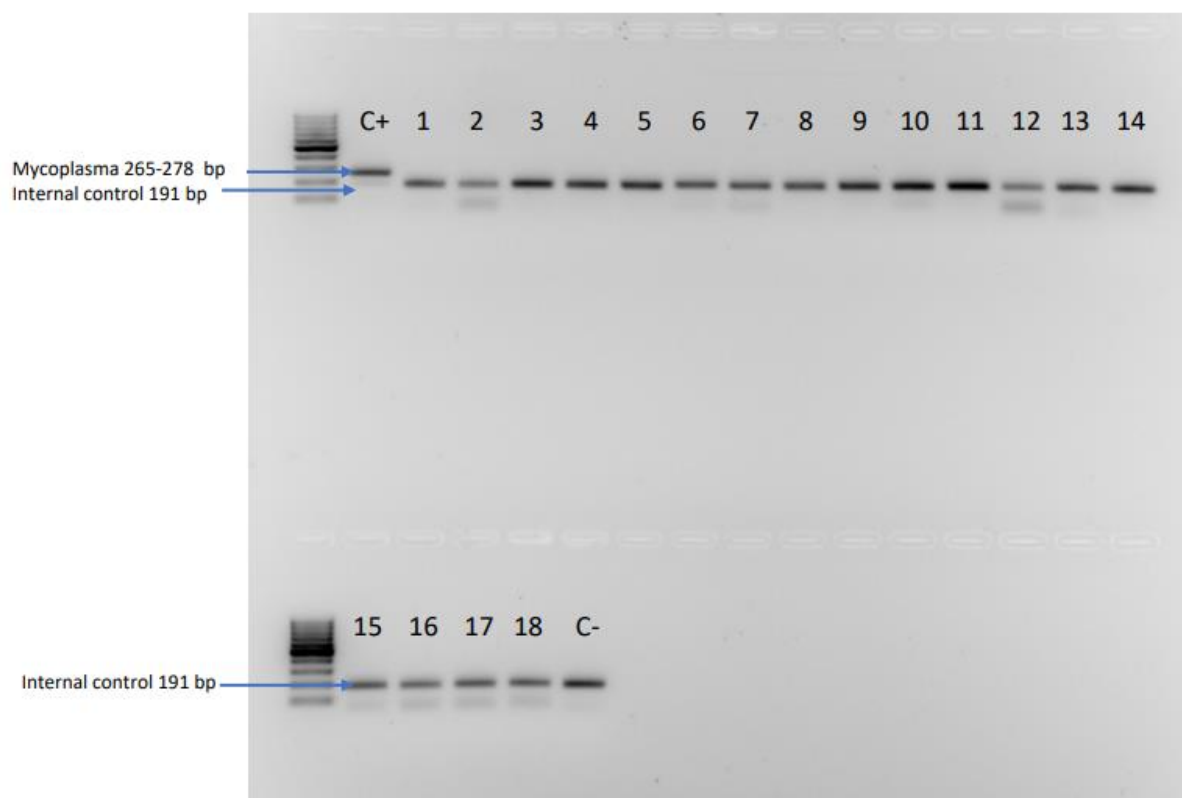
Fig 1. Comprobación por PCR de la presencia de las mutaciones c.1294C>G (p.Leu432Val) y c.1463_1474dup. Geles de electroforesis de productos de PCR obtenidos al amplificar para comprobar si hay presencia de la mutación c.1463_1474dup. Se encuentra presente en la línea de fibroblastos CBK21934 (carril 4), y por tanto en los clones de iPSCs: WFS1 FiPS34-Ep6F-03 (carril 7) y WFS1 FiPS34-Ep6F-13 (carril 8), derivados de la misma. 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