

ANEXO 1

Información genética de la línea ALSPBiPS1-Sv4F-1.

Genetic information.

El estudio del panel de genes asociados con ELA (véase más adelante) se realizó mediante NGS. Se abarcaron todas las regiones analizadas de los genes de interés y se observó una profundidad superior a 20x. La metodología empleada se centra en la identificación de variantes puntuales ubicadas en regiones exónicas o de splicing, ya sean sustituciones de nucleótidos, pequeñas inserciones o deleciones. Además, se realizó un análisis molecular mediante PCR repetida con cebador de la región del intrón 1 de *C9ORF72*, donde se encuentra el tracto de hexanucleótidos GGGGCC, y no se observó el patrón típicamente alterado en presencia de la expansión patogénica.

*The study of the panel of genes associated with ALS (see below) was carried out using NGS. All the analyzed regions of the genes of interest are covered and show a depth greater than 20x. The methodology used is aimed at identifying point variants located in exonic or splicing regions, whether nucleotide substitutions or small insertions or deletions. Additionally, molecular analysis was performed by Repeat Primed-PCR of the intron 1 region of *C9ORF72*, where the GGGGCC hexanucleotide tract is located, and the pattern typically altered in the presence of the pathogenic expansion was not observed.*

Gene	RefSeq
AARS1	NM_001605
ALS2	NM_020919
ANG	NM_001097577
ANXA11	NM_145869
AR	NM_000044
ARPP21	NM_001385486
ASAH1	NM_004315
ASCC1	NM_001198800
ATP7A	NM_000052
BICD2	NM_001003800
BSCL2	NM_001122955
CHCHD10	NM_213720
CHMP2B	NM_014043
CYLD	NM_001042355
DCTN1	NM_004082
DNAJB2	NM_006736
DYNC1H1	NM_001376
ERBB3	NM_001982
ERBB4	NM_001042599
EXOSC3	NM_016042
EXOSC8	NM_181503
FBXO38	NM_030793
FIG4	NM_014845
FUS	NM_004960
GARS1	NM_002047
GBF1	NM_001199378
GLE1	NM_001003722
HEXB	NM_000521
HINT1	NM_005340
HNRNPA1	NM_031157
HSPB1	NM_001540
HSPB3	NM_006308
HSPB8	NM_014365
IGHMBP2	NM_002180
KIF26B	NM_018012
KIF5A	NM_004984

Gene	RefSeq
MAPT	NM_016835
MATR3	NM_018834
MYH14	NM_001145809
NEFH	NM_021076
NEK1	NM_001199397
OPTN	NM_021980
PFN1	NM_005022
PIP5K1C	NM_012398
PLEKHG5	NM_001265593
PRPH	NM_006262
PRUNE1	NM_021222
RBM7	NM_016090
REEP1	NM_022912
SETX	NM_015046
SIGMAR1	NM_005866
SLC25A46	NM_138773
SLC52A2	NM_024531
SLC52A3	NM_033409
SLC5A7	NM_021815
SOD1	NM_000454
SPG11	NM_025137
SPTAN1	NM_001130438
SQSTM1	NM_003900
SYT2	NM_177402
TARDBP	NM_007375
TBK1	NM_013254
TRIP4	NM_016213
TUBA4A	NM_006000
UBA1	NM_003334
UBA5	NM_024818
UBQLN2	NM_013444
VAPB	NM_001195677
VCP	NM_007126
VRK1	NM_003384
WARS1	NM_004184
TRPV4	NM_021625

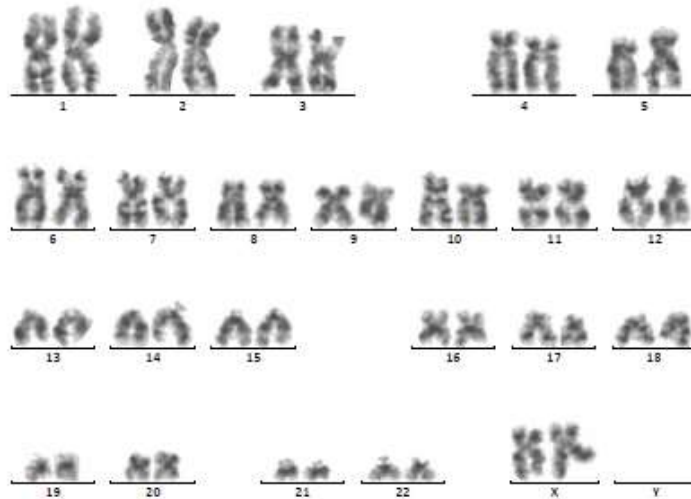
ANEXO 2

Cariotipo/bandeo G

Karyotype/ G-banding

Trabajo realizado por el Biobanco de SSPA, nodo de Granada. Diagnóstico citogenético:
Línea celular compatible con un cariotipo femenino normal.

Results provided by SSPA Biobank of Granada. Cytogenetic diagnostic: Cell line compatible with a normal female karyotype.



Cariotipo: 46,XX

Diagnóstico citogenético: Línea celular compatible con cariotipo femenino normal

ANEXO 3

Análisis STR

Fingerprint analysis

Trabajo realizado en el Biobanco del SSPA, nodo de Granada, a partir de muestras de ADN genómico de la línea celular ALSPBiPS1-Sv4F-1 y de las células primarias de la muestra de sangre.

Results provided by the SSPA Biobank of Granada from genomic DNA sample from both primary cells (blood) and ALSPBiPS1-Sv4F-1.

Código origen del ADN de la línea celular	DNA C1 p7	iPSC C1 p17
Línea celular	INVN02525E796ADNA004	INVN02525E790ADNA004
D8S1179	13	13
D21S11	30.2, 31.2	30.2, 31.2
D7S820	9, 12	9, 12
CSP1PO	11	11
D3S1358	16,18	16,18
TH01	9.3	9.3
D13S317	11, 12	11, 12
D16S539	12	12
D2S1338	23, 25	23, 25
D19S433	15	15
vWA	15, 17	15, 17
TPOX	10, 11	10, 11
D18S51	11	11
AMEL	X, X	X, X
D5S818	12, 14	12, 14
FGA	23	23

ANEXO 4

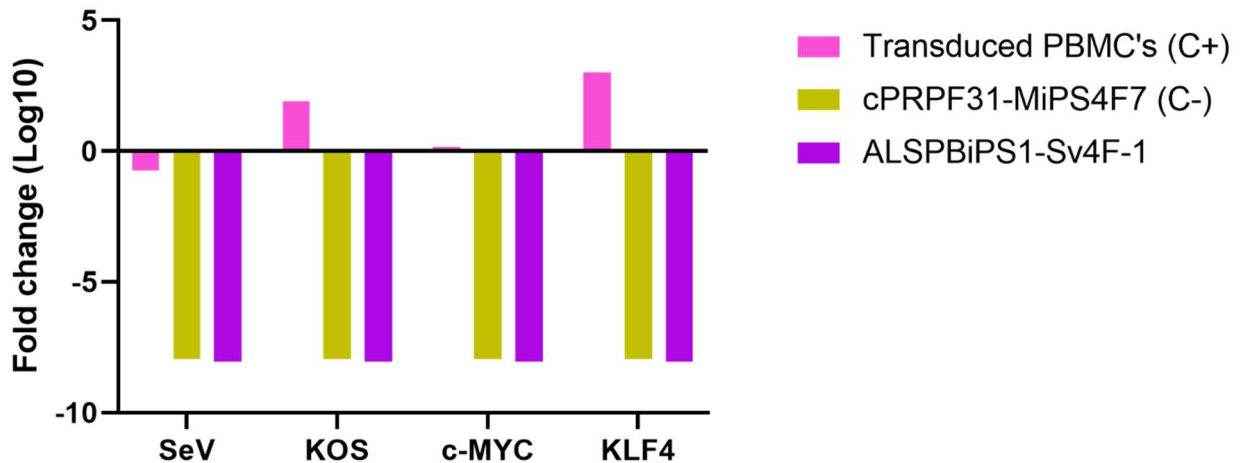
Análisis silenciamiento

Viral silencing analysis.

Se realiza qRT-PCR para detectar factores de reprogramación ectópicos y el gen que codifica la cápside del virus. Se muestra expresión de factores del virus en la línea ALSPBiPS1-Sv4F-1 (transduced PBMC's) en pase 2 (P2) como control positivo, y ausencia de expresión a pase 8 (ALSPBiPS1-Sv4F-1) (P8). Además, como control negativo se usa otra línea de iPSC depositada en el BNLC (cPRPF31-MiPS4F7). Las muestras se prepararon con TaqMan Gene Expression Master Mix y sondas TaqMan (ver más abajo).

qRT-PCR performed to detect ectopic reprogramming factors and gene encoding the virus capsid. Expression of viral factors is shown in line ALSPBiPS1-Sv4F-1 at passage 2 (P2) as positive control (transduced PBMC's), and absence of expression at passage 8 (transduced PBMC's) (P8). In addition, another iPSC line deposited in the BNLC (cPRPF31-MiPS4F7) is used as a negative control. Samples for reaction were prepared with TaqMan Gene expression Master Mix and TaqMan probes (see below).

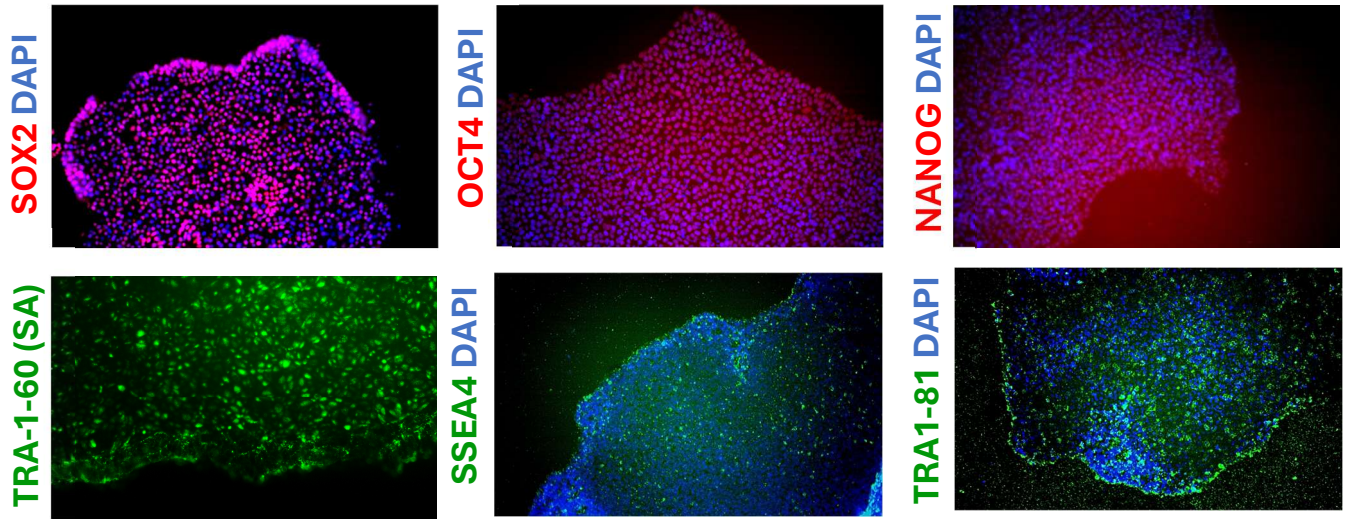
SeV: Mr04269880_mr
KOS: Mr04421257_mr
Klf4: Mr04421256_mr
c-Myc: Mr04269876_mr
GADPH: Mm99999915_g1



ANEXO 5

Caracterización de pluripotencia por inmunofluorescencia de la línea ALSPBiPS1-Sv4F-1.

Pluripotency characterization by immunofluorescence in line ALSPBiPS1-Sv4F-1.



ANEXO 6

Diferenciación *in vitro*: inmunofluorescencia de marcadores de las tres capas embrionarias en cuerpo embrionarios a partir de la línea ALSPBiPS1-Sv4F-1.

Ectodermo (tubulina β -III (TUJ1)), mesodermo (actina α -músculo liso (SMO)) y endodermo (alfa-1-fetoproteína (AFP)).

In vitro differentiation: immunofluorescence of markers of three germ layers in embryoid bodies generated from ALSPBiPS1-Sv4F-1 line.

Ectoderm (Tubulin β -III (TUJ1)), mesoderm (Actin α -Smooth Muscle (SMO)), and endoderm (Alpha-1-Fetoprotein (AFP)).

