

Anexo 1. Identificación celular: Huella genética por análisis de STR de las células de origen

Annex 1. Cell identification: Genetic fingerprinting by STR analysis of cells of origin

Procedimiento

La caracterización de las muestras se lleva a cabo mediante el análisis genético de 10 marcadores STRs: TH01, TPOX, vWA, Amelogenina (marcador sexual), CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 y D21S11. Para ello se usa el kit GenePrint 10 (Promega). Para la amplificación se utilizaron 5 ng de ADN. Una vez amplificadas las muestras mediante el procedimiento descrito en el kit, fueron cargadas en el analizador de fragmentos SeqStudio, para ser finalmente analizadas con el Software GeneMapper ID-X.

Procedure

The characterization of the samples is carried out through the genetic analysis of 10 STR markers: TH01, TPOX, vWA, Amelogenin (sexual marker), CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 and D21S11. For this, the GenePrint 10 kit (Promega) is used. For amplification, 5 ng of DNA were used. Once the samples were amplified using the procedure described in the kit, they were loaded into the SeqStudio fragment analyzer, to be finally analyzed with the GeneMapper ID-X Software.

Resultado

Sample	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
HLA98-MiPS4F15 PBMCs	7, 9	30	12, 13	8, 9	11	11	10, 12	X, Y	14, 16	9, 11
HLA98-MiPS4F15 iPSC p10	7, 9	30	12, 13	8, 9	11	11	10, 12	X, Y	14, 16	9, 11

Análisis realizado por el Laboratorio de Extracción de Ácidos Nucleicos y Biología Molecular del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

Códigos de muestras:

- HLA98-MiPS4F15 PBMCs → INVN02522B404ADNA002
- HLA98-MiPS4F15 iPSC p10 → INVN02522B405ADNA002

Analysis carried out by the Laboratory for the Extraction of Nucleic Acids and Molecular Biology of the Biobank of the Andalusian Public Health System.

Sample codes:

- HLA98-MiPS4F15 PBMCs → INVN02522B404ADNA002
- HLA98-MiPS4F15 iPSC p10 → INVN02522B405ADNA002

Anexo 2. Test de pluripotencia. Resultados de Inmunocitoquímica

Annex 2. Pluripotency test. Immunocytochemistry results

Procedimiento

La caracterización de las pluripotencia de la línea iPSC generada se llevó a cabo mediante el análisis por inmunocitoquímica de la presencia de los marcadores OCT4, NANOG y SOX2 en células fijadas a pase 10.

Anticuerpos primarios empleados:

- Anti-OCT4 (Cell signalling #2840S)
- Anti-NANOG_(Cell signalling #4903S)
- Anti-SOX2 (Cell signalling #3579P)

Microscopio:

Thunder Epifluorescence Microscope (Leica)

Procedure

Pluripotency characterization of the generated iPSC line was carried out by immunocytochemical analysis of the presence of markers OCT4, NANOG, and SOX2 in cells fixed at passage 10.

Primary antibodies used:

OCT4_cell signaling #2840S

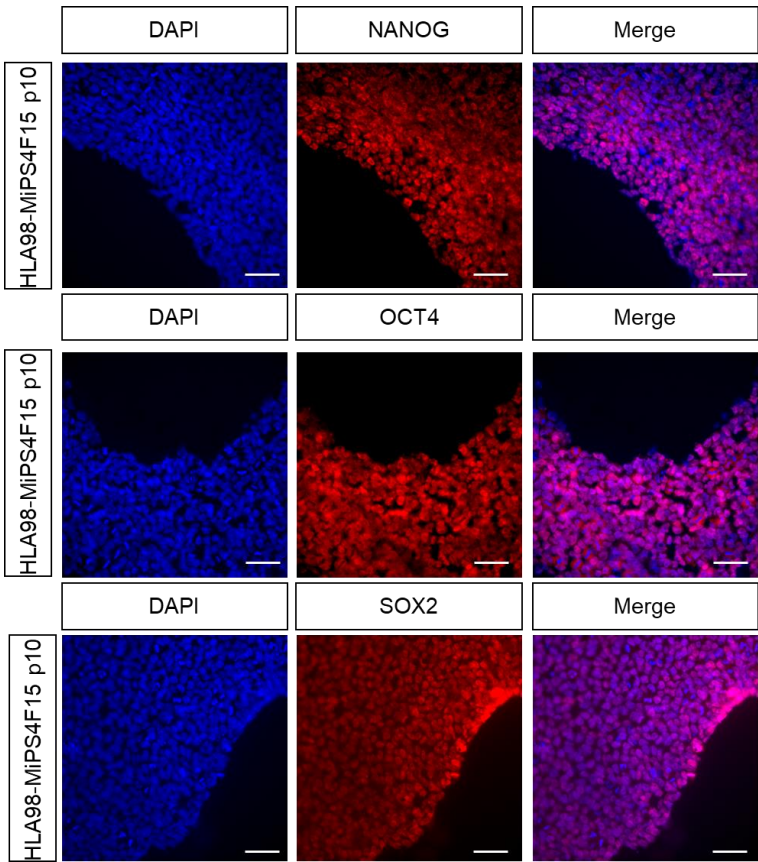
NANOG_cell signaling #4903S

SOX2_cell signaling #3579P

Microscope:

Thunder Epifluorescence Microscope (Leica)

Resultado



Scale bar = 50µm

Anexo 3. Test de pluripotencia. Resultados de Citometría de Flujo

Annex 3. Pluripotency test. Flow cytometry results

Procedimiento

La caracterización de las pluripotencia de la línea iPSC generada se llevó a cabo mediante el análisis por citometría de flujo del número de células positivas para los marcadores extracelulares SSEA-3, SSEA-4 y TRA-1-60 en células vivas a pase 12.

Anticuerpos conjugados empleados:

- PE Rat anti-SSEA-3 (BD #560237)
- Alexa Fluor® 488 Mouse anti-SSEA-4 (BD #560308)
- Alexa Fluor 647 Mouse Anti-Human TRA-1-60 (BD #560850)

Citómetro:

Fortessa LSR X-20 (BD Bioscience)

Procedure

Pluripotency characterization of the generated iPSC line was carried out by flow cytometric analysis of the number of cells positive for the extracellular markers SSEA-3, SSEA-4 and TRA-1-60 in live cells at passage 12.

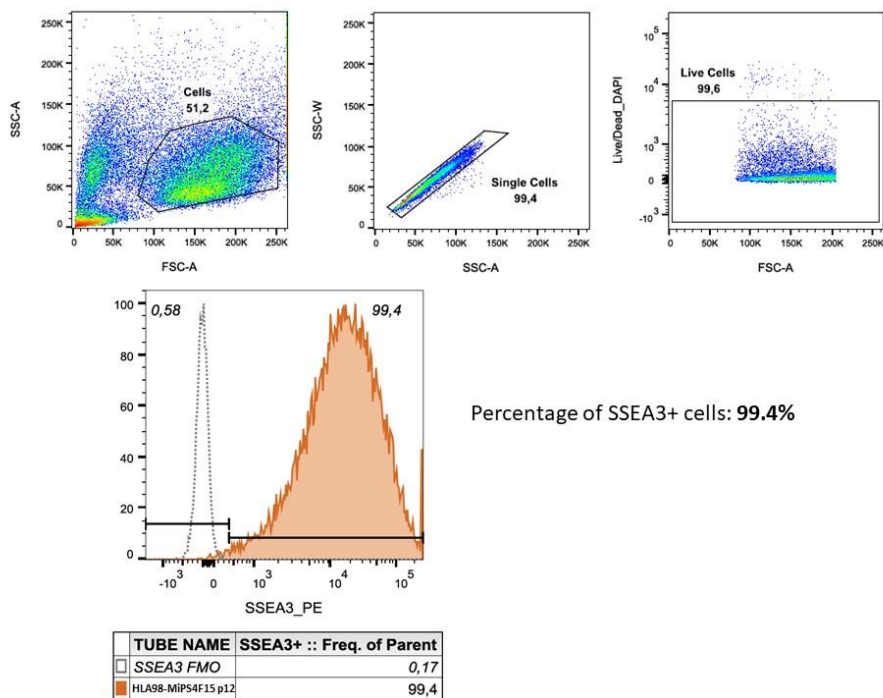
Conjugated antibodies used:

- PE Rat anti-SSEA-3 (BD #560237)
- Alexa Fluor® 488 Anti-SSEA-4 Mouse (BD #560308)
- Alexa Fluor 647 Mouse Anti-Human TRA-1-60 (BD #560850)

Cytometer:

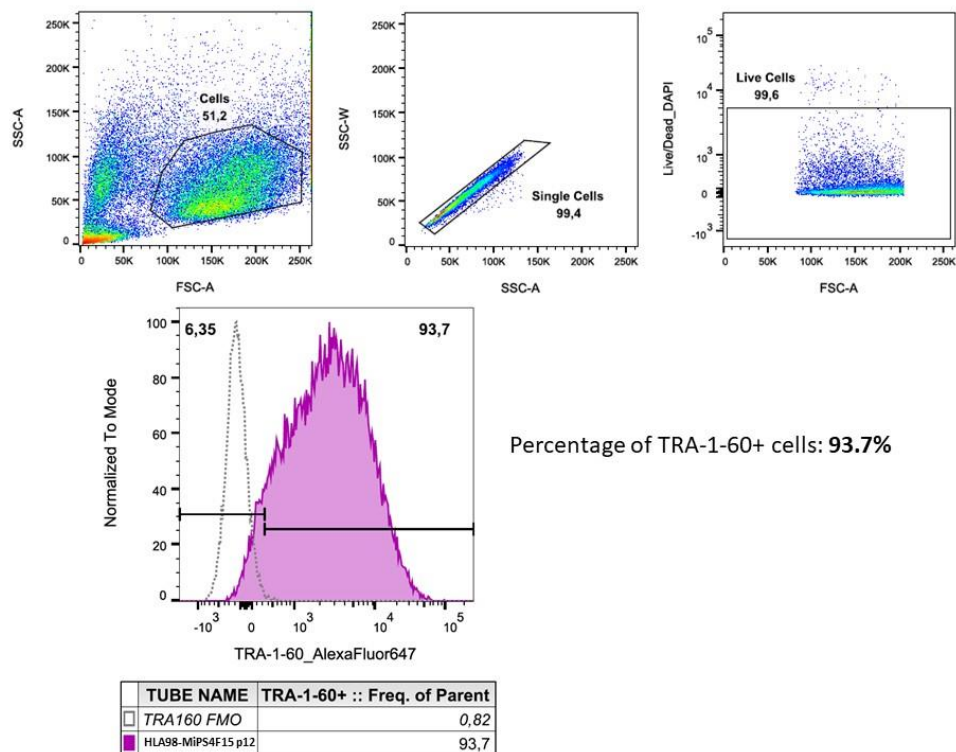
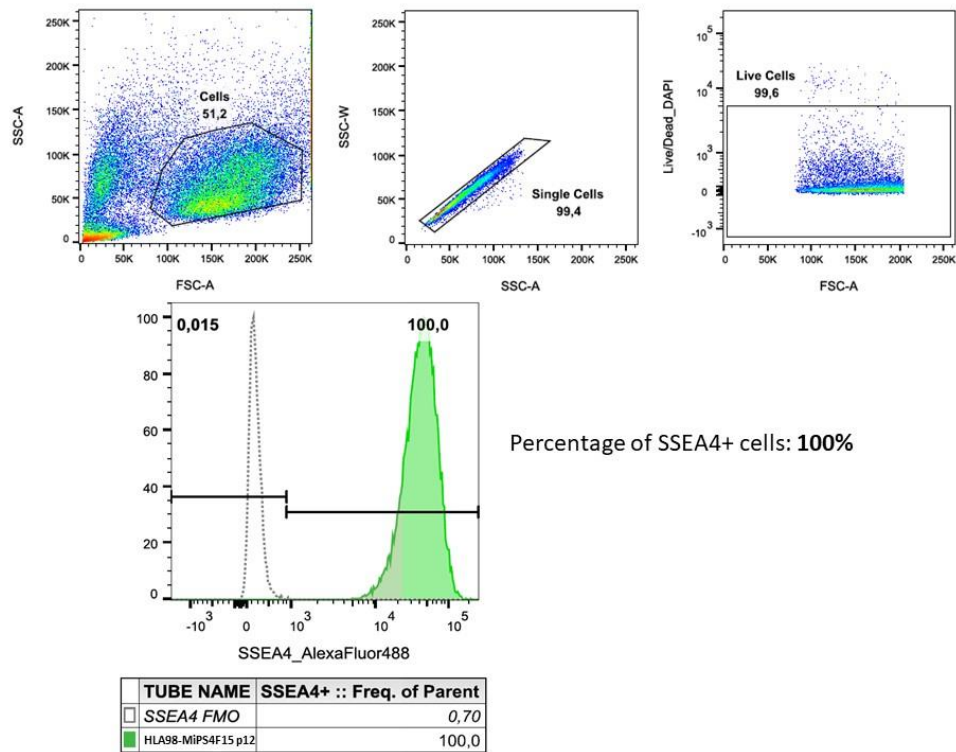
Fortessa LSR X-20 (BD Bioscience)

Resultado



Anexo 3. Test de pluripotencia. Resultados de Citometría de Flujo (continuación)

Annex 3. Pluripotency test. Flow cytometry results (continuation)



Anexo 4. Test de pluripotencia. Resultados de actividad de Fosfatasa Alcalina

Annex 4. Pluripotency test. Alkaline phosphatase activity results

Procedimiento

La caracterización de la pluripotencia de la línea iPSC generada se llevó a cabo mediante el análisis de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina.

Kit de medición de la actividad enzimática empleada:

- SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (Sigma #B5655)

Microscopio:

Axiovert 40 C (Zeiss)

Procedure

The characterization of the pluripotency of the generated iPSC line was carried out by analyzing the activity of the enzyme alkaline phosphatase.

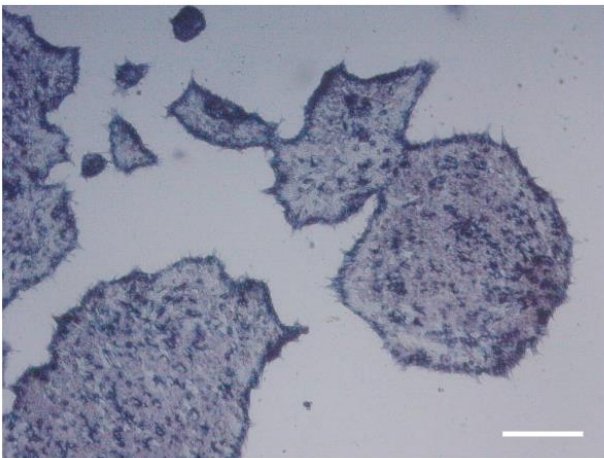
Enzyme activity measurement kit used:

SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (Sigma #B5655)

Microscope:

Axiovert 40 C (Zeiss)

Resultado



Alkaline Phosphatase Staining [04.10.22]

Experiment conditions

Cell Line: HLA98-MiPS4F15 p15, LN521

Fixation: 4%-Paraformaldehyde

10 minutes at room temperature

Staining: BCIP-NBT Solution (Sigma #B5655)

40 minutes at room temperature

Optical microscope (Zeiss Axiovert 40 C), 5x magnification

Scale bar: 100µm

Anexo 5. Test de diferenciación *in-vitro*. Cuerpos embrioides

Annex 5. In-vitro differentiation test. Embryoid bodies

Procedimiento

La caracterización de la capacidad de diferenciación hacia los tres linajes embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo) de la línea iPSC generada se llevó a cabo mediante el análisis por inmunocitoquímica de la presencia de los marcadores PAX6 y TUJ20 (ectodermo), aSMA (mesodermo) y AFP (endodermo) en cuerpos embriónicos generados desde iPSC a pase 12.

Anticuerpos primarios empleados:

- Anti-PAX6 (Biolegend #901301)
- Anti-TUJ20 (Abcam #ab7751)
- Anti-aSMA (Sigma #A5228)
- Anti-AFP (R&D #MAB1368)

Microscopio:

Thunder Epifluorescence Microscope (Leica)

Procedure

The differentiation capacity towards the three embryonic lineages (ectoderm, mesoderm, and endoderm) of the iPSC line generated was characterized by immunocytochemical analysis of the presence of the markers PAX6 and TUJ20 (ectoderm), aSMA (mesoderm) and AFP (endoderm) in embryonic bodies generated from iPSCs at passage 12.

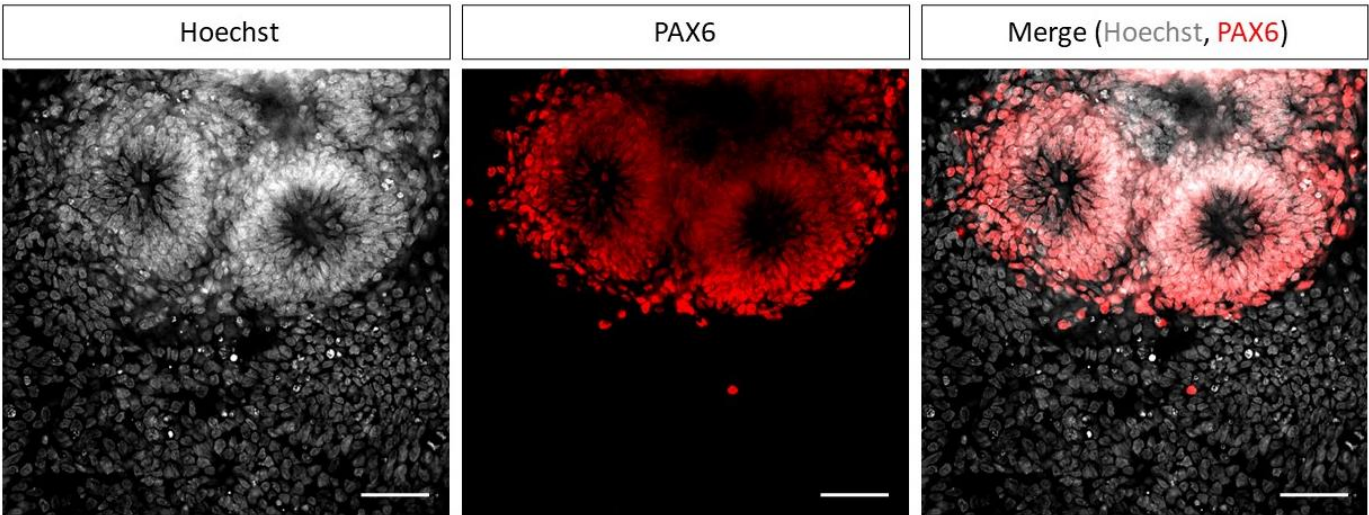
Primary antibodies used:

- Anti-PAX6 (Biolegend #901301)
- Anti-TUJ20 (Abcam #ab7751)
- Anti-aSMA (Sigma #A5228)
- Anti-AFP (R&D #MAB1368)

Microscope:

Thunder Epifluorescence Microscope (Leica)

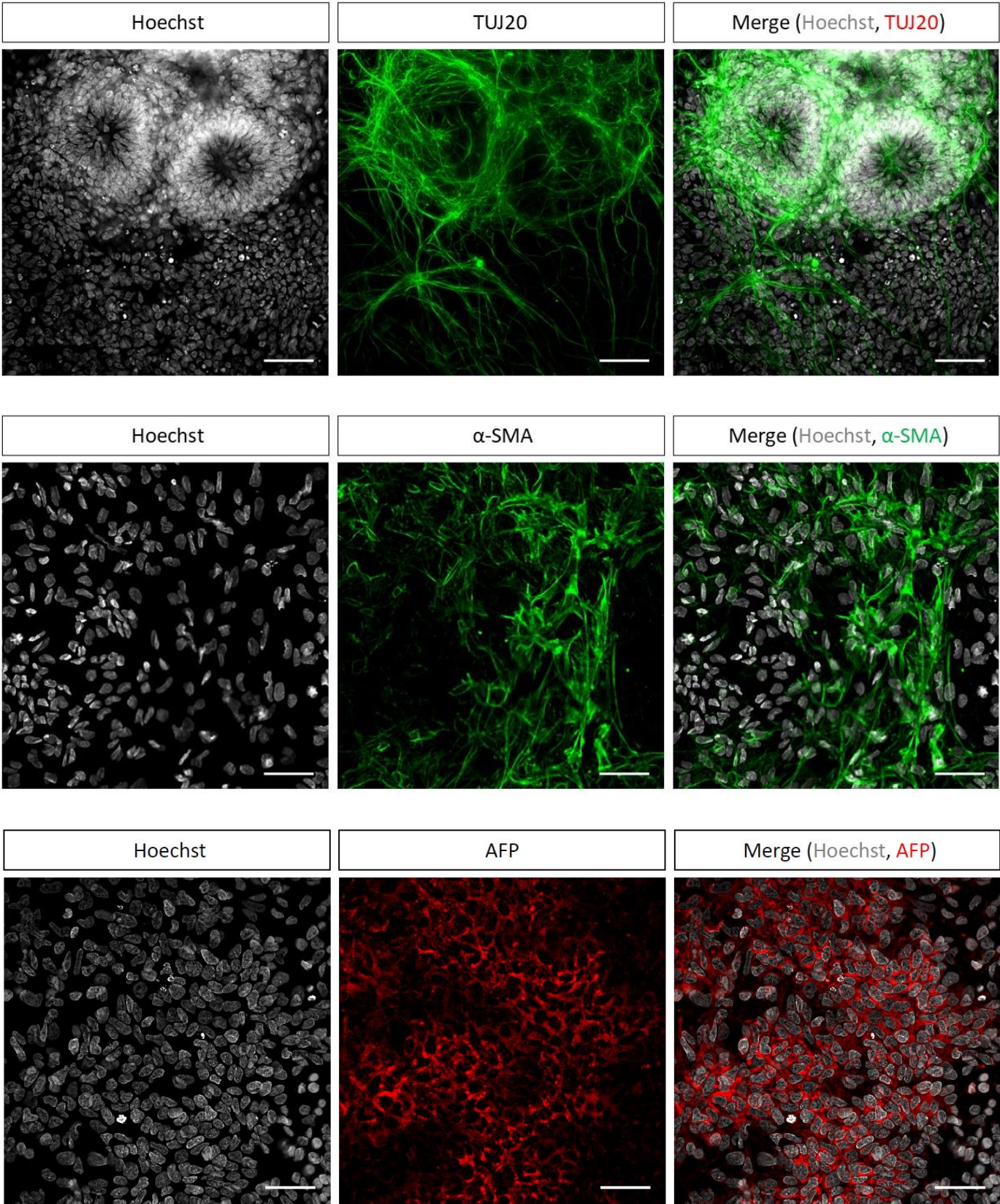
Resultado



Scale bar = 200µm

Anexo 5. Test de diferenciación *in-vitro*. Cuerpos embrioides (continuación)

Annex 5. *In-vitro* differentiation test. Embryoid bodies (continuation)



Scale bar = 200μm

Anexo 6. Cariotipo

Annex 6. Karyotype

Procedimiento

Análisis de citogenética convencional humano en línea celular.

Las metafases obtenidas tras el tratamiento con colcemid, y CLK, en el procesamiento, han sido tratadas con tripsina y tinción para obtener bandas G cuyo patrón se ha estudiado.

Reactivos-Lote:

- Colcemid: 9311190201
- CLK: STBG8549

El estudio se ha realizado según las recomendaciones publicadas por el Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética en su consenso de 2020.

Procedure

Human conventional cytogenetic analysis in cell line.

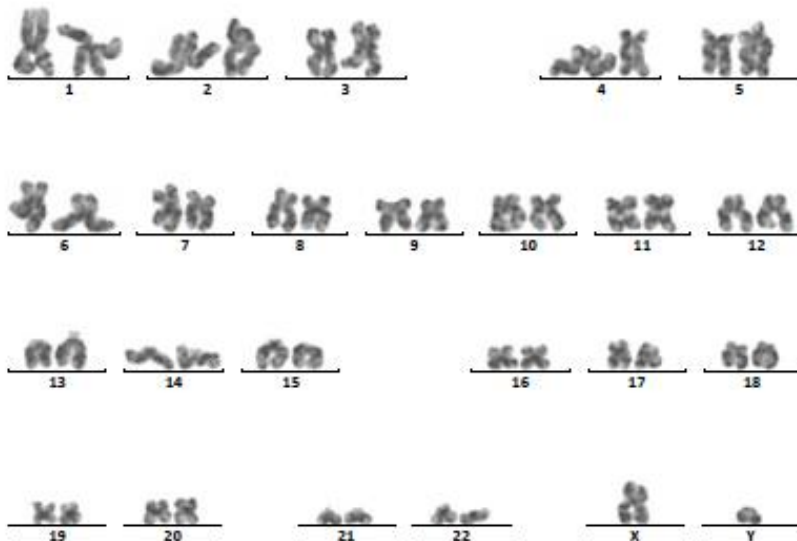
The metaphases obtained after treatment with colcemid, and CLK, in processing, have been treated with trypsin and stained to obtain G bands whose pattern has been studied.

Reagents-Lot:

- Colcemid: 9311190201
- CLK: STBG8549

The study was carried out according to the recommendations published by the International System of Cytogenetic Nomenclature in its 2020 consensus.

Resultado



Cariotipo: 46,XY

Diagnóstico citogenético:

Línea celular compatible con cariotipo masculino normal

Análisis realizado por el Laboratorio de Citogenética del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

Códigos de muestras:

- HLA98-MiPS4F15 iPSC p17 → INVN02522B169CRMA000

Analysis carried out by the Cytogenetics Laboratory of the Biobank of the Andalusian Public Health System.

Sample codes:

- HLA98-MiPS4F15 iPSC p17 → INVN02522B169CRMA000

Anexo 7. Test de silenciamiento

Annex 7. Silencing test

Procedimiento

Confirmación por RT-PCR del silenciamiento de los factores de reprogramación exógenos y del vector del virus Sendai.

Cebadores empleados:

	Target	size (bp)	Forward/Reverse primer (5' -3')
SeV genome	SeV	181	GGATCACTAGGTGATATCGAGC/ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC
SeV genome	KOS	528	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC/ACCTTGACAATCCTGATGTGG
SeV genome	KLF4	410	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC/AATGTATCGAAGGTGCTCAA
SeV genome	cMYC	532	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG/TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG
House-Keeping gene	GAPDH	86	ACGACCCCTTCATTGACCTCAACT/ATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT

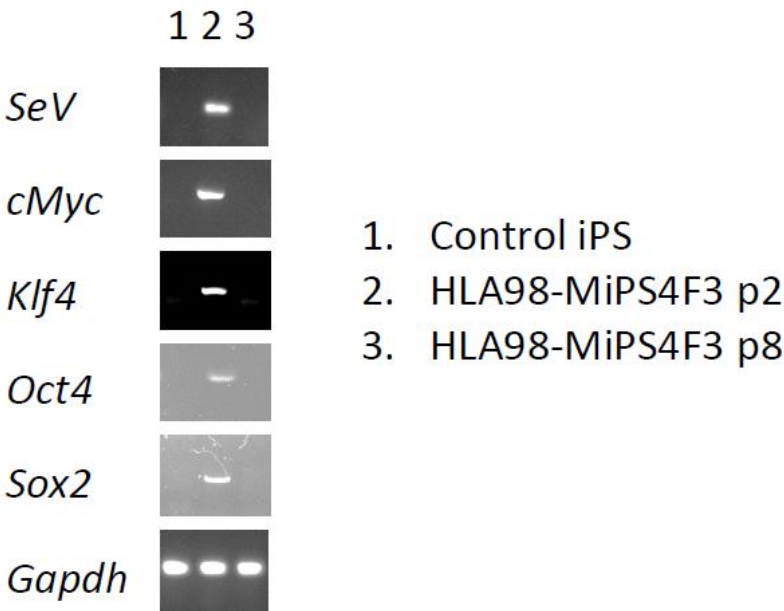
Procedure

Confirmation by RT-PCR of the exogenous reprogramming factors and Sendai virus vector silencing.

Primers used:

	Target	size (bp)	Forward/Reverse primer (5' -3')
SeV genome	SeV	181	GGATCACTAGGTGATATCGAGC/ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC
SeV genome	KOS	528	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC/ACCTTGACAATCCTGATGTGG
SeV genome	KLF4	410	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC/AATGTATCGAAGGTGCTCAA
SeV genome	cMYC	532	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG/TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG
House-Keeping gene	GAPDH	86	ACGACCCCTTCATTGACCTCAACT/ATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT

Resultado



The iPSCs line HLA98-MiPS4F3 are virus-free at p8. Viral genes are detected in the positive controls, which are the early passages (p2) of the same iPSC line but not in the p8

Anexo 8. Test de micoplasma

Annex 8. Mycoplasma test

Procedimiento

Confirmación mediante kit de detección basado en luciferasa de la ausencia de contaminación por micoplasma en el medio de cultivo de la línea celular.

Kit empleado:

- MycoAlertTM PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza #LT07-701)

Procedure

Confirmation by means of a luciferase-based detection kit of the absence of contamination by mycoplasma in the culture media of the cell line.

Kit used:

- MycoAlertTM PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza #LT07-701)

Resultado

LONZA Mycotest
Samples analyzed 30.06.22
B/A<1 means negative to Mycoplasma
B/A>1 means postive to Mycoplasma
Result: iPS cell culture free of mycoplasma

	Ratio B/A
HLA98-MiPS4F15 p15	0,024
Positive Control	13,564
Negative Control	0,037