

ANEXO A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR HDF-iPS-SV10 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia. (Test Fosfatasa alcalina, RT-PCR, Inmunocitoquímica)

Anexo 2: Diferenciación in vitro: formación EBs

Anexo 3: Cariotipo

Anexo 4: Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/SRT

Anexo 5: Test de integración y silenciamiento

Anexo 6: Test Micoplasma

Generación de células madre pluripotentes inducidas a partir de una muestra de células dermales de piel comerciales de un individuo adulto sano

Generamos hiPSC a partir de fibroblastos dérmicos comerciales (HDFa cat # 2320 , anteriormente #2310) ScienCell Research Laboratory) utilizando un kit basado en un sistema no integrativo. -Cytotune- iPS reprogramming Kit (Thermo Fisher).

Durante la reprogramación de se usaron los siguientes factores de reprogramación: CytoTune™ Sendai hOct3/4, CytoTune™ Sendai hSox2, CytoTune™ Sendai hKlf4, CytoTune™ Sendai hc-Myc. Se siguieron las condiciones de cultivos descritas en el manual y los protocolos de adaptación al medio E8-(Essential 8 medium de Thermo Fisher cat # A1517001. Entre las 3-4 semanas se observaron colonias similares a iPSC.

Obtuvimos colonias con aspecto de iPSC. Conseguimos seleccionar y expandir colonias de células que mostraban una morfología similar a iPSc. Se expandieron y caracterizaron para comprobar la expresión endógena de marcadores pluripotentes y la capacidad de diferenciación pluripotente *in vitro*.

ANEXO 1

Test de pluripotencia

a. Test de fosfatasa alcalina.

La actividad de la fosfatasa alcalina se analizó directamente utilizando el kit alkaline phosphatase blue membrane substrate solution kit' (Sigma) según las instrucciones del fabricante. Las colonias de las iPSC procedentes de los fibroblastos dermales HDFa, y en adelante **HDF-iPS-SV10** mostraron una tinción fuerte de fosfatasa alcalina (Figura 1)

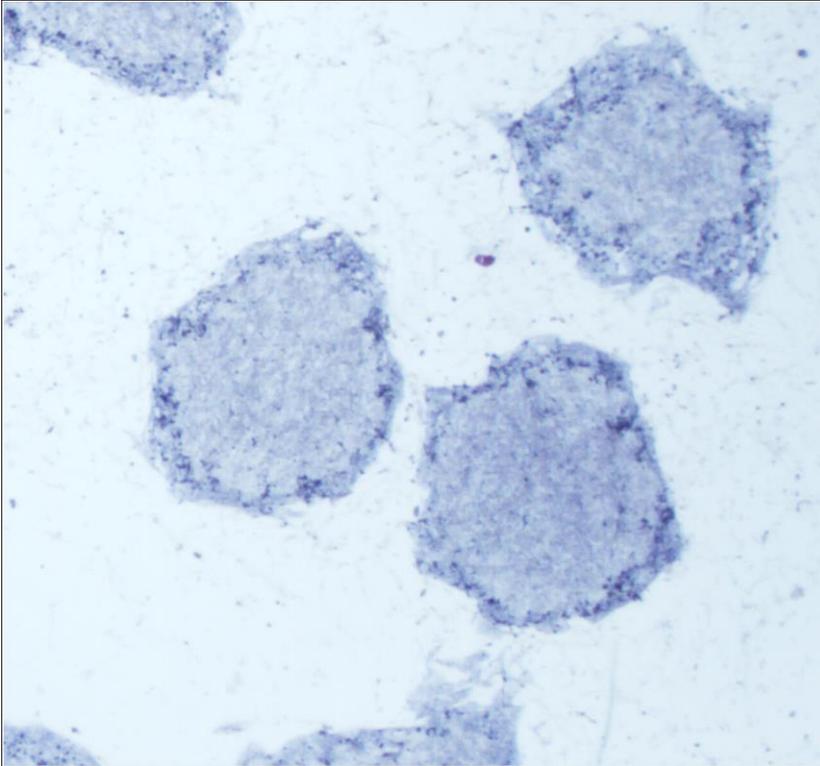


Figura 1. Tinción de fosfatasa alcalina de la línea **HDF-iPS-SV10**.

b. Test de detección de marcadores de pluripotencia mediante RT-PCR semi-cuantitativa.

El RNA de iPSC de la línea **HDF-iPSC-SV10** se aisló mediante el kit Direct-zol™RNAMiniPrep (Zymo), y se realizó transcripción reversa con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher) según instrucciones del fabricante. Se analizó la expresión de marcadores de pluripotencia mediante RT-PCR semi-cuantitativa los oligonucleótidos recomendados por Cytotune- iPS reprogramming Kit (Thermo Fisher)

La RT-PCR mostró que la línea **HDF-iPS-SV10** expresaba genes de pluripotencia entre los que se incluyen: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, y *MYCC*. Este perfil de expresión génica es comparable a otras líneas de células madre embrionarias humanas (ES4) (Figura 2).

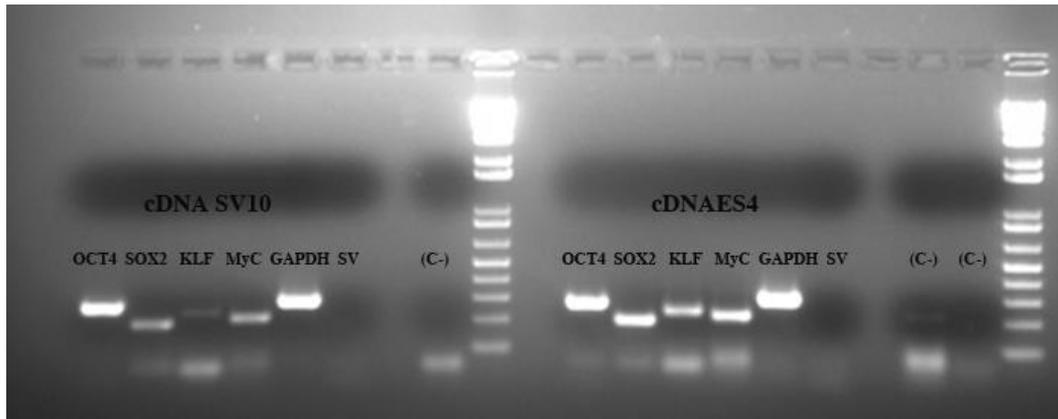


Figura 2. Expresión relativa de RNA de los genes de pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *MYCC* en la línea **HDF-iPS-SV10** y en células madre embrionarias humanas (ES4).

c. Test de detección de marcadores de pluripotencia mediante Inmuncitoquímica.

Para confirmar la expresión de los genes de pluripotencia realizamos inmunocitoquímica en la línea celular **HDF-iPS-SV10** usando los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal OCT34 (C-10) (SantaCruz, #SC-5279; 1:100), monoclonal NANOG (ThermoFisher, 14-5761-80, 1:100), monoclonal SSEA4 (Santa Cruz#SC-21704; 1:100) monoclonal TRA1-80 (Santa Cruz#SC-21706; 1:100). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron de la serie Alexa Fluor (Thermo Fisher, 1:400). Las imágenes se obtuvieron usando el microscopio confocal Nikon A1R.

La línea celular **HDF-iPS-SV10** mostró expresión de todos los marcadores de pluripotencia analizados: OCT4, NANOG, SSEA4 y TRA-1-80 (Figura 3).

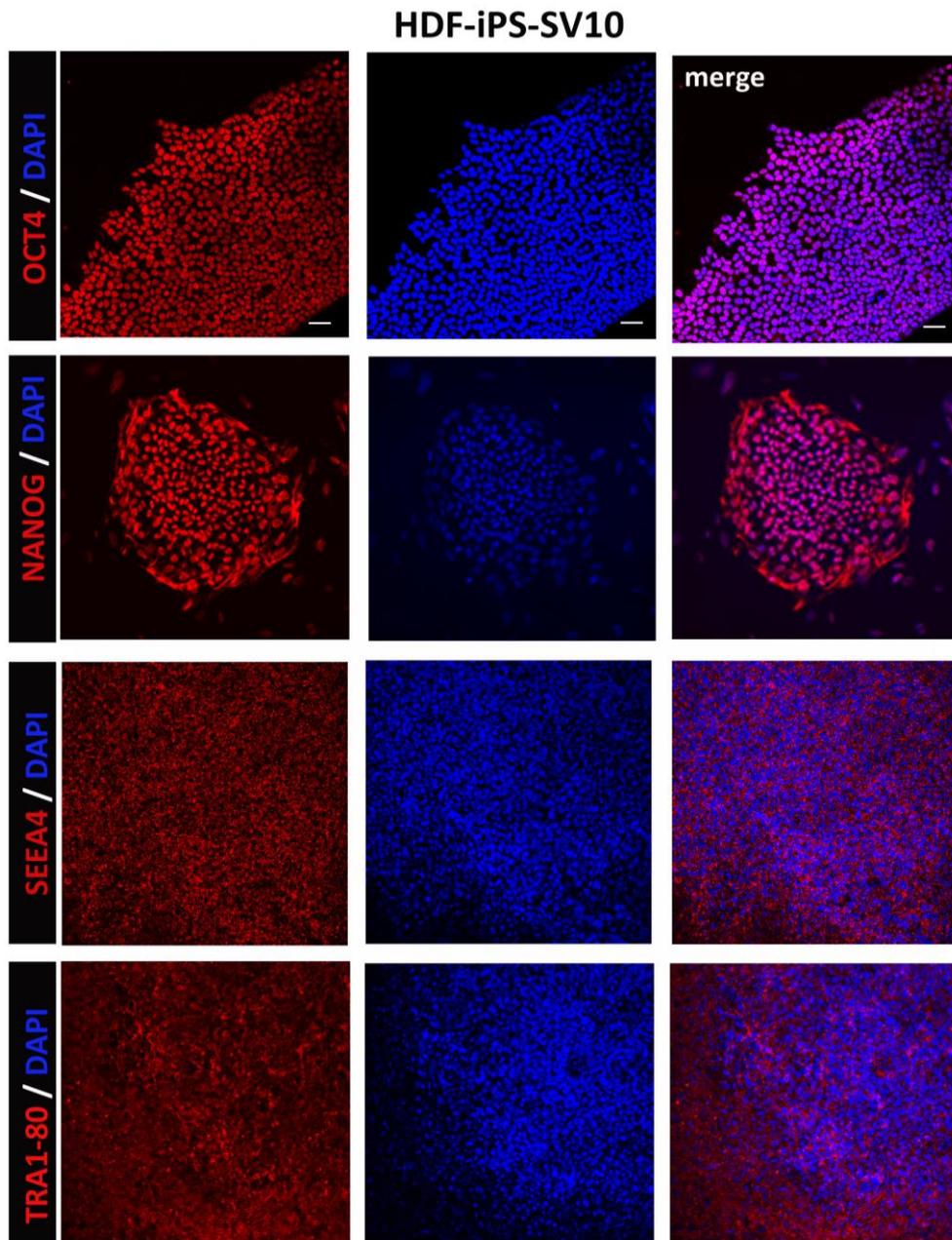


Figura 3. Inmunofluorescencia de la línea celular **HDF-iPS-SV10** que muestra la expresión de los factores de transcripción OCT4, NANOG, y los marcadores embrionarios SSEA4 y TRA 1-80.

ANEXO 2

Test de diferenciación *in vitro* (EBs).

a. Detección de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) en los *embryoid bodies* generados en placas de cultivo, mediante inmunocitoquímica. Mínimo un marcador por capa germinal.

Evaluamos el potencial de diferenciación de la línea **HDF-iPS-SV10**, tal y como está descrito en ¹. Las células **HDF-iPS-SV10** fueron capaces de formar cuerpos embrioides (EBs) que dieron lugar a derivados de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, actina de músculo liso (SMA); endodermo, α -fetoproteína (AFP) y ectodermo, Tuj1 (Figura 4). Para la detección por inmunocitoquímica las células crecieron en cámaras de plástico para cultivo y se fijaron en 4% PFA durante 20 min a RT. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti Smooth muscle actin, SMA-Cy3 (1:400, Sigma), rabbit α -fetoproteína (1:400; Dako), monoclonal Tuj1 (1:100; Covance) y rabbit GFAP (1:400; Dako), y los anticuerpos secundarios de la serie Alexa Fluor (Thermo Fisher, 1:400). Se obtuvieron las imágenes usando el microscopio confocal Nikon A1R.

HDF-iPS-SV10

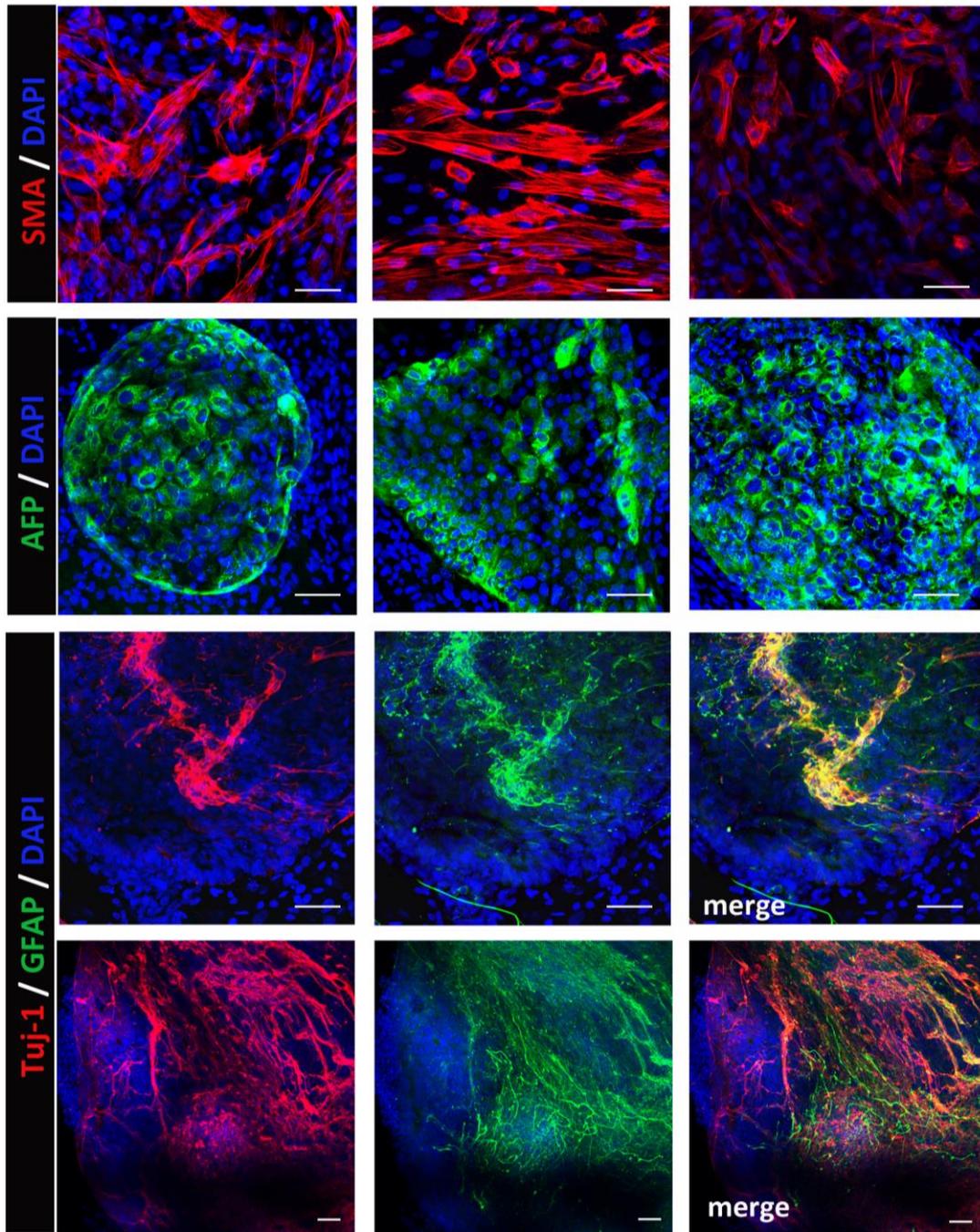


Figura 4. Diferenciación *In vitro* de la línea **HDF-iPS-SV10** en las tres capas primarias germinales (Mesodermo-SMA, Endodermo-AFP, tres imágenes diferentes, y Ectodermo-Tuj-1, rojo y GFAP en verde. La misma imagen se muestra en los tres canales).

ANEXO 3

Cariotipo. Convencional por bandas G.

El análisis citogenético mostró que la línea celular **HDF-iPS-SV10** presentó un cariotipo normal 46XX después de más de 10 pases, y pudiéndose mantener en cultivo por lo menos 20 pases (Figura 5). **FISH DEL 20q-**

Ya que se han observado varias metafases con lo que parecía material genómico extra, se decide realizar ensayo de FISH para comprobar la presencia de trisomía del cromosoma 20, evento frecuentemente descrito en cultivos de hESCs e iPSCs. Se ha realizado un estudio de citogenética molecular mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH) sobre núcleos interfásicos. Se han analizado 200 núcleos interfásicos.

Sonda utilizada: KREATECH KBI-10203

Tipo de sonda: Doble señal

Gen estudiado: Región 20q12

RESULTADO:

Patrones observados:

Patrón normal, con 2 señales verdes y dos señales rojas localizadas en el brazo largo del cromosoma 20, observado en el 100% de los núcleos.

CONCLUSION: Muestra NEGATIVA para la trisomía del cromosoma 20.

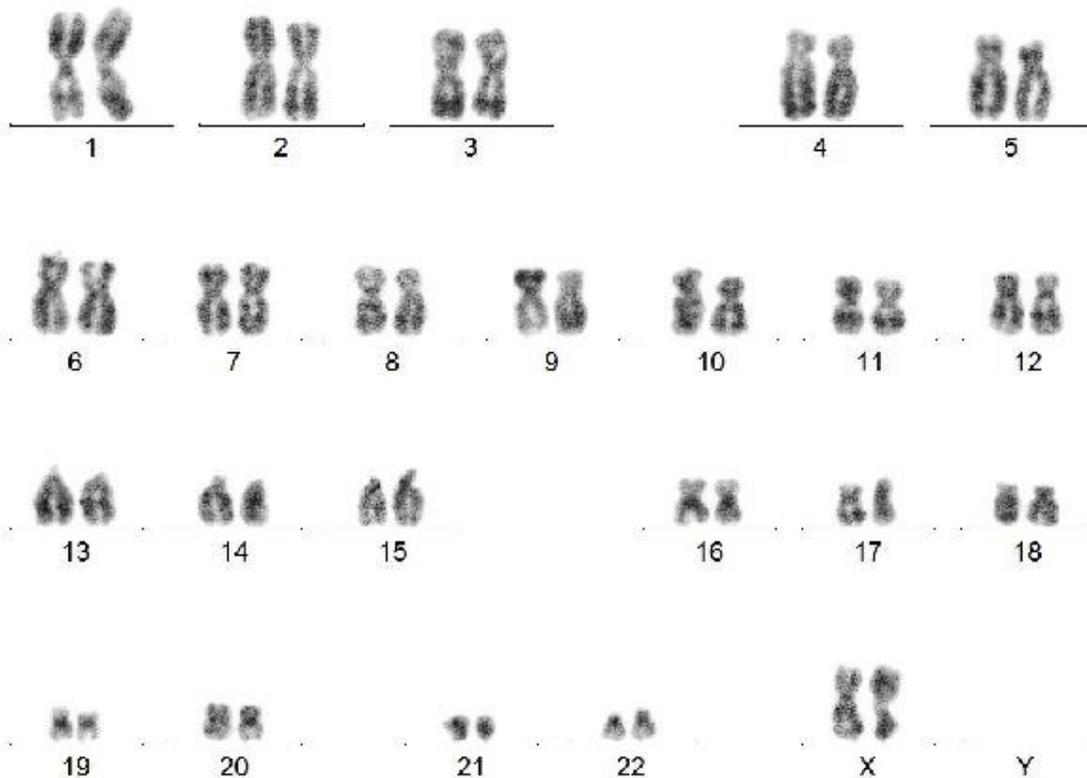


Figura 5. Cariotipado para la línea **HDF-iPS-SV10**. El cariotipo de bandas g de alta resolución indica un contenido cromosomal diploide normal femenino.

Anexo 4

Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular HDF-iPS-SV10

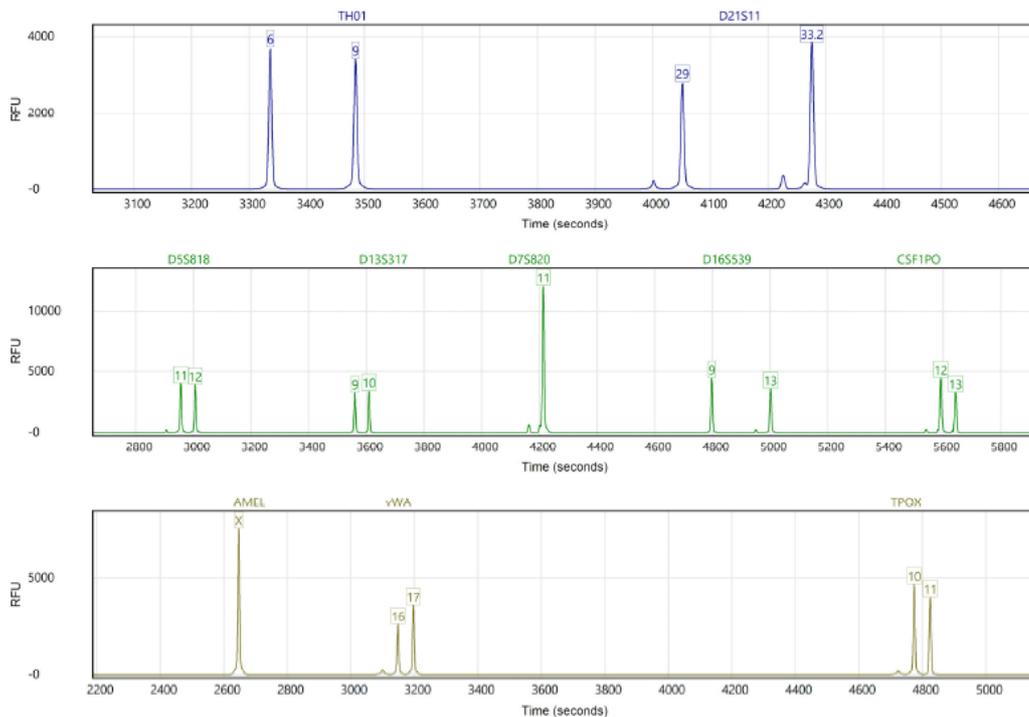
A continuación se muestran los datos obtenidos por el servicio de genómica del CNIO. 9 loci de repeticiones cortas en tandem (SRT), más Amelogenina para determinar el sexo fueron amplificadas mediante PCR con el kit GenePrint 10 (Promega) La línea celular fue analizada con un ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer. Los datos se analizaron usando un software Osiris v2.6 (NCBI,NIH)

Cell Line Authentication GenePrint® 10 Loci Service

Short tandem repeat (STR) profiling has been recommended by the American Type Culture Collection Standards Development Organization (ATCC SDO) Workgroup ASN-0002 as the best method currently available for human cell line authentication. A given STR profile is indicative only of the sample provided. Any subsequent manipulation of a cell line, including passages or treatments, is likely to allow genetic drift and may induce changes. A regular testing of all immortalised human cell lines is therefore suggested.

Background, methodology and details are provided in the Appendix.

Sample: "HDF_2320" Date: "10/08/2018" (datafile: 100818_str_HDF_2320_F11_085.fsa)



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	6, 9
D21S11	29, 33.2
D5S818	11, 12
D13S317	9, 10
D7S820	11
D16S539	9, 13
CSF1PO	12, 13
AMEL	X
vWA	16, 17
TPOX	10, 11

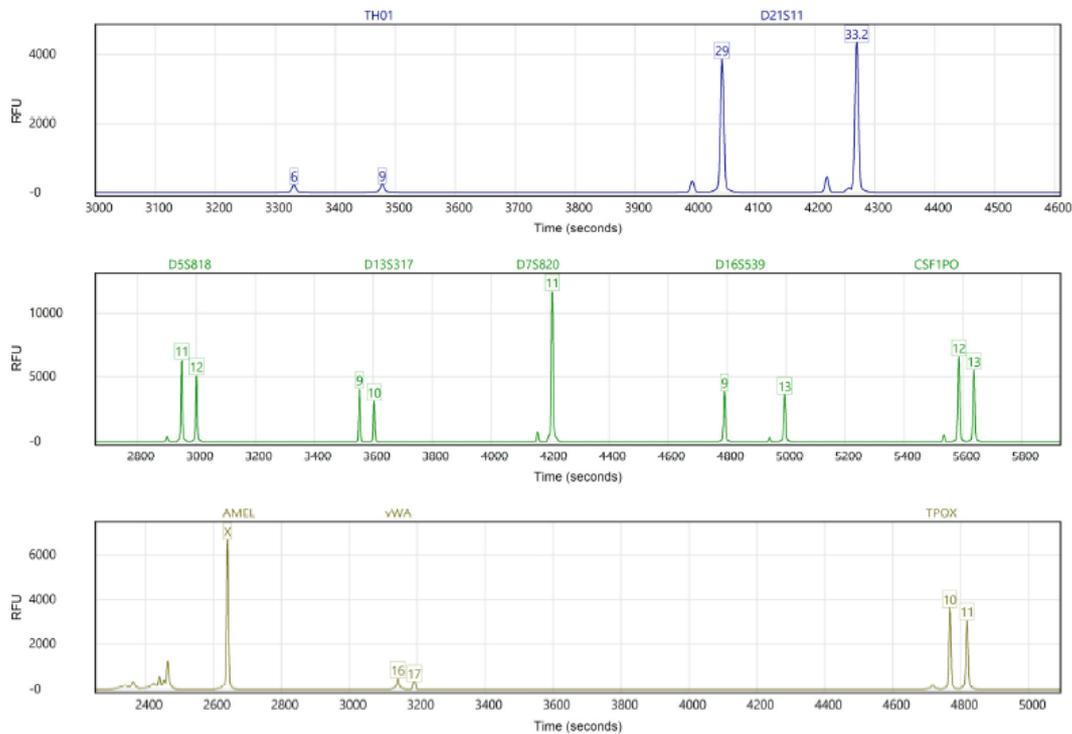
Most similar cell lines in the DSMZ STR Profile Database (<http://www.dsmz.de/fp/cgi-bin/str.html>). It includes data sets from ATCC, DSMZ, JCRB and RIKEN. Evaluation Value (EV) is defined as $[(\text{number of generated peaks cell line A})^2 / (\text{total number of peaks of cell line A+B})]$. The DSMZ tool counts 2 alleles per homozygous marker.

EV	Cell No.	Cell name	Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
		Query (Your Cell)	12,12	8,9	9,11	11,12	17,17	6,7	x,x	8,12	10,11
0.72(26/36)	CRL-7627	Hs 890.Sk	12,12	8,9	9,11	11,12	17,19	7,8	X,Y	9,12	11,13
0.72(26/36)	CRL-7628	Hs 890.T	12,12	8,9	9,11	11,12	17,19	7,8	X,Y	9,12	11,13
0.72(26/36)	RCB0584	SF8406	12,12	8,9	9,10	11,12	14,18	6,9	X,X	8,11	10,11

Any of these three cell lines share a similar percent match with the tested sample.

Percent Match = $(\text{Shared Alleles}) * 2 * 100 / [\text{Total } \neq \text{Alleles in (Test Sample + Reference Sample)}] = 12 * 2 / (15 + 17) = 75\%$
 The ATCC SDO criterion of counting only once the number of alleles in a homozygous marker is followed.

Sample: "SV10_p25" Date: "10/08/2018" (datafile: 100818_str_SV10_p25_G11_083.fsa)



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile
TH01	6, 9
D21S11	29, 33.2
D5S818	11, 12
D13S317	9, 10
D7S820	11
D16S539	9, 13
CSF1PO	12, 13
AMEL	X
vWA	16, 17
TPOX	10, 11

Appendix

STR loci consist of short, repetitive sequence elements 3-7 base pairs in length. These repeats are well distributed throughout the human genome. The number of copies of the repeat sequence varies with high frequency and constitutes a rich source of highly polymorphic markers.

STR profiling relies on a polymerase chain reaction (PCR)-based assay. Amplified DNA fragments of different sizes are distinguished from one another using fluorescence detection following electrophoretic separation. Alleles are eventually identified and assigned a numerical value after comparison to a set of size standards.

Allele Nomenclature

Profiling results are reported as the number of repeats deduced to be present at the different loci from the size of PCR amplicons. The number given to an allele indicates the number of repeats of the specific tetranucleotide tandem repeat. For example, an allele 32.2 of D21S11 means they are 32 copies of the corresponding repeat (4bp long) plus an extra 2 bases.

Profile stability

Cell lines in culture can lose or gain alleles with continued passages, or with treatments. As a result, when comparing results with published profiles or with ones obtained in another occasion, slight differences can be found. The overall similarity of two profiles with only a few changes (like a loss of one allele at a locus) can still be used to identify the genetic origin of the cell line. In fact, it has been stated that an 80% STR profile match discriminates effectively between unrelated cell lines, while allowing for possible genetic drift with passage in some cell lines (Ref 1).

Methodology

Nine short tandem repeat (STR) loci, plus Amelogenin as a tenth locus for gender determination, were PCR amplified with the GenePrint 10 kit (Promega). The cell line sample was subsequently analysed using an ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer. Data were analyzed using Osiris v2.6 software (NCBI, NIH). Appropriate positive and negative controls were run in parallel and confirmed.

GenePrint 10 system

The GenePrint® 10 System (Promega) allows co-amplification and three-color detection of the ASN-0002 loci (TH01, TPOX, vWA, Amelogenin, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 and D5S818) as well as D21S11. The likelihood that two individuals, who are not identical twins, share the same profile can be calculated based on previously determined allele frequencies. These loci collectively provide a genetic profile with a random match probability of 1 in 2.92×10^9 .

The GenePrint® 10 System Locus-Specific Information.				
STR Locus	Label	Chromosomal Location	GenBank® Locus and Locus Definition	Repeat Sequence ¹ 5' → 3'
TH01	FL	11p15.5	HUMTH01, human tyrosine hydroxylase gene	AATG (17)
D21S11	FL	21q11–21q21	HUMD21LOC	TCTA Complex (17)
D5S818	JOE	5q23.3–32	NA	AGAT
D13S317	JOE	13q22–q31	NA	TATC
D7S820	JOE	7q11.21–22	NA	GATA
D16S539	JOE	16q24–qter	NA	GATA
CSF1PO	JOE	5q33.3–34	HUMCSF1PO, human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene	AGAT
Amelogenin ²	TMR	Xp22.1–22.3 and Y	HUMAMEL, human Y chromosomal gene for Amelogenin-like protein	NA
vWA	TMR	12p13.31	HUMVWFA31, human von Willebrand factor gene	TCTA Complex (17)
TPOX	TMR	2p23–2pter	HUMTPOX, human thyroid peroxidase gene	AATG

¹The August 1997 report (18,19) of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics (ISFH) states, "1) for STR loci within coding genes, the coding strand shall be used and the repeat sequence motif defined using the first possible 5' nucleotide of a repeat motif; and 2) for STR loci not associated with a coding gene, the first database entry or original literature description shall be used".

²Amelogenin is not an STR but displays a 106-base, X-specific band and a 112-base, Y-specific band.

TMR = carboxy-tetramethylrhodamine
 FL = fluorescein
 JOE = 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein
 NA = not applicable

Data interpretation

Short Tandem Repeat (STR) analysis was performed as described in ANSI Standard (ASN-0002) by the ATCC Standards Development Organization (SDO) and in Ref 1. The Percent Match formula used in this report, $\text{Percent match} = (\text{number shared alleles} \times 2) / (\text{total number of alleles in the questioned profile} + \text{total number of alleles in the reference profile})$, is the "Tanabe evaluation value" (Ref 2).

To be certain that a cell line is authentic, the sample can be compared to another sample from the same donor. For many cell lines, another donor sample is not accessible. In those cases, comparison to a database with STR profiles from many different cell lines will give a high degree of confidence that the current sample is not misidentified.

STR profiling does not allow to distinguish between cell lines arising from the same donor. All cell lines from that donor will have the same, or highly similar, STR profiles. Cell lines from different tissues may be distinguishable using phenotypic markers, although both degree of differentiation and length of time in culture can also have an influence.

A small amount of STR profile variation may be seen between cultures derived from the same donor. This can be caused by genetic drift with passage, particularly in cell lines with microsatellite instability. Variation may also relate to laboratory differences in test methods or interpretation. It is important to apply match criteria (80 % match threshold) to allow for a small amount of variation in cultured samples.

Two alleles at a single locus should amplify with comparable efficiency, producing peaks of similar area and height. Preferential amplification of one allele over the other -heterozygous or allelic imbalances at some locus- may indicate genetic drift, where a subpopulation of the cells have lost an allele, a gene duplication event, aneuploidy or a chimeric cell population. Mixture of DNA from more than one sample can also cause the imbalance. The annotation "low-Peak Height Ratio", if present, indicates the peak is above background but showing a lower area, within 0.6, of that of the peak from the other STR allele/s.

More than two alleles in a locus or marker may be a result of chromosomal trisomy or may represent other localised duplication events or chimerism. If more than two alleles are observed in several loci it is suggestive of a mixed sample with several contributors.

References

1. Capes-Davis et al., *Int J Cancer* 132:2510, 2012.
2. Tanabe et al., *Tissue Culture Res Commun* 18:329, 1999.

Anexo 5

Test de integración/silenciamiento.

La integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación del Sendai Virus (OCT4, KLF4, SOX2, MYC) de la línea **HDF-iPS-SV10** se confirmó mediante RT-PCR utilizando los primers endógenos o con secuencia del SeV según el manual CytoTune iPS Reprogramming Kit. La integración se determinó con la reexpresión de genes de pluripotencia endógenos correctamente activados por los transgenes OCT4, KLF2, SOX2 y c-MYC (Figura 6, endógenos). Los transgenes se consideraron silenciados cuando el nivel de expresión era muy bajo o indetectable utilizando primers que contenían secuencias genómicas de SeV. Para obtener las secuencias de los primers ver el manual de CytoTune iPS Reprogramming Kit.

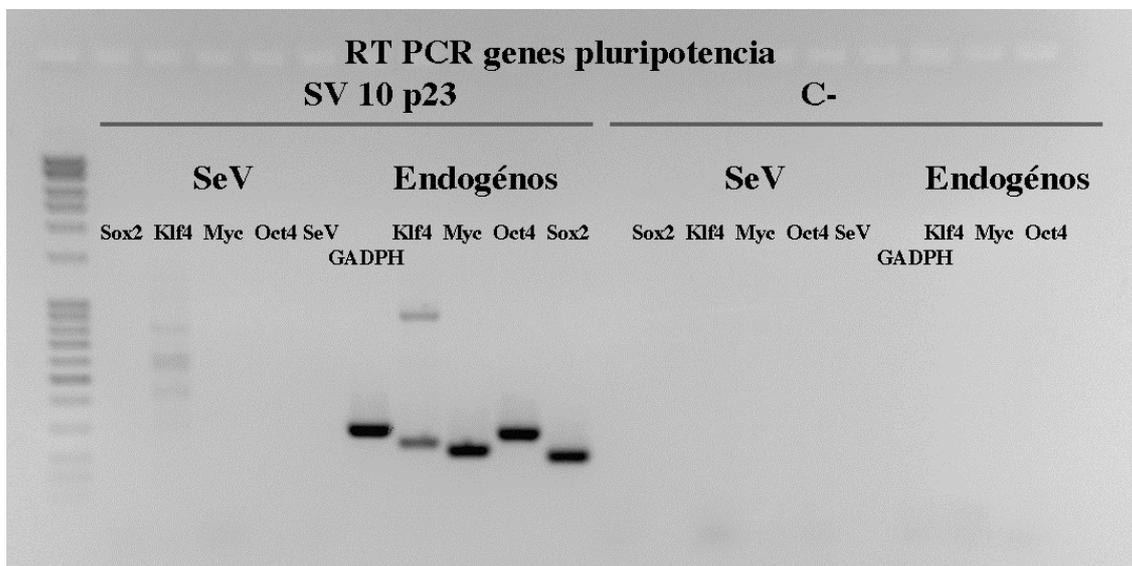


Figura 6. Integración y silenciamiento en la HDF-iPS-SV10 RT-PCR semi-cuantitativa de la línea **HDF-iPS-SV10** que muestran la re-expresión de los 4 genes endógenos activados por los transgenes Klf4, Myc-Oct4 y Sox2 (Endógenos), mientras que la expresión de los 4 genes silenciados (SeV), es prácticamente indetectable comparada con la expresión de GAPDH .

Anexo 6

Test Micoplasma

La línea **HDF-iPS-SV10** fue analizada para detección de micoplasma utilizando el Kit MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection, siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra resultó ser negativa para la presencia de micoplasma

1. HDF-iPS-SV10

2. Control positivo.

3. Control negativo.

MUESTRA	1	2	3
LECTURA A	2988	849	1128
LECTURA B	975	12163	72
RATIO	0,326305221	14,3262662	0,063829787

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

- < 4 resultado negativo.
- > 5 Resultado positivo.
- 4 - 5 Resultado dudoso. Repetir test en 24-48h.

CONCLUSION:

- LA MUESTRA ES NEGATIVA.

- Pase que se entrega para registro y banqueo: Máximo, pase 15.

HDF-iPS-SV10 pase

REFERENCES:

1. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodriguez-Piza I, Vassena R, Raya A, Boue S, Barrero MJ, Corbella BA, Torrabadella M, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using oct4 and sox2. *Cell stem cell*. 2009;5:353-357
2. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology*. 2008;26:1276-1284