ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR LVNC-FiPS-MIB1VF2 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia. (Test Fosfatasa alcalina, qRT-PCR, Inmunocitoquímica)
Anexo 2: Diferenciación in vitro: formación EBs
Anexo 3: Diferenciación in vivo: formación de teratomas
Anexo 4: Cariotipo
Anexo 5: Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/SRT
Anexo 6: Test de integración y silenciamiento
Anexo 7: Confirmación de diagnóstico genotípico
Anexo 8: Test Micoplasma

Modelo de cardiomiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (LVNC) en células madre pluripotentes inducidas de pacientes.

La cardiomiopatía no compactada del ventrículo Izquierdo (LVNC) es una cardiomiopatía caracterizada por excesiva trabeculación con profundas hendiduras en la pared ventricular. La clínica se presenta desde asintomática a insuficiencia cardiaca. Hemos identificado dos mutaciones en la línea germinal en el gen *MIND BOMB-1* (*MIB1*) humano, que codifica una ubiquitina ligasa E3 que media la endocitosis de los ligandos de Notch: Delta y Jagged. Estas mutaciones causan LVNC de forma autosómica dominante y como consecuencia, los individuos afectados muestran una reducción en la actividad de NOTCH1. Una de las mutaciones es una sustitución en heterocigosis del nucleótido G2827T del exón 20. Esta sustitución genera un cambio en el aminoácido Val943Phe. Este aminoácido está ubicado en una región hélice-hélice que separa los tres dominios ring fingers que median la interacción proteína-proteína y constituyen el sitio activo de la ubiquitina ligasa de MIB1. La otra mutación es una sustitución en heterocigosis del nucleótido C1587T en el exón 11 de *MIB1*. Este cambio genera un codón de parada anticipada en lugar de arginina (Arg530X) en la región de repeticiones de ankyrina de MIB1. Esta mutación se rastreó en dos generaciones de individuos afectados con LVNC, mostrando una co-segregación con LVNC, confirmando el carácter hereditario de esta enfermedad [1].

<u>Generación de células madre pluripotentes inducidas (induced pluripotency stem cell, iPSC) de un individuo con cardiomiopatía no compactada del ventrículo izquierdo</u>

Generamos hiPSC a partir de fibroblastos dérmicos obtenidos de biopsias de piel del brazo provenientes de un donante con cardiomiopatía no compactada del ventrículo izquierdo y una mutación en el nucleótido C1587T del exón 11 del gen MIB1 que provoca un STOP prematuro en la Arg530, utilizando el protocolo descrito en [2]. Brevemente, la reprogramación de fibroblastos se llevó a cabo empleando dos rondas de infección retroviral usando los siguientes factores de reprogramación: OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC. Entre los días 30 y 60 se observaron colonias que similares a iPSC.

Obtuvimos colonias con aspecto de iPSC del paciente con LVNC. 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

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 del paciente con LVNC, línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2** mostraron una tinción fuerte de fosfatasa alcalina (Figura 1)

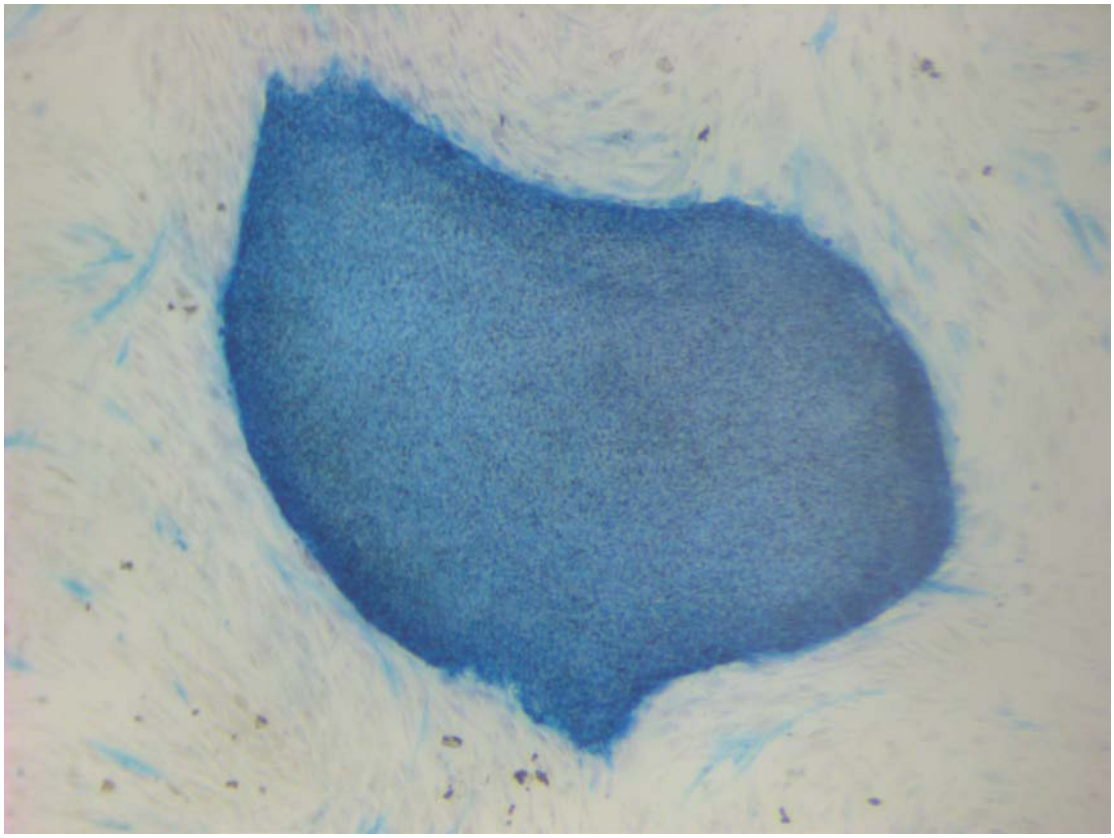


Figura 1. Tinción de fosfatasa alcalina de la línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2**

b. **Test de detección de marcadores de pluripotencia mediante qRT-PCR, inmunocitoquímica**.

El RNA de iPSC del paciente con LVNC se aisló y se analizó la expresión de marcadores de pluripotencia mediante RT-PCR cuantitativa. Los oligonucleótidos se obtuvieron a través de SIGMA (oligoarchitect).

La qRT-PCR mostró que la línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2** expresaba genes de pluripotencia entre los que se incluyen: *OCT4, KLF4, SOX2, REX1, CRIPTO y NANOG*. Este perfil de expresión génica es comparable a otras líneas de células madre embrionarias humanas (ES4), y está ausente en fibroblastos dérmicos humanos (HDF) (Figura 2).

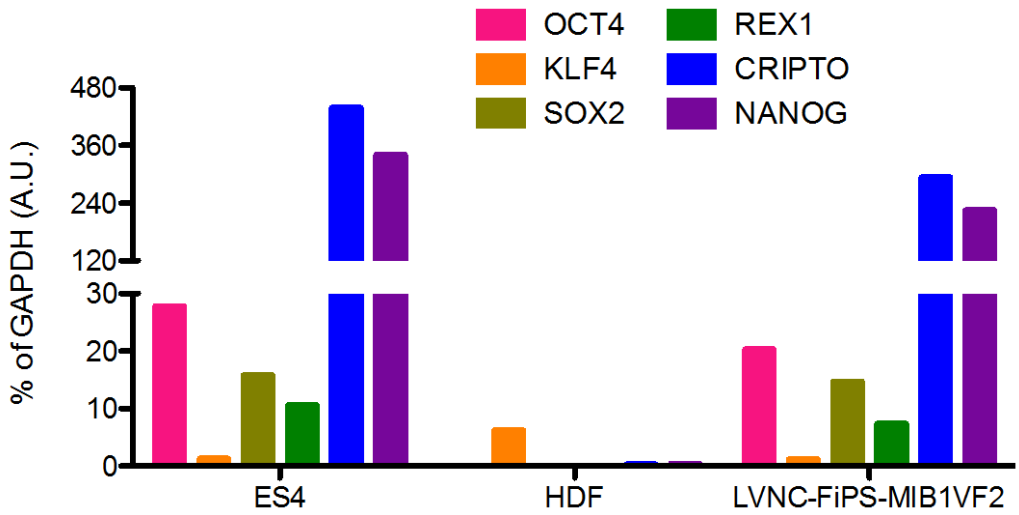


Figura 2. Expresión relativa de RNA de los genes de pluripotencia *OCT4, KLF4, SOX2, REX1, CRIPTO* y *NANOG* en células madre embrionarias humanas (ES4), fibroblastos dermales humanos (HDF) y **LVNC-FiPS-MIB1VF2**.

Para confirmar la expresión de los genes de pluripotencia realizamos inmunocitoquímica en la línea celular LVNC-FiPS-MIB1VF2 usando los siguientes anticuerpos primarios: OCT4 (C-10) (SantaCruz, #SC-5279; 1:100), NANOG (Everest Biotech, #EB06860; 1:100), TRA1-81 (EMD Millipore, MAB4381; 1:100) y SSEA4 (Developmental Studies Hybridoma Bank, #MC-813-70; 1:2) de la Universidad de Iowa. Los anticuerpos utilizados fueron de la serie Alexa Fluor de Invitrogen (1:500). Las imágenes se obrtuvieron usando el microscopio BX51 Olympus con una cámara DP71 Nikon y el programa CellA controller o el microscopio confocal Olympus Fluoview FV-1000.

La línea celular **LVNC-FiPS-MIB1VF2** mostró expresión de todos los marcadores de pluripotencia analizados: OCT4, NANOG, TRA-1-81 y SSEA4 (Figura 3).

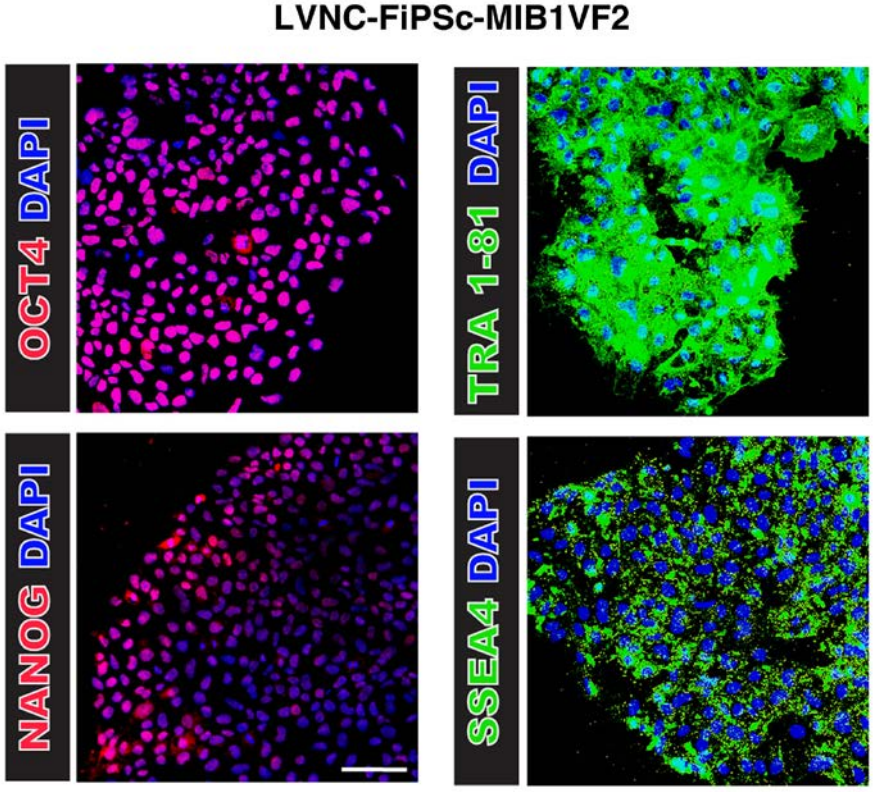


Figura 3. Immunofluorescencia de la línea celular **LVNC-FiPS-MIB1VF2** que muestra la expresión de los factores de transcripción OCT4, NANOG, y los marcadores embrionarios TRA 1-81 y SSEA4.

ANEXO 2

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 **LVNC-FiPS-MIB1VF2** tal y como está descrito en [3]. Las células **LVNC-FiPS-MIB1VF2** 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-fetoproteina (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. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: SMA-FITC, α-fetoprotein (1:400; Dako) y Tuj1 (1:500; Covance), y los anticuerpos secundarios de la serie Alexa Fluor de Invitrogen (1:500). Se obtuvieron las imágenes usando el microscopio BX51 Olympus con una cámara DP71 Nikon y el programa CellA controller o el microscopio confocal Olympus Fluoview FV-1000.

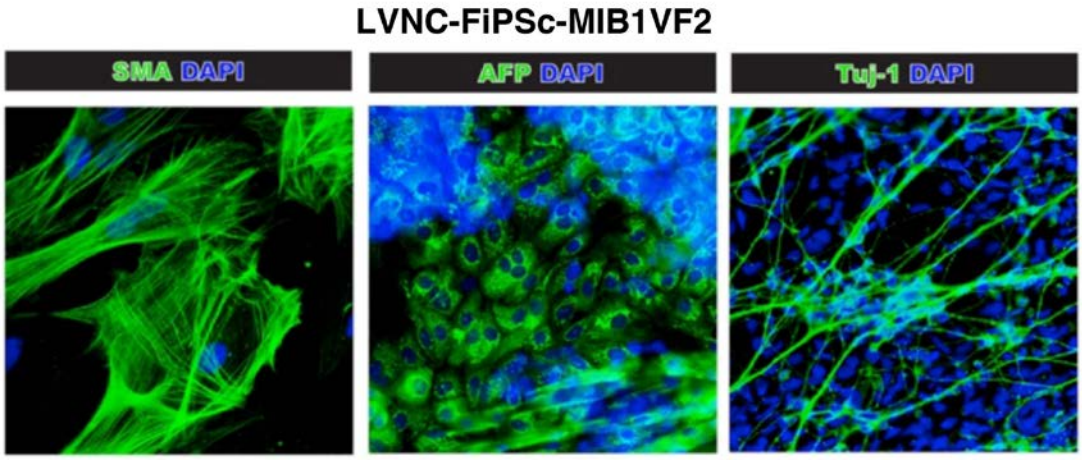


Figura 4. Diferenciación *In vitro* de la línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2** en las tres capas primarias germinales (Mesodermo-SMA, Endodermo-AFP, y Ectodermo-Tuj1).

ANEXO 3

3- Test de diferenciación in vivo (teratomas).

a. Detección de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) en los teratomas generados en ratones, mediante inmunohistoquímica sobre secciones del teratoma.

Formación de teratomas

Para analizar la capacidad de inducción del teratoma de las células **LVNC-FiPS-MIB1VF2** se usaron ratones beige SCID (inmunodeficiencia severa combinada) de Charles River Laboratories, tal y como se indica en [4]. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo siguiendo las pautas y protocolos previamente establecidos y aprobados por el instituto del comité ética sobre experimentación con animales en plena conformidad con las leyes y reglamentos al nivel nacional español y europeo.

La inyección de las células **LVNC-FiPS-MIB1VF2** en los ratones beige SCID inmunodeprimidos generaron teratomas intra-testiculares complejos. Pudimos identificar las estructuras y tejidos derivados de las tres capas germinales mediante tinción con H&E (Figura 5).

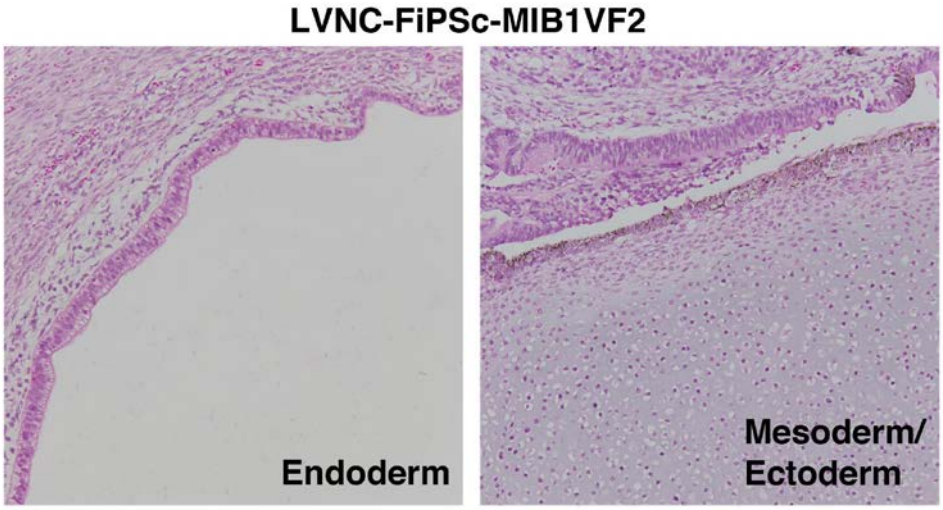


Figura 5. Diferenciación *In vivo* de la línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2** en las tres capas germinales primarias.

ANEXO 4

Cariotipo. Convencional por bandas G.

Realizamos un análisis citogenético como se describe en [3]. El análisis citogenético mostró que la línea celular **LVNC-FiPS-MIB1VF2** presentó un cariotipo normal 46XY después de más de 10 pases, y pudiéndose mantener en cultivo por lo menos 20 pases (Figura 6).

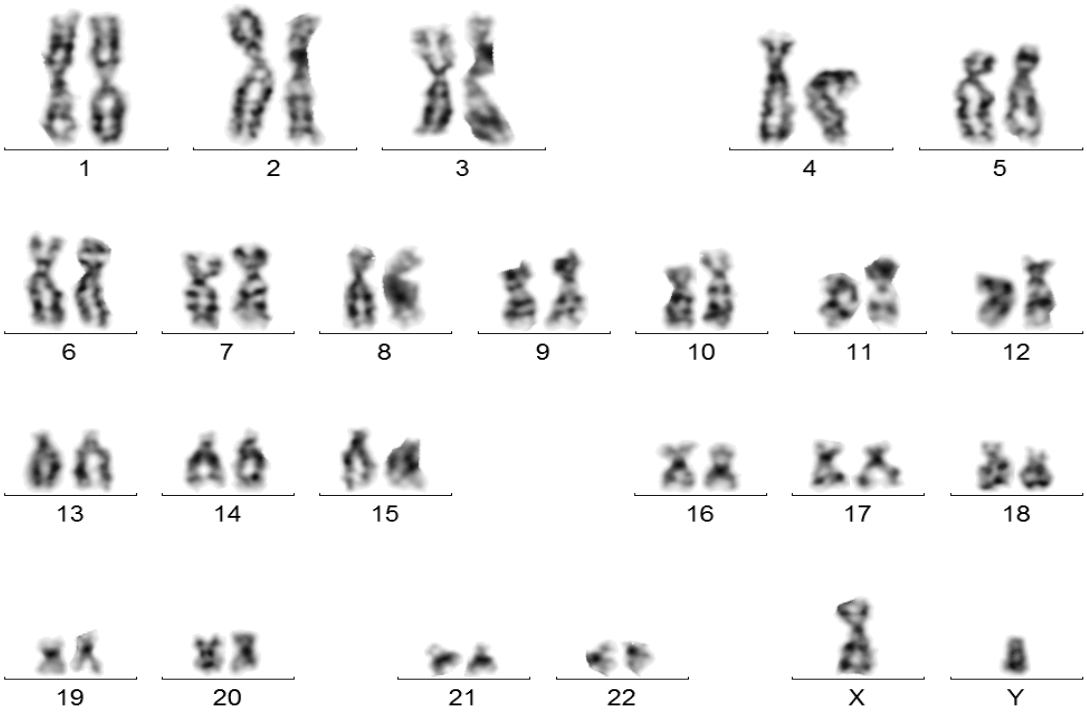


Figura 6. Cariotipado para la línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2**. El cariotipo de bandas G de alta resolución indica un contenido cromosomal diploide normal de varón.

Anexo 5

5- Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular LVNC-FiPS-MIB1VF2

A continuación se muestran los datos obtenidos por el servicio de genómica del CNIO

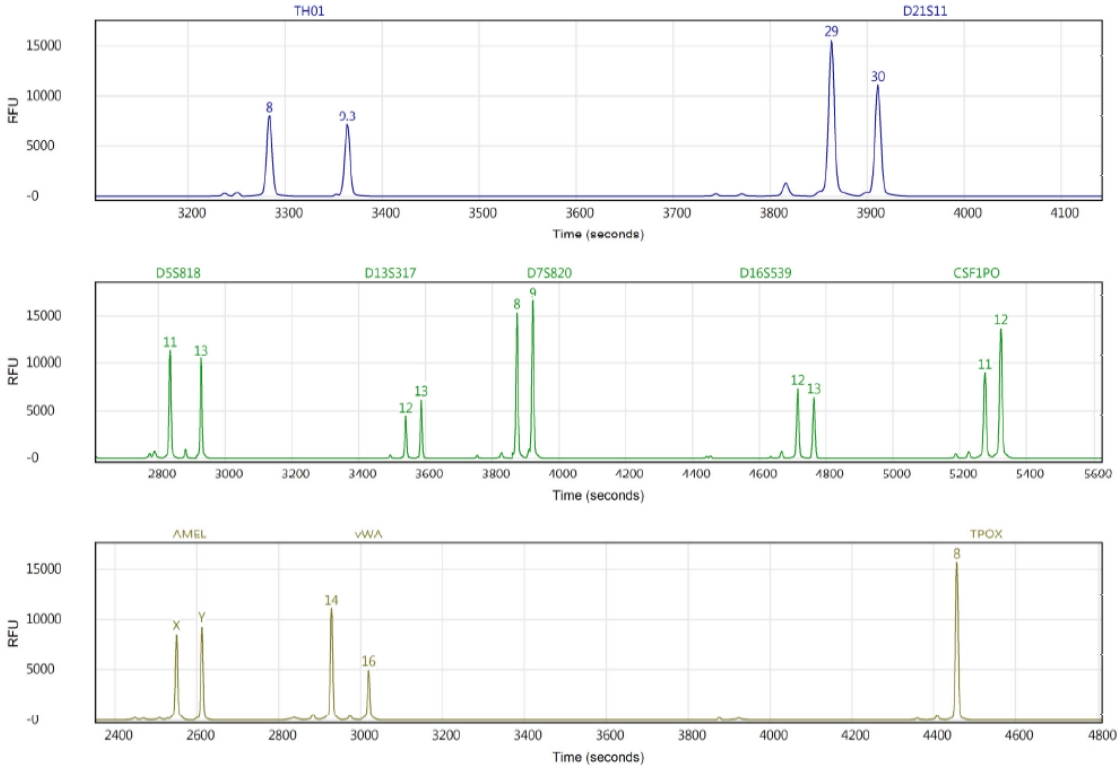
9 loci de repeticiones cortas en tamdem (SRT), más Amelogenina para determinar el sexo fueron amplificadas mediante PCR con el kit GenePrint 10 (Promega) La línea celular fue analizada con un ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer. Los datos se analizaron usando un software Osiris v2.6 (NCBI,NIH)

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: "AVF2" Date: "12/12/2016" (datafile: 151216str_AVF2_F08_054.fsa)



GenePrint10 Marker	Test Sample Profile	Ref Sample:
TH01	8, 9.3	
D21S11	29, 30	
D5S818	11, 13	
D13S317	12, 13	
D7S820	8, 9	
D16S539	12, 13	
CSF1PO	11, 12	
AMEL	X, Y	
vWA (*)	14, 16	
TPOX	8	

(*) Low-Peak Height Ratio. Heterozygous imbalance detected at locus vWA (peak 1/peak 2 ratio= 0.45)

CNIO Genomics Unit Ref.: 20161216_bprados-cnic

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 [(number of generated peaks cell line A)*2/(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)		*11,13*	*12,13*	*8,9*	*12,13*	*14,16*	*8,9.3*	*x,y*	*8,8*	*11,12*
0.78(28/36)	CRL-11611	PWR-1E	11,13	12,12	9,11	12,13	14,16	8,9.3	X,Y	8,11	10,12

Putative Ref Sample: PWR-1E (ATCC CRL-11611)
Percent Match = (Shared Alleles)*2*100/[Total ≠Alleles in (Test Sample + Reference Sample)] = 14*2/(17+17) = 82%
The *ATCC SDO* criterion of counting only once the number of alleles in a homozygous marker is followed.

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

[1]The 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".

[2]Amelogenin 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, Percent match = (number shared alleles × 2)/(total number of alleles in the questioned profile + 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 6

6- Test de integración/silenciamiento.

La integración y silenciamiento de los transgenes retrovirales (OCT4, KLF4, SOX2, MYC) de la línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2** se confirmó mediante qRT-PCR. La integración se determinó con la reexpresión de genes de pluripotencia endógenos correctamente activados por los transgenes OCT4, KLF2, SOX2 y c-MYC (Figura 8, endo). Los transgenes se consideraron silenciados cuando el nivel de expresión era muy bajo o indetectable, inferior al 3% de la expresión génica de GAPDH (Figura 8, trans).

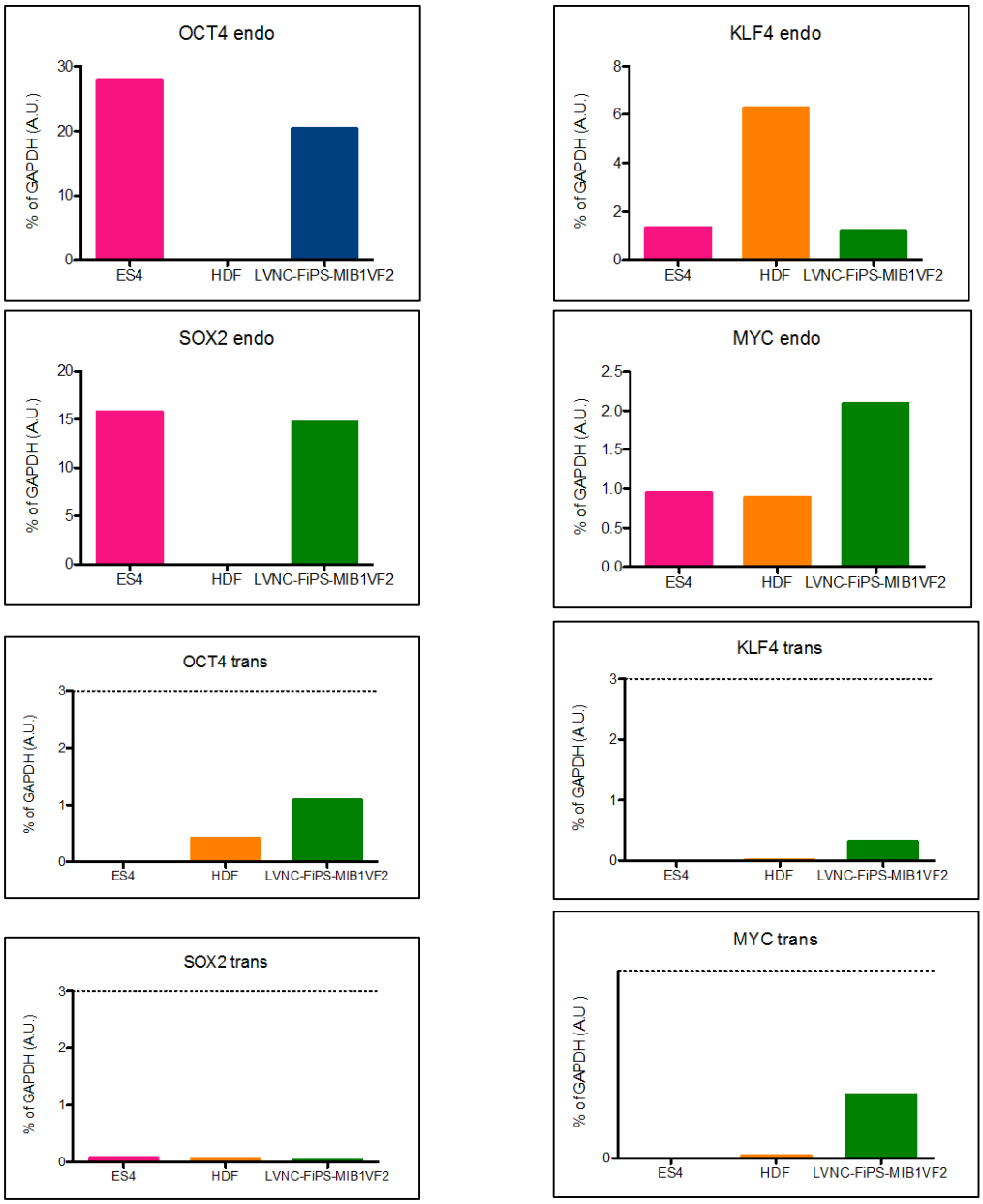


Figura 8. Integración y silenciamiento retroviral en la línea LVNC-FiPS-MIB1VF2. RT-PCR cuantitativa que muestra la reexpresión de los 4 genes endógenos activados por los transgenes retrovirales (Endo). Expresión de los 4 genes retrovirales silenciados por debajo del 3% de la expresión de GAPDH (trans).

Anexo 7

Confirmación de diagnóstico genotípico.

La secuenciación del ADN genómico de la línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2** derivada de un paciente con LVNC mostró un doble pico G/T en el nucleótido 2827 del exon 20 del gen de MIB1 indicando heterocigosis (Figura 9).

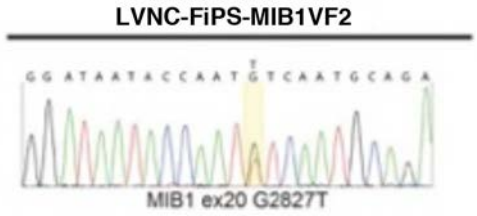


Figura 9. Secuencia del ADN genómico la línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2** mostrando un doble pico C/T en el nucleótido 1587 del exón 11 del gen MIB1.

Anexo 8

Test Micoplasma

La línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2** fue analizada para un test de micoplasma mediante PCR. Las muestras resultaron ser negativas para la presencia de micoplasma (Figura 9)

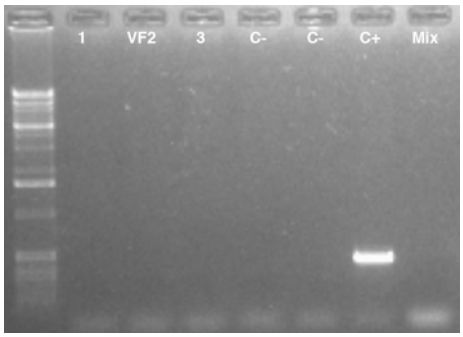


Figura 9. PCR para detectar micoplasma en la línea **LVNC-FiPS-MIB1VF2 (Carril 2, VF2)**, mostrando que la muestra está libre de micoplasma. (Carriles 1 y 3, otras muestras); carriles C- controles negativos; C+ control positivo.

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

LVNC-FiPS-MIB1VF2 pase 5

REFERENCES:

1. Luxan G, Casanova JC, Martinez-Poveda B, Prados B, D'Amato G, MacGrogan D, Gonzalez-Rajal A, Dobarro D, Torroja C, Martinez F, Izquierdo-Garcia JL, Fernandez-Friera L, Sabater-Molina M, Kong YY, Pizarro G, Ibanez B, Medrano C, Garcia-Pavia P, Gimeno JR, Monserrat L, Jimenez-Borreguero LJ, de la Pompa JL. Mutations in the notch pathway regulator mib1 cause left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Nat Med*. 2013;19:193-201
2. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castella M, Rio P, Sleep E, Gonzalez F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surralles J, Bueren J, Izpisua Belmonte JC. Disease-corrected haematopoietic progenitors from fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009;460:53-59
3. 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
4. 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