

GRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Desarrollo de estrategias para el estudio del papel de la proteína 14-3-3 ζ en la fisiopatología de la leucemia linfocítica crónica.

Development of strategies for studying the role of the 14-3-3-3 ζ protein in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia.

Autor/a: Ane Ortega Fernández

Director/a: Carlos Pipaón González

Co-director/a: Lucrecia Yáñez San Segundo

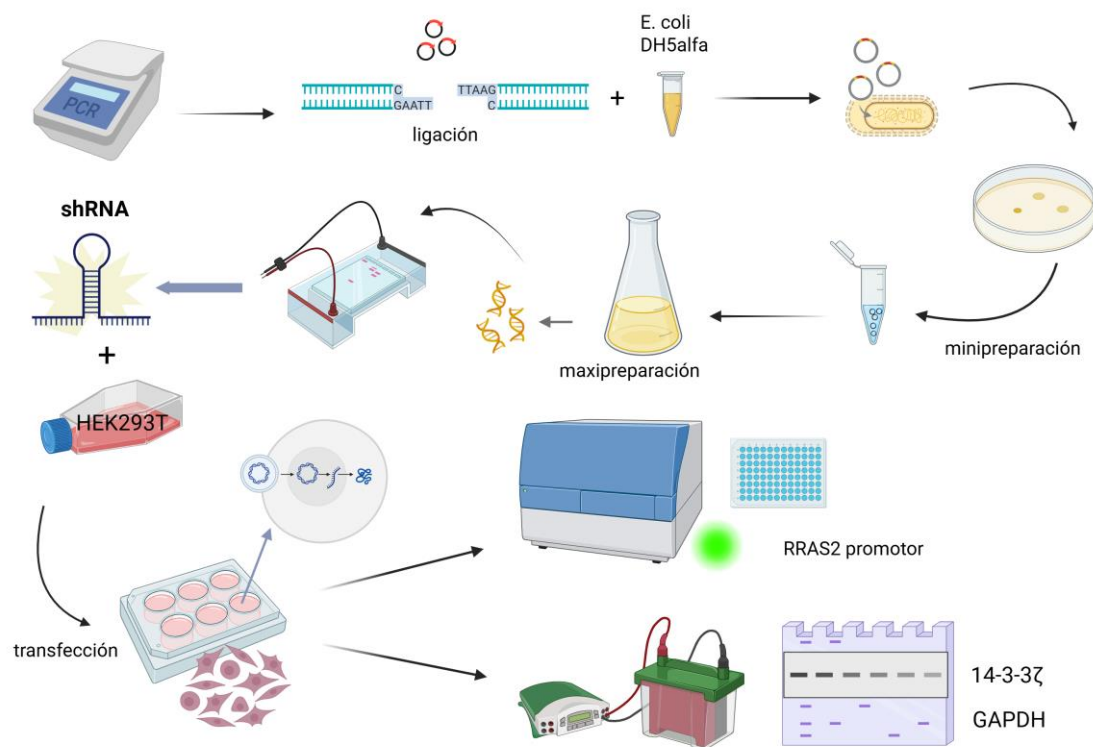
Santander, 8 de Junio de 2025

Índice

Título	1
Resumen Gráfico	1
Autores	1
Resumen	2
Abstract	3
Palabras Clave.....	3
Introducción	4
Resultados	6
Análisis de la expresión génica de YWHAZ tras la inhibición de la traducción con Rohinitib.....	6
Construcciones de interferencia contra YWHAZ.....	7
Comprobación de construcciones.....	9
Regulación de la actividad transcripcional del promotor de RRAS2 mediante 14-3-3ζ, ERK2 y RRAS2.4.....	10
Discusión	13
Metodología	14
Agradecimientos	20
Bibliografía	20
Información Suplementaria	22

Desarrollo de estrategias para el estudio del papel de la proteína 14-3-3 ζ en la fisiopatología de la leucemia linfocítica crónica.

RESUMEN GRÁFICO



AUTORES

Ane Ortega Fernández, Carlos Pipaón González, Lucrecia Yáñez San Segundo

Correspondencia: carlos.pipaon@scsalud.es

Desarrollo de estrategias para el estudio del papel de la proteína 14-3-3ζ en la fisiopatología de la leucemia linfocítica crónica.

Ane Ortega Fernández^{1,2}, Carlos Pipaón Gonzalez^{1,2}, Lucrecia Yáñez San Segundo^{1,2}

¹Departamento Laboratorio de Hematología Molecular, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla e Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL).

²Universidad de Cantabria (UC), Santander, España

* Correspondencia: carlos.pipaon@scsalud.es

RESUMEN

La proteína 14-3-3ζ, codificada por el gen YWHAZ, participa en múltiples rutas de señalización celular y se ha asociado con procesos tumorales incluida la leucemia linfocítica crónica (LLC), aunque su función exacta no está clara. En este estudio, se confirmó la sobreexpresión de YWHAZ en linfocitos B de pacientes de LLC respecto a los de donantes sanos y estudiamos la posible elevación de su traducción en aquellas.

Para estudiar la función de 14-3-3ζ, se diseñaron shRNAs específicos para silenciar la expresión de YWHAZ y evaluar sus consecuencias funcionales. Tras validar el silenciamiento por western blot, se utilizaron las construcciones para tratar de dilucidar la influencia de 14-3-3ζ en diversos aspectos moleculares de la LLC. Ensayos de luciferasa mostraron que YWHAZ reprime la transcripción del gen RRAS2, considerada la principal causa de la LLC, posiblemente modulando la ruta de ERK2, independientemente del estado de modificación en la lisina 177. En conjunto, estos hallazgos sugieren que 14-3-3ζ actúa como represor de genes clave en la LLC y podría tener potencial como diana terapéutica.

ABSTRACT

The 14-3-3 ζ protein, encoded by the YWHAZ gene, is involved in multiple cellular signaling pathways and has been associated with tumor processes, including chronic lymphocytic leukemia (CLL), although its exact role remains unclear. In this study, YWHAZ overexpression was confirmed in B lymphocytes from CLL patients compared to those from healthy donors, and we investigated the potential increase in its translation in these cells.

To study the function of 14-3-3 ζ , specific shRNAs were designed to silence YWHAZ expression and assess the resulting functional consequences. After validating the silencing by western blot, the constructs were used to help elucidate the influence of 14-3-3 ζ on various molecular aspects of CLL. Luciferase assays showed that YWHAZ represses the transcription of the RRAS2 gene, considered the main driver of CLL, possibly by modulating the ERK2 pathway, independently of the modification status of lysine 177.

Taken together, these findings suggest that 14-3-3 ζ acts as a repressor of key genes in CLL and could have potential as a therapeutic target.

PALABRAS CLAVE

Leucemia linfocítica crónica, 14-3-3 ζ , RRAS2, shRNA, Rohinitib.

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfocítica crónica (LLC), es la leucemia más frecuente en adultos en los países occidentales.¹ Se trata de una neoplasia caracterizada por una acumulación y proliferación de linfocitos B maduros.² Estos linfocitos B maduros, presentan un fenotipo característico y tienden a infiltrarse en la sangre, la médula ósea y los tejidos linfoides.³ ⁴ Suele manifestarse en pacientes de edad avanzada y muestra una evolución clínica muy variable.⁵ Además, afecta con mayor frecuencia a hombres que a mujeres.

A lo largo de los años, el abordaje terapéutico de la leucemia linfocítica crónica ha evolucionado significativamente y actualmente, existen diversas opciones terapéuticas. Aunque la quimioterapia ha sido el tratamiento estándar para los pacientes con LLC durante décadas, los avances científicos han permitido el desarrollo de nuevas terapias dirigidas, como los inhibidores de BCL2 o los inhibidores de BTK.^{5 3} No obstante, a pesar de los grandes avances, aún no se comprende por completo los mecanismos moleculares de esta enfermedad.

La secuenciación del genoma en pacientes con LLC ha permitido identificar mutaciones en genes como NOTCH1, SF3B1, BIRC3 y MYD88. Sin embargo, estas mutaciones están presentes en menos del 15% de los pacientes, lo que limita su utilidad para explicar la fisiopatología de la LLC.⁶

En contraste, un estudio reciente demostró que la sobreexpresión de RRAS2 reproduce el fenotipo característico de la LLC en modelos murinos. Se ha observado que la sobreexpresión del gen RRAS2 wild type está presente en hasta el 82% de los pacientes con LLC. Este hallazgo destaca la importancia de RRAS2 en la patogénesis de la LLC y su posible interacción con otras proteínas clave en la progresión tumoral.^{7 8}

Asimismo, diversos estudios han puesto en evidencia que, los niveles de expresión de proteínas en la LLC no siempre se correlacionan con los niveles de ARNm, lo que sugiere un papel importante de las modificaciones postraduccionales (PTMs) y el control de la traducción en la fisiopatología de la enfermedad.³

En este contexto, las modificaciones tipo ubiquitina, como la NEDDilación, han adquirido un interés creciente. Las modificaciones postraduccionales de proteínas, son alteraciones químicas que sufren las proteínas después del proceso de traducción, debido a la unión de ciertos grupos bioquímicos a su estructura.⁹ La NEDDilación consiste en la unión covalente del péptido NEDD8 a residuos de lisina de proteínas diana, regulando así funciones esenciales para la célula como la estabilidad, localización y actividad de estas proteínas.³

En pacientes con LLC, se ha observado una elevación de la NEDDilación en células B malignas, afectando a proteínas involucradas en rutas celulares fundamentales. Además, la inhibición farmacológica de este proceso mediante el compuesto MLN4924 (Pevonedistat) ha demostrado efectos citotóxicos significativos en ensayos ex vivo, lo que refuerza la hipótesis de que estas modificaciones desempeñan un papel activo en la supervivencia y progresión de las células malignas en la LLC.³

En este marco, adquieren especial relevancia las proteínas 14-3-3, que conforman una familia altamente conservada de moléculas con un peso molecular aproximado de 30kDa. Se trata de proteínas que forman dímeros, altamente conservadas, y presentes exclusivamente en eucariotas, que se unen a proteínas fosforiladas.¹⁰ Esta familia incluye siete isoformas, cada una con una localización específica en los tejidos y funciones particulares según la isoforma. En los últimos años, se ha asociado la regulación de estas isoformas con diversos tipos de cáncer, no obstante, aún se requiere una comprensión más profunda sobre su relevancia clínica y biológica.¹¹

Dentro de esta familia, encontramos la isoforma ζ , que es la proteína codificada por el gen YWHAZ, y destaca por su papel central en numerosas vías de transducción de señales. Se ha demostrado que YWHAZ se encuentra frecuentemente sobreexpresado en numerosos tipos de cáncer y que está ampliamente implicado en la progresión tumoral.^{11 12 13} Además, se ha visto que 14-3-3 ζ está altamente modificada en la LLC, tanto por ubiquitina como por NEDD8.

La proteína 14-3-3 ζ cumple una función esencial en la proliferación y crecimiento celular de diversos tumores hematológicos. En el mieloma múltiple se ha visto que el silenciamiento de 14-3-3 ζ provoca una notable reducción en la proliferación celular, lo que resalta que podría ser una diana terapéutica en varios tumores hematológicos.¹⁴ De manera similar, se ha observado que en la LLC puede ocurrir una posible implicación de 14-3-3 ζ en los mecanismos de supervivencia de las células B malignas, lo que sugiere que esta proteína podría desempeñar un rol relevante en la fisiopatología de esta neoplasia.

Se ha demostrado que 14-3-3 ζ interactúa físicamente con la proteína Stat3, un factor de transcripción que está constitutivamente activo en distintos tipos de cáncer, entre ellos el mieloma múltiple, leucemia y linfoma. Esta interacción depende de la fosforilación de Stat3 en el residuo Ser727, y la mutación de esta serina por una alanina impide la unión entre ambas proteínas.¹³

También se ha visto que la interacción entre Wnt5a, ROR1 y 14-3-3 ζ , favorece procesos como la migración, crecimiento y supervivencia de las células en la leucemia linfocítica crónica. Wnt5a estimula la activación de ROR1 (un receptor de membrana de células B leucémicas) e inicia una cascada de señalización. Una vez está ROR1 activado, 14-3-3 ζ se une a este, y esta unión es clave para formar el complejo llamado ARHGEF2. Esta interacción desencadena la activación de RhoA y Rac1, lo que impulsa la migración y expansión celular en la LLC.¹⁵

Aunque aún se desconoce el papel exacto de 14-3-3 ζ en la leucemia linfocítica crónica, así como el de su NEDDilación o su ubiquitinación, la evidencia actual sugiere que podría desempeñar un papel funcional en su fisiopatología. Por eso el objetivo de este proyecto va enfocado a generar construcciones de interferencia para estudiar el efecto de la reducción de su expresión.

RESULTADOS

Expresión de YWHAZ en LLC y linfocitos B sanos

Como primera aproximación al estudio del papel que desempeña 14-3-3ζ en la leucemia linfocítica crónica (LLC), estudiamos su expresión en linfocitos B de pacientes y la comparamos con la de linfocitos B de donantes sanos. Además, dado que la traducción está regulada de forma aberrante en la LLC, estudiamos el efecto que un inhibidor del factor de iniciación de la traducción eIF4A1 (Rohinitib) tiene sobre dicha expresión. La inhibición de la traducción induce el bloqueo de la degradación de los mRNAs asociada a su traducción. Así, se ha demostrado que en la LLC Rohinitib induce una acumulación de mRNAs relevantes, como MYC, Mcl-1, NFKB1A o kinasas de la señalización del receptor de célula B.

En un primer ensayo, y con fines didácticos, analizamos muestras de tres pacientes tratadas con Rohinitib o sólo con el disolvente (DMSO) como control, mediante RT-PCR semicuantitativa. Se analizó la expresión relativa de YWHAZ, pero también la de los genes TP53, NEDD1, LYN, EIF4A1 y PDCD4, normalizados frente al gen de referencia β-actina. En términos generales, se observó una tendencia al aumento en la expresión de varios genes tras el tratamiento con Rohinitib. (Figura 1A) No obstante, este efecto no fue uniforme en todos los pacientes, reflejando una cierta variabilidad individual. De forma interesante, a diferencia del resto de genes evaluados, YWHAZ mostró una disminución en su expresión tras el tratamiento.

En otro grupo de pacientes, se analizó la expresión del gen YWHAZ mediante RT-PCR cuantitativa en muestras de linfocitos B de donantes sanos y linfocitos de pacientes con leucemia linfocítica crónica. Estos fueron tratados con DMSO (control) o con Rohinitib (RHT). La expresión se normalizó frente a la de β-actina. Se observó un incremento en los niveles de YWHAZ tras el tratamiento con Rohinitib. (Figura 1B) Este efecto fue más notable en las muestras de linfocitos B de pacientes con LLC, que en los donantes sanos. En las muestras de linfocitos B sanos, no se vio diferencia entre los tratados con DMSO y los tratados con Rohinitib. Sin embargo, la dispersión de los datos indica cierta variabilidad entre las muestras de pacientes, pero la tendencia general es clara, y se podría decir que Rohinitib incrementa la expresión de YWHAZ.

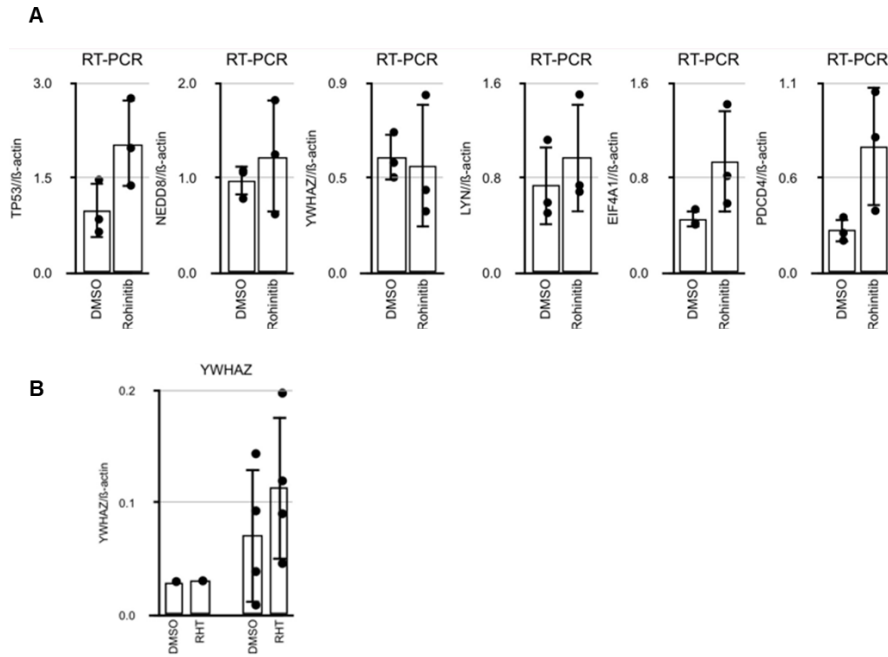


Figura 1. Análisis de la expresión génica de YWHAZ tras la inhibición de la traducción con Rohinitib.

(A) Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de YWHAZ y otros genes relacionados (TP53, NEDD1, LYN, EIF4A1 y PDCD4) en linfocitos de donantes sanos y linfocitos B de pacientes con LLC tratados con DMSO (control) o con Rohinitib. **(B)** Análisis por RT-qPCR de la expresión relativa de YWHAZ en donantes sanos y linfocitos B de pacientes con LLC, tratados con DMSO o con Rohinitib. La expresión está normalizada frente a β -actina.

Generación de construcciones de interferencia contra YWHAZ.

Con la idea de analizar el papel funcional de la proteína 14-3-3 ζ (codificada por el gen YWHAZ) en la leucemia linfocítica crónica (LLC), se diseñó una estrategia de silenciamiento génico basada en RNA de interferencia (shRNA). El principal objetivo de este trabajo era producir unas construcciones de interferencia para reducir la expresión de esta proteína y aportar datos sobre su efecto funcional en células de la LLC.

Para ello, se procedió al clonaje de dos secuencias específicas de shRNA dirigidas contra YWHAZ, en el vector pLKO. (Figura 2) Una vez emparejados y ligados los oligonucleótidos en el vector, se transformaron bacterias con las reacciones. El DNA de las colonias obtenidas, extraído mediante minipreparaciones de DNA, se comprobó por su patrón de restricción con enzimas de restricción específicas y resolución de los fragmentos en gel de agarosa, para ver si el inserto se había integrado correctamente en el plásmido. (Figura 2) Las colonias que resultaron positivas (que habían introducido el inserto) se crecieron a gran escala para hacer una maxipreparación de DNA, con vistas a tener suficiente cantidad de los plásmidos y de alta pureza para ser utilizados en los experimentos de transfección. Los plásmidos purificados se cuantificaron y se analizó su patrón de restricción y se secuenciaron por la técnica Sanger. (Figura 2) Estas construcciones fueron posteriormente utilizadas en diferentes ensayos funcionales para estudiar el impacto del silenciamiento de YWHAZ sobre la actividad transcripcional y la fisiología celular en modelos de LLC.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

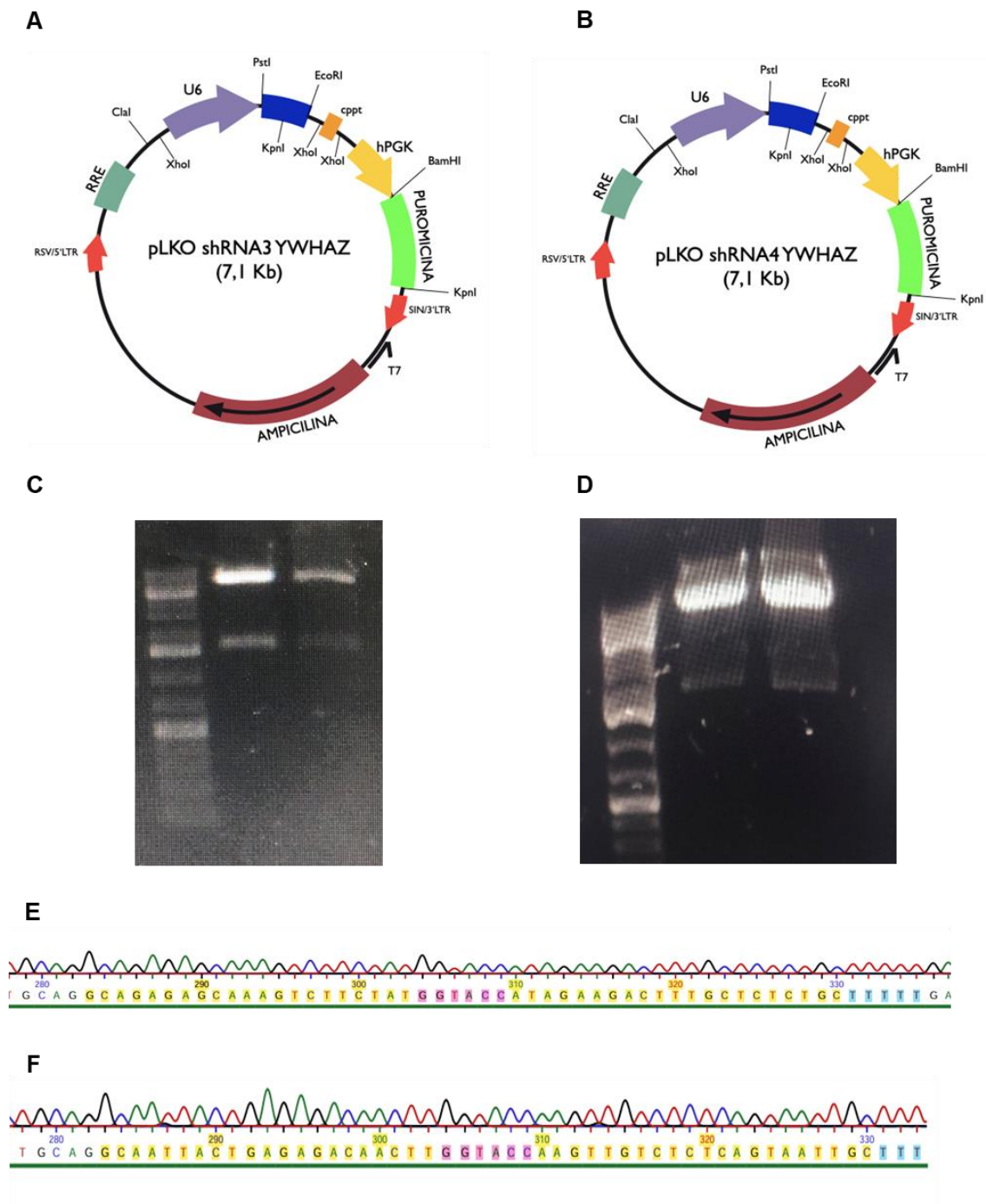


Figura 2. Construcciones de interferencia contra YWHAZ

(A–B) Mapas plasmídicos de las construcciones pLKO-shRNA3-YWHAZ (7,1 kb) y pLKO-shRNA4-YWHAZ (7,1 kb). **(C–D)** Análisis por digestión enzimática y electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pLKO-shRNA3-YWHAZ y pLKO-shRNA4-YWHAZ respectivamente, mostrando los patrones de corte esperados. **(E–F)** Validación por secuenciación por método Sanger de la inserción de las secuencias de shRNA3 (E) y shRNA4 (F) en el vector pLKO. Se confirma la presencia y orientación correcta de las secuencias de interferencia específicas dirigidas contra YWHAZ.

Comprobación de las interferencias mediante western blot

Para comprobar si las construcciones shRNA diseñadas contra YWHAZ eran funcionales, se transfectaron en células HEK293T junto a un vector de expresión de la misma, y se analizó la cantidad de proteína 14-3-3ζ mediante western blot (Figura 3A). Se utilizaron los dos shRNAs contra YWHAZ (shRNA3 y shRNA4) en distintas cantidades (1 o 2 microgramos). El western blot mostró una disminución significativa de la proteína 14-3-3ζ, en presencia de ambos shRNAs, confirmando así la eficacia de la interferencia. La intensidad de la banda de 14-3-3ζ disminuye de manera dependiente de la dosis. Además, se observa que la construcción de interferencia número 4 es más eficaz, ya que la banda parece que es más débil que con la interferencia número 3.

Se utilizó GAPDH como control de carga. La expresión de GAPDH es constante en todas las condiciones, lo cual valida las diferencias observadas con las interferencias contra YWHAZ y asegura que no se deben a diferencias en la carga proteica, sino al efecto específico del silenciamiento. La intensidad de las bandas de los western blots fueron cuantificadas y los datos se relativizaron a la cantidad de proteína GAPDH.

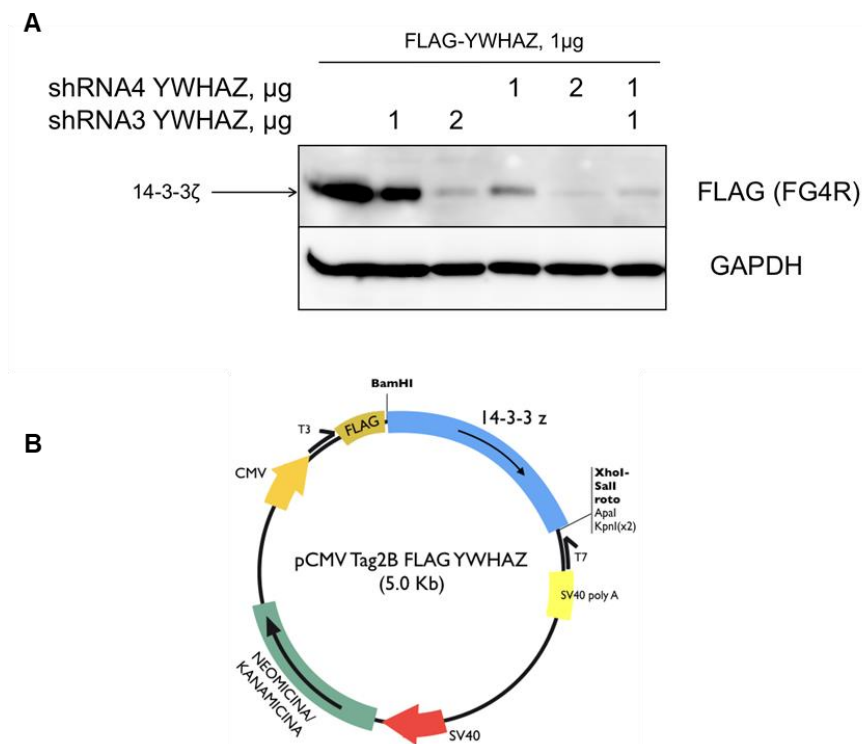


Figura 3. Comprobación de construcciones.

(A) Análisis por Western blot de la expresión de 14-3-3ζ en células HEK293T cotransfectadas con diferentes cantidades de las construcciones de interferencia (shRNA3 y shRNA4) junto con 1 μg del vector de sobreexpresión FLAG-YWHAZ. La proteína exógena se detecta mediante anticuerpo anti-FLAG. GAPDH se utilizó como control de carga. **(B)** Mapa plasmídico del vector de expresión pCMV-Tag2B FLAG-YWHAZ (5,0 kb), que contiene la secuencia codificante de 14-3-3ζ fusionada a un epítipo FLAG bajo el control del promotor CMV.

Estudio de la regulación de la actividad del promotor de RRAS2.

14-3-3 son una familia de proteínas que modulan cascadas de fosforilación. Nos preguntamos si 14-3-3ζ podría participar en la sobreexpresión de RRAS2 en la LLC y cómo su modificación post-traducciona modula este efecto. Con el fin de comprender mejor los mecanismos de regulación de RRAS2, nos centramos en estudiar el efecto de 14-3-3ζ sobre la actividad de su promotor. Para tratar de responder a esta pregunta, se realizaron ensayos de luciferasa en células HEK293T transfectadas con diferentes construcciones del promotor de RRAS2, abarcando las regiones -913/+67, -632/+67 y -473/+67, regulando la expresión del gen de la luciferasa. Junto a estas construcciones testigo, se cotransfectaron bien construcciones para sobreexpresar 14-3-3ζ, bien nuestras construcciones de interferencia. Además, todas las transfecciones incluyeron un vector de expresión para β-galactosidasa, con el fin de poder normalizar la actividad luciferasa en cada condición.

Los resultados mostraron que el promotor de RRAS2 promovió una elevación notable de actividad luciferasa con respecto a la construcción testigo vacía (pGL3basic). Además, se observó una progresiva reducción de la actividad basal del promotor de RRAS2 en las sucesivas deleciones de su secuencia. La sobreexpresión de YWHAZ indujo una disminución significativa de la señal de luciferasa en todas las construcciones, en comparación con el control (vector de expresión vacío). Esta reducción se mantuvo incluso en el promotor más corto (-473/+67), lo que sugiere que la región responsable de esta represión está presente en el extremo proximal del promotor. (Figura 4A).

Para profundizar en estos hallazgos, evaluamos entonces el efecto de la reducción en la expresión de YWHAZ sobre la actividad del promotor de RRAS2. Para ello utilizamos nuestras construcciones de interferencia. Se utilizaron las mismas construcciones del promotor de RRAS2, abarcando las regiones -913/+67, -632/+67 y -473/+67 y el vector vacío pGL3-basic. Estas construcciones fueron co-transfectadas junto a una de las construcciones de interferencia que habíamos creado dirigidas contra YWHAZ (shRNA3-YWHAZ). (Figura 4B) La interferencia de YWHAZ con el shRNA3 indujo un aumento de la actividad del promotor de RRAS2 en todas las construcciones testigo, lo que sugería que el elemento de respuesta que mediaba dicho efecto se encontraba en una zona proximal del promotor.

Dado que 14-3-3ζ puede modular rutas de señalización implicadas en la actividad de factores de transcripción, exploramos a continuación el efecto de las MAPK.

Estudiamos la secuencia del promotor de RRAS2 en busca de secuencias consenso para factores de transcripción que pudiesen estar mediando el efecto de 14-3-3ζ sobre el mismo. Encontramos varias secuencias de respuesta al factor AP-1 distribuidas por el promotor, incluida una en la región proximal. (Figura 4D) Para investigar si este factor media la modulación del promotor de RRAS2 por 14-3-3ζ, cotransfectamos un vector de expresión de la kinasa ERK2, capaz de fosforilar e inducir la actividad de AP-1, con la interferencia shRNA3 de YWHAZ.

En la figura 4B se puede observar que ERK2 produjo una activación de todas las construcciones testigo del promotor de RRAS2 a un nivel muy similar al inducido por la interferencia de YWHAZ. Sin embargo, observamos un efecto potenciador entre ambas construcciones.

Por otro lado, para estudiar el posible efecto que las modificaciones post-traduccionales tipo ubiquitina de 14-3-3ζ pudieran tener sobre la represión de la actividad del promotor de RRAS2, utilizamos el mutante de 14-3-3ζ K11R en la que el residuo de lisina (K) en la posición 11 ha sido sustituido por una arginina (R), que no puede modificarse, aunque preserva en gran medida la carga y la estructura de la proteína. La lisina 11 de 14-3-3ζ se halla aberrantemente sobre-modificada en células de la LLC. En experimentos de cotransfección, observamos que el mutante K11R de YWHAZ seguía manteniendo la actividad represora sobre el promotor de RRAS2, al igual que con la expresión wt de YWHAZ. (Figura 4C)

Por último, investigamos la posible autoregulación de RRAS2. Indagamos también si RRAS2 podía influir sobre la activación de su propio promotor. Para ello cotransfectamos las construcciones testigo de dicho promotor con un vector de expresión de RRAS2. En la figura 4D puede verse como RRAS2 es capaz de reprimir la actividad de su promotor. Esta represión parece independiente de la producida por 14-3-3ζ, tanto la forma wild type como el mutante K11R, que de por sí son muy intensas. Harán falta nuevos experimentos para determinar correlación entre ambos procesos.

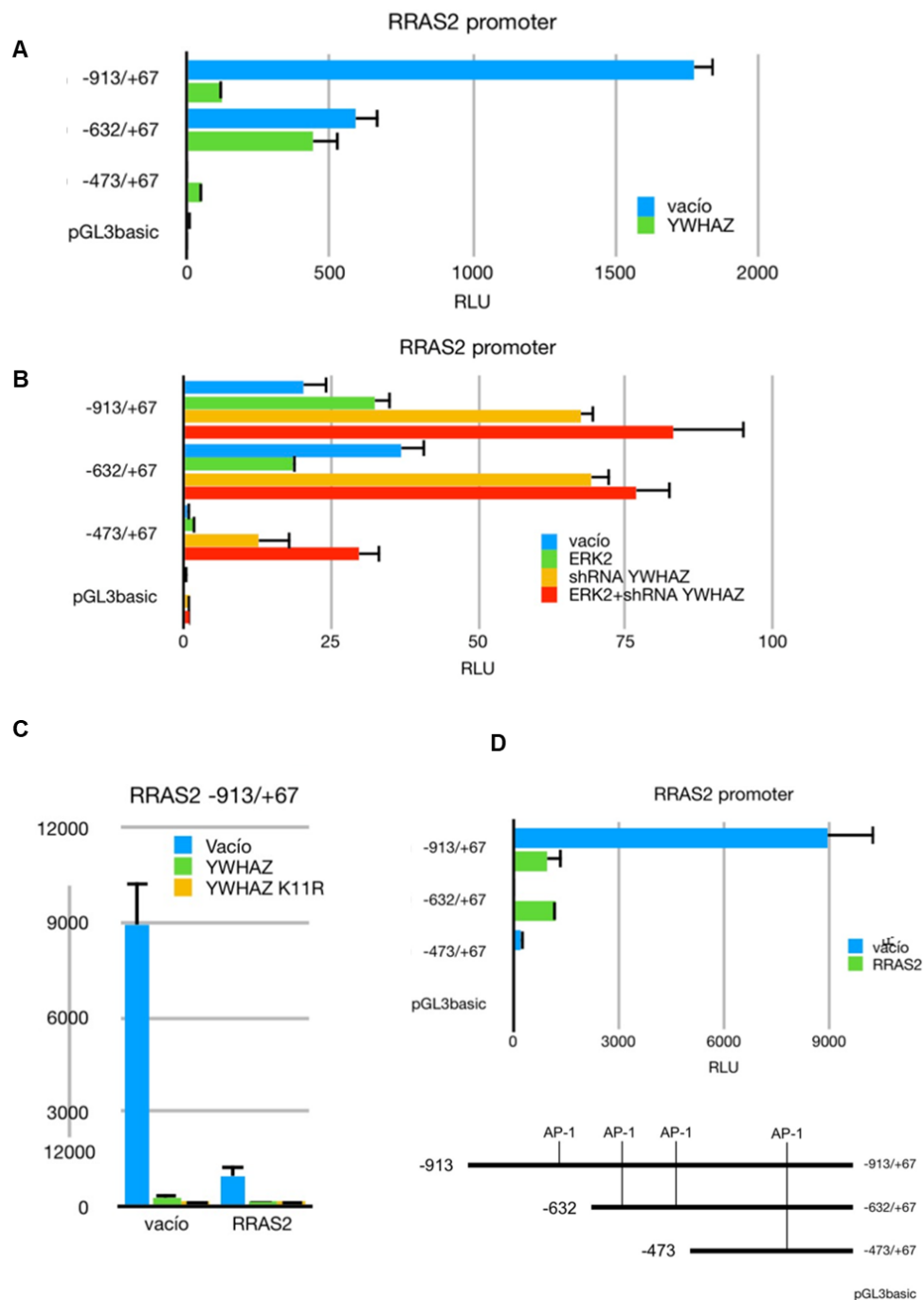


Figura 4. Regulación de la actividad transcripcional del promotor de RRAS2 mediante 14-3-3ζ, ERK2 y RRAS2.

(A) Actividad basal del promotor de RRAS2 evaluada mediante ensayos de luciferasa en células HEK293T transfectadas con construcciones que abarcan las regiones -913/+67, -632/+67 y -473/+67 y expresión de 14-3-3ζ. (B) Efecto del silenciamiento de 14-3-3ζ, la sobreexpresión de la quinasa ERK2 y la combinación de ambos sobre la actividad del promotor de RRAS2. (C) Comparación del efecto represor sobre el promotor de RRAS2 ejercido por 14-3-3ζ wt y su mutante K11R. (D) Evaluación de la autorregulación de RRAS2 sobre su propio promotor.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fin de grado era el de desarrollar dos construcciones de interferencia de RNA que ayudaran en el estudio del papel de la proteína 14-3-3 ζ y su implicación en la fisiopatología de la LLC. Dichas construcciones permitirán evaluar el efecto de su supresión. Durante estos meses hemos hecho ambas construcciones, se ha confirmado su eficacia funcional y se han utilizado en algunos ensayos encaminados a determinar el papel de 14-3-3 ζ en algunos aspectos moleculares de la leucemia linfocítica crónica.

Para evaluar el efecto de la supresión de 14-3-3 ζ se estudió la regulación de la expresión de su gen codificante, YWHAZ, bajo condiciones que afectan la traducción, proceso que está alterado en la LLC. Los resultados obtenidos en la evaluación de la expresión de YWHAZ tras la inhibición del factor de iniciación de la traducción eIF4A1, evidencian una regulación compleja. Mientras que el análisis inicial mediante RT-PCR semicuantitativa mostró una disminución en la expresión de YWHAZ, el posterior estudio cuantitativo (qPCR) reveló un incremento en sus niveles, especialmente en linfocitos B de pacientes con LLC. Esta aparente diferencia puede explicarse por la heterogeneidad intrínseca entre pacientes.

Uno de los objetivos de este estudio fue analizar el papel de la proteína 14-3-3 ζ en la regulación transcripcional del gen RRAS2. La regulación transcripcional de RRAS2 es un proceso complejo que involucra la interacción de múltiples elementos regulatorios distribuidos a lo largo de su región promotora, así como la influencia de distintas proteínas moduladoras. El estudio de la región reguladora representada en nuestras construcciones mostró la presencia de varios elementos de respuesta al factor de transcripción AP-1, cuya actividad es inducida por las rutas de señalización de MAPKs. En este trabajo se abordó el análisis funcional de distintas regiones del promotor de RRAS2, así como el efecto de la kinasa ERK2 y la proteína 14-3-3 ζ sobre su actividad transcripcional. Los ensayos de luciferasa realizados con distintas construcciones del promotor revelaron una disminución progresiva de la actividad transcripcional a medida que se acortaba la longitud del promotor, en concordancia con la distribución de los elementos de respuesta a AP-1 en el mismo (Figura 4).

Los ensayos funcionales también permitieron evaluar el impacto de la quinasa ERK2 y su relación con 14-3-3 ζ sobre la transcripción de RRAS2. Se observó que tanto la sobreexpresión de ERK2 como la inhibición de YWHAZ incrementaron significativamente la actividad del promotor en todas las construcciones analizadas, siendo este efecto más pronunciado en el fragmento completo (-913/+67). Estos resultados refuerzan la relevancia de la región distal del promotor como un módulo clave en la respuesta a estos reguladores y sugieren que ERK2 y YWHAZ actúan como moduladores positivos y negativos, respectivamente, de la transcripción de RRAS2.

Un hallazgo particularmente relevante fue el efecto potenciador observado cuando se combinaron la sobreexpresión de ERK2 y la interferencia de YWHAZ. La actividad del promotor bajo esta condición, superó incluso el efecto observado cuando cada uno fue evaluado individualmente, lo que sugiere que ERK2 y 14-3-3 ζ podrían estar actuando mediante vías parcialmente independientes que convergen funcionalmente en la regulación del promotor de RRAS2.

En relación con 14-3-3ζ, los datos obtenidos apoyan su papel como represor transcripcional de RRAS2, ya que se ve claro que la sobreexpresión de 14-3-3ζ conlleva una disminución de la actividad del promotor, especialmente en las construcciones que incluyen la región proximal (-473/+67). Esto sugiere que los elementos necesarios para su acción represora se encuentran en dicha región. Además, hemos visto que su inhibición aumenta la actividad del promotor.

El estudio de la variante mutante K11R de YWHAZ demostró que esta forma sigue ejerciendo un efecto represor similar al de la proteína wt. Este resultado sugiere que la modificación de YWHAZ en esta lisina no afecta a su efecto represor del promotor de RRAS2 o al bloqueo de la autorregulación de RRAS2, posiblemente a través de interacciones con factores de transcripción que promueven su activación o con kinasas de la ruta de fosforilación que los activan.

En conjunto, estos resultados proporcionan una primera visión de los mecanismos que regulan la expresión de RRAS2 a nivel transcripcional, destacando el papel clave de elementos específicos del promotor y la influencia opuesta de ERK2 y 14-3-3ζ, cuyos efectos podrían tener implicaciones relevantes en procesos fisiológicos o patológicos donde RRAS2 está involucrado.

No obstante, estos resultados deben considerarse solo como observaciones preliminares. En conjunto, estos hallazgos subrayan la necesidad de realizar estudios adicionales que profundicen en los mecanismos moleculares que regulan YWHAZ, para comprender mejor su papel en la leucemia linfocítica crónica.

METODOLOGÍA

Cultivos celulares

La línea de células utilizada son las células HEK293T, y provienen de células embrionarias de riñón humano. Se cultivan en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, y se mantienen a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂. Estas células se emplearon como modelo para ensayos de transfección. Para su mantenimiento en cultivo se procede como sigue: Cuando las células alcanzan una alta confluencia, se retira el medio, se lavan con PBS y se tratan con tripsina para que se despeguen. Tras 5 minutos de incubación a 37°C, se neutraliza la tripsina con medio fresco y se distribuyen en frascos de cultivo.

Por otro lado, también hemos trabajado con linfocitos B de pacientes de LLC. Las células B-LLC provienen de muestras de sangre periférica de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC), quienes dieron su consentimiento informado. La fracción mononuclear (principalmente linfocitos B) se aisló mediante centrifugación en gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque PLUS): Las muestras se diluyeron con PBS, se aplicaron sobre Ficoll y se centrifugaron a 1700 rpm durante 30 minutos, obteniéndose una fase intermedia que contiene las células mononucleares. Esta fracción se lavó tres veces con PBS mediante centrifugaciones sucesivas, para así eliminar los restos de Ficoll. Posteriormente, el pellet celular se resuspendió en medio para su cultivo y se añadieron los correspondientes tratamientos para los ensayos ex-vivo.

Construcciones de interferencia

Con el objetivo de estudiar la función de la proteína 14-3-3ζ en la leucemia linfocítica crónica (LLC), se optó por una estrategia de silenciamiento génico mediante RNA de interferencia. Para ello se generaron construcciones de interferencia de tipo short hairpin RNA (shRNA). En primer lugar, se consultaron bases de datos de las secuencias diana del mRNA de YWHAZ más susceptibles. Se sintetizaron oligonucleótidos que contenían dichas secuencias diana. Los shRNAs transcritos desde estos oligonucleótidos clonados en vectores adecuados son capaces de emparejarse con las secuencias diana del mRNA de YWHAZ, dando lugar bien a la degradación o el bloqueo del ARN mensajero, evitando así su traducción y la expresión de la proteína. Para este estudio se diseñaron dos shRNAs, que denominamos shRNA3 y shRNA4, contra dos regiones distintas y que se clonaron en el vector pLKO, bajo el control del promotor U6.

Para la construcción pLKO shRNA3 YWHAZ, se diseñaron y emparejaron los oligos de la siguiente manera: el oligo shRNA-YWHAZ-F3a se emparejó con shRNA-YWHAZ-R3a, mientras que shRNA-YWHAZ-F3b se emparejó con shRNA-YWHAZ-R3b. De la misma manera, se emparejaron los oligos shRNA-YWHAZ-F4a con shRNA-YWHAZ-R4a y shRNA-YWHAZ-F4b con shRNA-YWHAZ-R4b, para la construcción pLKO shRNA4 YWHAZ. Estos son las secuencias de los oligos que se utilizaron. (Tabla S1)

Cada par de oligonucleótidos sintéticos (forward y reverse) correspondientes a los shRNA se emparejaron: La mezcla se calentó a 95 °C y luego se dejó enfriar lentamente para permitir la formación de una estructura de doble cadena con extremos cohesivos compatibles para la ligación. Paralelamente, el vector de expresión pLKO fue digerido con las enzimas de restricción PstI y EcoRI para generar los extremos compatibles necesarios para la inserción de los fragmentos de shRNA. pLKO es un vector de expresión el cual permite su transcripción en el interior de las células gracias a un promotor U6.

Para la inserción de las secuencias de shRNA en el vector, se realizó una ligación en la que simultáneamente se insertaron los dos pares de oligos emparejados en el vector pLKO previamente digerido. La ligación se llevó a cabo con la enzima T4 DNA ligasa, incubando la mezcla a 16 °C durante toda la noche. Tras la ligación, se produjo la transformación bacteriana, introduciendo la mezcla de la ligación en bacterias competentes E. coli DH5α mediante choque térmico (42 °C durante 30 segundos). Las bacterias se cultivaron en placas de LB suplementado con ampicilina para seleccionar las colonias que habían incorporado el vector.

Las colonias fueron crecidas y analizadas mediante una minipreparación de DNA plasmídico para extraer el vector. Se verificó el correcto clonaje mediante digestión enzimática y los fragmentos se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa. Una vez confirmado, se cultivaron colonias positivas en mayor volumen (200 mL) junto con ampicilina para obtener una mayor cantidad de DNA plasmídico de alta pureza. La purificación final se realizó utilizando un kit comercial de maxipreparación (E.Z.N.A Plasmid DNA Maxi Kit, Omega Bio-tek). La concentración y pureza del DNA se midieron mediante espectrofotometría (Nanodrop). Se mandaron a secuenciar las construcciones de las dos interferencias para su comprobación definitiva.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

La eficiencia de las construcciones de interferencia fue evaluada mediante transfección en células HEK293T y análisis del efecto sobre 14-3-3ζ por western blot. Las construcciones serán utilizadas para evaluar el efecto funcional del silenciamiento de la proteína 14-3-3ζ sobre aspectos clave de las células leucémicas, tales como la viabilidad, proliferación o respuesta a estímulos externos. De este modo, se estableció una herramienta eficaz para analizar el papel funcional de la proteína 14-3-3ζ en la LLC.

Western blot

Extracción proteica:

Para la extracción proteica, primero se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS, se desprendieron las células y fueron recolectadas en Eppendorf, seguidos de una centrifugación a 13.200 rpm durante 1 minuto. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en tampón de lisis RIPA comercial, suplementado con inhibidores de proteasas para que no se degraden las proteínas. Las muestras se mantuvieron en hielo 10 minutos para dejar actuar al tampón, evitando la degradación proteica y se centrifugaron durante 20 minutos a 15000 rpm. Finalmente, se recuperó el sobrenadante, que corresponde al extracto proteico.

Cuantificación de proteína:

La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinónico (BCA), utilizando el reactivo comercial basado en BCA y sales de cobre. Se preparó una recta patrón con concentraciones conocidas de albumina sérica bovina (BSA), y las muestras se cargan por duplicado en placas multipocillos de 96. A cada pocillo se añadió la mezcla del reactivo BCA, dejando reaccionar durante 30 minutos incubando a 37°C. La absorbancia se midió a 550nm en un fotómetro para microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific). Con los valores de absorbancia medidos, se calcula la concentración proteica de los extractos mediante regresión lineal. Estos valores se utilizan para cargar la misma cantidad de proteína en los geles.

Electroforesis:

Las proteínas se separaron por electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Estos geles tienen dos partes: la de carga y la de separación. Para el gel de separación se mezcló agua destilada, Acrilamida al 30% 1,5M Tris (pH=8,8), 10% SDS, 10% persulfato amónico (APS) y Tetrametiletildiamina (TEMED), y para el de carga agua destilada, Acrilamida al 30%, 1,5M Tris (pH=6,8), 10% SDS, 10% APS y TEMED. El porcentaje del gel de separación depende según el peso molecular de la proteína de interés, mientras que el gel de carga se mantiene al 5%. Se montan los geles en la cubeta vertical (BioRad) y se llenan con tampón de electroforesis (1,5% Tris y 9,4% Glicina y con 0,1% de SDS). Entonces se cargan las muestras (25µg por pocillo) y se corren a 120V-150V durante aproximadamente una hora.

Transferencia:

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF activada previamente con metanol. La transferencia se realizó a 360 mA durante una hora, en tampón de transferencia (1,5% Tris y 9,4% Glicina, 20% de metanol), en hielo para evitar el sobrecalentamiento. Tras la transferencia, la membrana se lavó tres veces con agua destilada en agitación. Luego se cubrió durante 1 hora con solución de bloqueo (0,2% i-Block (caseína), 0,1% Tween 20 y TBS (20 mM TRIS pH=7,5, 150mM NaCl) pH=7,5) para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente, la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con el anticuerpo diluido en solución de bloqueo.

Al día siguiente, se realizan 3 lavados con TBST (20 mM TRIS pH=7,5, 150mM NaCl y 0,1% Tween 20) en agitación. Luego, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa alcalina de rábano picante (HRP), diluido 1:10000 en solución de bloqueo. Después de nuevos lavados con TBST, se reveló la membrana usando el reactivo de revelado de peroxidasa Amersham™ ECL (cytiva) durante 5 minutos, y la señal se visualizó en el sistema ImageQuant LAS4000 Mini. Para reutilizar la membrana, se somete a un proceso de stripping (200 mM Glicina pH=2,8, 0,1% SDS, 1Mm EDTA) durante 1 hora en agitación. Finalmente, se lava con TBST y agua destilada, y se reincuba con solución de bloqueo para comenzar un nuevo ciclo de detección. Los anticuerpos empleados en mi proyecto fueron contra la proteína 14-3-3, contra el epítipo FLAG y contra la proteína GAPDH como control de carga (todos de Santa Cruz Biotechnology).

Luciferasa

Sospechamos que 14-3-3 podría estar modulando la expresión del oncogen R-Ras2 en células B-LLC. Utilizamos las construcciones de interferencia de YWHAZ para estudiar el efecto de la represión de 14-3-3ζ sobre la activación del promotor del gen RRAS2. Para ello utilizamos un ensayo luciferasa sobre una construcción testigo en la que el promotor de RRAS2 controlaba la expresión del gen de la luciferasa. Utilizamos células HEK293T por su facilidad de transfección. Este ensayo cuantifica la cantidad de luz generada en la reacción catalizada por la luciferasa, que será proporcional a la activación del promotor de RRAS2. Se añade un plásmido de expresión de β-galactosidasa a la transfección para monitorizar el proceso. Tras la transfección y su crecimiento celular, las células fueron recolectadas en PBS, centrifugadas y el pellet se resuspendió en Buffer de lisis para luciferasa (25mM Tris pH=7,8, 2mM EDTA, 10% Glicerol, 1% Tritón X-100 y añadimos 2mM DTT al usarlo). Posteriormente se incubó en hielo y se centrifugó a 1.400 rpm durante 5 minutos para obtener el extracto proteico. Las actividades de luciferasa y β-galactosidasa se midieron en triplicado en una placa de luminiscencia, utilizando el equipo Luminoskan Ascent (Thermo Scientific). Para la lectura de luciferasa, se utilizó el sustrato de luciferasa de Promega. Para la lectura de la actividad β-galactosidasa se empleó el sistema Galacto-Light Plus™ (Applied Biosystems) en pocillos separados, dejando reaccionar durante 30 minutos en oscuridad. La emisión de luz generada en ambas reacciones fue detectada por el luminómetro, y los valores de actividad de luciferasa se normalizaron respecto a la β-galactosidasa (invariable a las interferencias de YWHAZ) para obtener la actividad luciferasa relativa. Los datos fueron posteriormente analizados para evaluar la expresión inducida por los vectores en estudio.

Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el reactivo comercial TRIzol que preserva la integridad del ARN y lo protege de la degradación. Las muestras se lisaron en TRIzol, y posteriormente se añadió cloroformo y se procedió a una centrifugación a 1500 rpm durante 20 minutos. Esta centrifugación produce una fase orgánica inferior y una fase acuosa superior donde se encuentra el RNA. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el RNA con isopropanol, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugando a 15000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El precipitado de ARN (pellet) obtenido fue lavado con etanol al 70–80% en agua libre de RNAsa, mediante una nueva centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Una vez eliminado el etanol, se resuspendió en un volumen adecuado de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato), dependiendo del tamaño del pellet, y se almacenó a -80 °C hasta su posterior uso. La

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

calidad y cantidad del ARN extraído se evaluaron mediante espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 260 nm y 280nm con el Nanodrop (Nanovue). Además, se evaluó su pureza mediante la relación de absorbancia A260/A280, siendo un valor alrededor de 2 indicativo de un RNA puro y libre de contaminaciones.

Retrotranscripción

Para el análisis del RNA mensajero (mRNA), fue necesario convertir el RNA total extraído en cDNA, utilizando una reacción de retrotranscripción in vitro. Previamente, se cuantificó el RNA total mediante espectrofotometría (Nanodrop) para unificar la cantidad de RNA utilizado de cada muestra. Primero se produjo la desnaturalización con el RNA en agua libre de nucleasas a 65°C y enfriamiento rápido en hielo, para deshacer las estructuras secundarias y así facilitar el acceso de la retrotranscriptasa. Seguidamente se mezcló el RNA con una mezcla de agua libre de nucleasas, tampón de retrotranscripción (5X), DTT (0,1M), dNTPs, cebadores al azar, inhibidores de RNAsas y la retrotranscriptasa. Las muestras se incubaron inicialmente a 25 °C durante 5 minutos para permitir el emparejamiento de los oligonucleótidos, y luego a 42°C durante 1 hora, una temperatura óptima para la actividad de la enzima y finalmente, la enzima fue inactivada mediante una incubación a 95 °C durante 5 minutos. Para llevar a cabo todas estas reacciones se emplea un termociclador. Las muestras de cDNA obtenidas se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis.

PCR convencional

La amplificación de los genes de interés a partir del cDNA se llevó a cabo mediante PCR convencional. Para ello, se utilizó un programa de amplificación que consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos, cada uno compuesto por una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, una fase de emparejamiento a 57°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C durante un tiempo que depende del amplicón deseado, a razón de 1 minuto por kilobase a amplificar. Finalmente, se realizó una terminación a 72°C durante 10 minutos para asegurar una completa elongación. Los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio para permitir la visualización de las bandas de DNA, utilizando el sistema de imagen de gel Bio-rad Universal Hood II.

QPCR

Esta técnica se utiliza para determinar la cantidad de determinados RNAs que hay en una muestra. A partir de las muestras de cDNA obtenidas previamente, se realizó una dilución 1:20 en agua destilada y cada muestra se pipeteó por triplicado en placas específicas para PCR en tiempo real. Para la preparación de la mezcla de reacción se utilizaron cebadores específicos para cada RNA y un preparado commercial con la enzima y el colorante fluorescente SYBR green. La amplificación se realizó en un equipo de PCR en tiempo real, utilizando el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación con los siguientes pasos: 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos, y finalmente una curva de disociación. La detección se basa en la fluorescencia emitida por el fluoróforo SYBR Green, que se une específicamente a las cadenas dobles de DNA durante la síntesis, lo que permite al sistema cuantificar en tiempo real los productos amplificados. El software del equipo genera una curva de fluorescencia que representa la cantidad de producto en cada ciclo, lo que permite determinar la expresión relativa de los genes de interés.

Transfección

Para la transfección de células HEK293T, se sembraron en placas de 6 pocillos el día anterior, con una densidad que permitiera alcanzar entre un 70–90% de confluencia al momento de transfectar. La transfección se realizó mediante el método químico utilizando polietilenimina (PEI) como agente transfectante. Este compuesto permite cambiar las cargas de la membrana y que el plásmido entre de una manera más fácil. Primeramente, se incuban los plásmidos a transfectar con el PEI. Posteriormente, los complejos PEI-DNA se añadieron gota a gota sobre el medio de cultivo. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO durante 4 a 6 horas, tras lo cual el medio fue reemplazado por medio fresco. Las células fueron incubadas durante 24–48 horas más, dependiendo del tipo de análisis posterior (expresión de proteínas, ensayo de luciferasa, extracción de RNA, etc.).

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor, Carlos Pipaón, por su dedicación y guía constante a lo largo de este proyecto. También al laboratorio de Hematología Molecular, en particular a Daniela, Víctor y José Luis, ya que todo lo que he aprendido en esta experiencia ha sido gracias a ellos y me han hecho sentir como una más desde el primer día.

Agradecer también a toda mi familia, sobre todo a mis aítas y a mi abuelo, por confiar en mí, por estar siempre a mi lado y porque sin ellos nada de esto estaría pasando.

Y por último, quería agradecer tanto a mis amigas de Barakaldo como a los que han sido mi familia estos cuatro años de carrera, por acompañarme en cada etapa y ayudarme a seguir adelante en mis peores momentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Puente, X.S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G.R., Villamor, N., Escarmis, G., Jares, P., Beà, S., González-Díaz, M., et al. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475, 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature10113>.
2. Mozas, P., and Delgado, J. (2016). Avances en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica. *Med Clin (Barc)* 147, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.05.034>.
3. Arenas, V., Castaño, J.L., Domínguez-García, J.J., Yáñez, L., and Pipaón, C. (2021). A Different View for an Old Disease: NEDDylation and Other Ubiquitin-Like Post-Translational Modifications in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Oncol* 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.729550>.
4. Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., Wierda, W.G., O'Brien, S., Gribben, J., and Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* 3, 16096. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.96>.
5. Hallek, M., and Al-Sawaf, O. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol* 96, 1679–1705. <https://doi.org/10.1002/ajh.26367>.
6. Rossi, D., Ciardullo, C., Spina, V., and Gaidano, G. (2013). Molecular bases of chronic lymphocytic leukemia in light of new treatments. *Immunol Lett* 155, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.09.010>.
7. Hortal, A.M., Oeste, C.L., Cifuentes, C., Alcoceba, M., Fernández-Pisonero, I., Clavaín, L., Tercero, R., Mendoza, P., Domínguez, V., García-Flores, M., et al. (2022). Overexpression of wild type RRAS2, without oncogenic mutations, drives chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer* 21, 35. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01496-x>.
8. Lacuna, M., Hortal, A.M., Cifuentes, C., Gonzalo, T., Alcoceba, M., Bastos, M., Bustelo, X.R., González, M., and Alarcón, B. (2023). Characterization of Three Somatic Mutations in the 3'UTR of RRAS2 and Their Inverse Correlation with Lymphocytosis in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cells* 12, 2687. <https://doi.org/10.3390/cells12232687>.

9. Enchev, R.I., Schulman, B.A., and Peter, M. (2015). Protein neddylation: beyond cullin–RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 30–44. <https://doi.org/10.1038/nrm3919>.
10. Thompson, W.C., and Goldspink, P.H. (2022). 14–3-3 protein regulation of excitation–contraction coupling. *Pflugers Arch* 474, 267–279. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02635-x>.
11. Gan, Y., Ye, F., and He, X.-X. (2020). The role of YWHAZ in cancer: A maze of opportunities and challenges. *J Cancer* 11, 2252–2264. <https://doi.org/10.7150/jca.41316>.
12. Yu, C., Li, C., Chen, I., Lai, M., Lin, Z., Korla, P.K., Chai, C., Ko, G., Chen, C., Hwang, T., et al. (2019). YWHAZ amplification/overexpression defines aggressive bladder cancer and contributes to chemo-/radio-resistance by suppressing caspase-mediated apoptosis. *J Pathol* 248, 476–487. <https://doi.org/10.1002/path.5274>.
13. Zhang, J., Chen, F., Li, W., Xiong, Q., Yang, M., Zheng, P., Li, C., Pei, J., and Ge, F. (2012). 14-3-3 ζ Interacts with Stat3 and Regulates Its Constitutive Activation in Multiple Myeloma Cells. *PLoS One* 7, e29554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029554>.
14. Gu, Y., Kaufman, J.L., Boise, L.H., and Lonial, S. (2012). The Role of 14-3-3 ζ in Regulation of Proteasome Inhibitor Bortezomib Sensitivity in Multiple Myeloma. *Blood* 120, 1845–1845. <https://doi.org/10.1182/blood.V120.21.1845.1845>.
15. Yu, J., Chen, L., Chen, Y., Hasan, M.K., Ghia, E.M., Zhang, L., Wu, R., Rassenti, L.Z., Widhopf, G.F., Shen, Z., et al. (2017). Wnt5a induces ROR1 to associate with 14-3-3 ζ for enhanced chemotaxis and proliferation of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 31, 2608–2614. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.132>.

Información Suplementaria

Desarrollo de estrategias para el estudio del papel de la proteína 14-3-3 ζ en la fisiopatología de la leucemia linfocítica crónica

Ane Ortega Fernández ^{1,2}, Carlos Pipaón Gonzalez ^{1,2}, Lucrecia Yáñez San Segundo ^{1,2}

<i>Plko shRNA3 YWHAZ</i>	
shRNA-YWHAZ-F3a	G-GCAGAGAGCAAAGTCTTCTAT-GGTACC-ATAG
shRNA-YWHAZ-F3b	AAGACTTTGCTCTCTGC-TTTTT-G
shRNA-YWHAZ-R3b	AATTC-AAAAA-GCAGAGAGCAAAGTCTTCTAT-GG
shRNA-YWHAZ-R3a	TACC-ATAGAAGACTTTGCTCTCTGC-CTGCA
<i>pLKO shRNA4 YWHAZ</i>	
shRNA-YWHAZ-F4a	G-GCAATTACTGAGAGACAACTT-GGTACC-AAGT
shRNA-YWHAZ-F4b	TGTCTCTCAGTAATTGC-TTTTT-G
shRNA-YWHAZ-R4b	AATTC-AAAAA-GCAATTACTGAGAGACAACTT-GG
shRNA-YWHAZ-R4a	TACC-AAGTTGTCTCTCAGTAATTGC-CTGCA

Figura S1. Oligonucleótidos para la creación de las construcciones de interferencia.

Lista de los oligonucleótidos usados para cada construcción de interferencia contra YWHAZ (shRNA3 y shRNA4).