Identification of a novel YAP–14-3-3ζ negative feedback loop in gastric cancer

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Figure 1: Western blotting assay of YAP and 14-3-3ζ protein levels in gastric cancer. (A) The grading standard of YAP and 14-3-3ζ expression (B).
Supplementary Figure 2: Representative images of colony formation in vector and YAP-overexpressing adenovirus transfected MKN-45 and HGC-27 cells. The transfected cells were cultured for 5 days. (A) Statistical analysis of colony formation assay in Figure 2C and Supplementary Figure 2A (n = 6; *p < 0.05; **p < 0.01) (B) The migration ability of MGC-803 transfected with vector and YAP-overexpressing adenovirus was determined by scratch assay (C).

Supplementary Figure 3: Representative images of colony formation in vector and 14-3-3ζ-overexpressing adenovirus transfected MKN-45 and HGC-27 cells. The transfected cells were cultured for 10 days. (A) the migration ability of MGC-803 transfected with vector and 14-3-3ζ-overexpressing adenovirus was determined by scratch assay (B).
Supplementary Figure 4: Cytoplasmic and nuclear fractions were prepared from MGC-803 cells transfected with shControl or sh14-3-3ζ lentiviral and YAP protein levels were determined by western blotting (A) western blot assay for proliferation index (Cyclin-D3, Cyclin-D1, PCNA), HA and 14-3-3ζ in MGC-803 cells treated with blank-vector or YAP over-expressing adenovirus and shControl or sh14-3-3ζ lentiviral. (B) Expression of LATS1, Flag, p-YAP1, and YAP1 was determined in 14-3-3ζ-overexpressing or not overexpressing MGC-803 cells with or without the disruption of LATS expression (C) 14-3-3ζ disrupted and control MGC-803 cells were transfected with Flag-YAP plasmid and subjected to immunoprecipitation(IP) using Flag antibody or control IgG, followed by immunoblotting(IB) with YAP, p-LATS1 or 14-3-3ζ antibodies (D).

Supplementary Figure 5: Western blotting assay for 14-3-3η, 14-3-3ε, 14-3-3γ and 14-3-3σ expression after transfecting with Flag-vector or Flag-YAP plasmid in 293T cells at 60 h. (A) Western blotting assay for 14-3-3ζ expression in MKN-45 cells after transfecting with vector or YAP overexpressing adenovirus. (B) Representative images of YAP immunofluorescence treating with Ad-vector or Ad- YAP (C).
Supplementary Figure 6: Quantitative analyses of miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e, miR-617, miR-613 and miR-3619-5p in 293T cells transfected with Flag-vector or Flag-YAP plasmid at 60 h. (A) Quantitative analyses of miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e, miR-617, miR-613 and miR-3619-5p in YAP-overexpressed or control 293T cells. (B) Quantitative analyses of miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e, miR-617, miR-613 and miR-3619-5p in YAP-disrupted or control 293T cells. (C) Western blotting assay for 14-3-3ζ, p-YAP and YAP expression in 293T transfected with Flag-vector or Flag-YAP or Flag-YAP-Ser127A (Serine 127 site was mutated to Alanine) (D) Endogenous interaction between YAP, MDM2 and 14-3-3ζ was detected in MGC-803 cells (E).
Supplementary Figure 7: Representative images of tumor-bearing mice (A).

Supplementary Table 1: Antibodies

| Antibody | Catalog number | Detection  | Manufacturer       |
|----------|----------------|-----------|--------------------|
| GAPDH    | CW0100A        | WB        | KangCheng          |
| MDM2     | BS1447         | WB        | Bioworld           |
| Cyclin D1| P24385         | WB        | Bioworld           |
| PCNA     | BS1289         | WB        | Bioworld           |
| Cyclin-D3| P30281         | WB/IHC    | Bioworld           |
| 14-3-3-ζ | BS1001         | WB/IP/ IHC| Bioworld           |
| 14-3-3 γ | BS2512         | WB        | Bioworld           |
| 14-3-3 ε | BS6109         | WB        | Bioworld           |
| 14-3-3 η | BS2384         | WB        | Bioworld           |
| YAP      | BS2000         | WB/IHC/IF | Bioworld           |
| p-YAP    | 4911           | WB/IHC/IF | Cell signaling technology |
| LATS1    | 3477           | WB        | Cell signaling technology |
| Histone  | sc-8655        | WB        | Santa Cruz Biotechnology |
| Flag     | F1804          | WB/IP/IF  | Sigma              |
| HA(Rabbit)| 3724           | WB/IP/IF  | Cell signaling technology |
| HA(Mice) | H3663          | WB        | Sigma              |
### Supplementary Table 2: Sequences of real-time PCR primers

| mRNA/miRNA     | Primer | Sequences (5′-3′)                      |
|---------------|--------|---------------------------------------|
| Human-14-3-3ζ | Forward| CAGATGGCTCGAGAATACAG                  |
|               | Reverse| CCTCAGCAGTAACGGTAG                     |
| Human-CTGF    | Forward| ATCTTCGGTGAGTGGTG                      |
|               | Reverse| GTGTCTCTCGGATGTAAGC                    |
| Human-Cy61    | Forward| GCTTGCCGACACCTACAG                     |
|               | Reverse| TGACCCAGGCTTGCTG                      |
| Human/ β-actin| Forward| GACCTTGAGCAACAGCT                     |
|               | Reverse| GCAAGGGACTGAATACAG                     |
| hsa-miR-613   | Forward| ACAGGCACAGAATACAG                      |
|               | Reverse| GCAAGGCTTGAACTGAC                     |
| hsa-miR-3619-5p| Forward| TCCAGGCGAGCAGGACTG                     |
| hsa-miR-214   | Forward| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
|               | Reverse| TGGCAATGGAAGAGTATG                     |
| hsa-miR-1     | Forward| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
|               | Reverse| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
| hsa-miR-206   | Forward| TGAAATGGAAGAGTATG                     |
|               | Reverse| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
| hsa-miR-30d   | Forward| TTAACATCCCCCGACTGGAAG                  |
|               | Reverse| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
| hsa-miR-30a   | Forward| TTAACATCCCCCGACTGGAAG                  |
|               | Reverse| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
| hsa-miR-22    | Forward| AGCTGCGTAGGAGCTGAAGACTG                |
|               | Reverse| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
| miRNA-761     | Forward| AGCTGCGTAGGAGCTGAAGACTG                |
|               | Reverse| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
| miRNA-30b     | Forward| TGAAATGGAAGAGTATG                     |
|               | Reverse| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
| miRNA-30c     | Forward| TGAAATGGAAGAGTATG                     |
|               | Reverse| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
| miRNA-30e     | Forward| TGAAATGGAAGAGTATG                     |
|               | Reverse| GCAAGGCACAGAATACAG                     |
## Supplementary Table 3: ShRNA and siRNA Oligonucleotides

| Target Gene         | Sequences (5′-3′)                  |
|---------------------|------------------------------------|
| Human-sh14-3-3ζ     | Forward CCGGGCAGAGAGCAAAGTCTTCTATCTCGAGATAGAAGACCTTTTGCTCTCTGCTTTTTG |
|                     | Reverse AATTCAAAAAGCAGAGAGCAAAGTCTTCTATCTCGAGATAGAAGACTTTTGCTCTCTGCTTCG |
| Human-shYAP         | Forward CCGGGCCACCAAGCTAGATAAAGAACTCGAGTTCTTTATCTAGCTTTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GG