

# Hippo 信号通路在乳腺癌中的调控机制及作用

姚传波<sup>1</sup>, 周鑫<sup>2</sup>, 陈策实<sup>3</sup>, 雷群英<sup>1</sup>

1. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 生物医学研究院肿瘤代谢实验室, 上海 200032;
2. 德克萨斯大学 MD 安德森癌症中心肿瘤生物学系, 休斯顿 77030;
3. 中国科学院昆明动物研究所肿瘤生物学实验室, 昆明 650223

**摘要:** Hippo 信号通路是调控器官大小和肿瘤发生发展的关键通路, 近年来受到广泛的关注。TAZ/YAP 作为哺乳动物中 Hippo 信号通路两个核心下游效应分子, 通过 Hippo 信号通路依赖性和非依赖性的机制受到细胞内外信号的严密调控。除了参与正常乳腺组织发育, Hippo 信号通路还在人乳腺癌细胞的增殖、分化、凋亡、迁移、侵袭、上皮-间质转化和干性维持等多个过程中起着关键性作用。本文总结了 Hippo 信号通路的调控机制和调节信号, 阐述了 Hippo 信号通路异常在乳腺癌发生发展中的作用, 并讨论了其在乳腺癌中作为治疗靶点的临床策略。

**关键词:** TAZ/YAP; Hippo 信号通路; 乳腺癌

## The regulatory mechanisms and functional roles of the Hippo signaling pathway in breast cancer

Chuanbo Yao<sup>1</sup>, Xin Zhou<sup>2</sup>, Ceshi Chen<sup>3</sup>, Qunying Lei<sup>1</sup>

1. Cancer Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center and Cancer Metabolism Laboratory of Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China;
2. Department of Cancer Biology, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston 77030, USA;
3. Laboratory of Cancer Biology, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China

**Abstract:** Hippo signaling pathway has attracted broad attention due to its essential roles in controlling organ size and tumorigenesis. TAZ/YAP, two core downstream molecules of the Hippo signaling pathway in mammals, are tightly regulated by a wide range of extracellular and intrinsic signals in both Hippo signaling pathway-dependent and -independent manners. Besides their roles in the development and function of normal mammary glands, TAZ/YAP display remarkable potency and relevance to multiple aspects of human breast carcinogenesis, including cellular proliferation, differentiation, apoptosis, migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition and stemness. In this

收稿日期: 2017-03-23; 修回日期: 2017-04-14

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2015CB910401)和国家自然科学基金项目(编号: 81430057, 81572686)资助[Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2015CB910401) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81430057, 81572686)]

作者简介: 姚传波, 硕士研究生, 专业方向: 肿瘤代谢。E-mail: 14211010030@fudan.edu.cn

周鑫, 博士, 研究方向: Hippo 信号通路肿瘤。E-mail: XZhou8@mdanderson.org

姚传波和周鑫为并列第一作者。

通讯作者: 雷群英, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤代谢。E-mail: qlei@fudan.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-100

网络出版时间: 2017/5/3 17:53:49

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170503.1753.005.html>

review, we summarize the regulators of TAZ/YAP, discuss the significant contribution of the Hippo signaling pathway to human breast cancers and highlight their potential therapeutic roles.

**Keywords:** TAZ/YAP; Hippo signaling pathway; breast cancer

乳腺癌是威胁女性健康最常见的恶性肿瘤之一, 阐明乳腺癌发生、发展和转移的分子机制对乳腺癌的防治至关重要<sup>[1]</sup>。近年来大规模的研究工作完善了乳腺癌的疾病图谱, 将乳腺癌分为多种分子亚型, 每种亚型对激素、化疗或分子靶向药物的治疗具有不同的敏感性<sup>[2,3]</sup>。目前, 生物学研究已经较为系统研究了乳腺癌的致癌因素并勾勒出基因-基因相互作用的网络, 进一步揭示了乳腺癌的生物学复杂性, 扩大了病患早期诊断、选择分级治疗和生物标志物靶向治疗的途径, 为乳腺癌的精准治疗提供了理论支持和潜在的靶点。

虽然 Hippo 信号通路的发现迄今只有 22 年的时间, 但是有关 TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)和 YAP(Yes-associated protein)能够调控组织器官大小和肿瘤发生发展的报道越来越多, Hippo 信号通路被广泛关注<sup>[4]</sup>。TAZ/YAP 作为转录调控因子, 由于缺乏 DNA 结合域, 不能直接和 DNA 结合, 因此需要通过和转录因子结合来调节下游靶基因的转录。TAZ/YAP 受 Hippo 信号通路的严格调控, 通路的上游组分使其发生磷酸化并与 14-3-3 蛋白相互结合而被滞留在细胞质中, 阻碍了 TAZ/YAP 入核介导的转录共激活功能<sup>[5,6]</sup>。TAZ/YAP 通过其内部的转录激活域和 RUNX2(runt-related transcription factor 2)、MyoD(myoblast determination protein 1)、PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor)、TTF1(thyroid transcription factor 1)、PAX3 (paired box gene 3)、PAX8(paired box gene 8)和 TEADs(TEA domain transcription factors)等多种转录因子相互作用<sup>[7-14]</sup>, 并在成骨细胞、肌肉细胞和脂肪细胞的分化中扮演着重要的角色<sup>[15-17]</sup>。一直以来, TAZ/YAP 都被认为是作为转录共激活因子而发挥作用, 但最近也有研究阐明 TAZ/YAP 还可以作为转录共抑制因子调节基因转录和细胞生长<sup>[18,19]</sup>。

TAZ/YAP 是 Hippo 信号通路中与组织生长相关的进化保守因子, 其紊乱与哺乳动物的组织过度生长和肿瘤发生密切相关。在小鼠(*Mus musculus*)肾脏

中 TAZ 或/和 YAP 缺失将会导致不同的表型: TAZ 缺陷小鼠在胚胎 15.5 天出现明显的肾囊肿, 出生后 3 周, 仅 1/5 表现出肾盂扩张、多囊肾和肺气肿的 TAZ 缺陷小鼠能够存活<sup>[20,21]</sup>; 而 YAP 缺陷则会导致肾脏的发育不良<sup>[22]</sup>。有趣的是, 在 YAP 突变的肾脏中发生额外的 TAZ 丢失并未加剧肾小球的恶化, 提示 TAZ 和 YAP 在肾脏形成期间扮演着不同角色<sup>[22]</sup>。这些研究结果表明 TAZ 和 YAP 可能在不同组织类型的组织生长发育过程中发挥着不同的协调调控作用。

本文总结了 Hippo 信号通路中核心组件 TAZ/YAP 的调控机制、Hippo 信号通路与细胞内外信号的相互作用以及 Hippo 信号通路与乳腺癌的关系, 并对相关的临床治疗策略进行了展望。

## 1 Hippo 信号通路

Hippo 信号通路从果蝇(*Drosophila*)到哺乳动物是高度保守的, 在器官大小的调控中起着关键作用。在哺乳动物中, 经典的 Hippo 信号通路由上游激酶级联串和下游转录模块共同组成, TAZ 和 YAP 是两个核心下游转录模块(图 1)。近年来研究表明, 在哺乳动物 Hippo 信号通路中, Ste20(Serine/threonine-protein kinase)家族激酶 MST1/2(mammalian Sterile 20-like kinase 1/2)在接头蛋白 SAV1(Salvador 1)的协助下<sup>[23]</sup>磷酸化并激活 NDR(nuclear Dbf2-related)家族激酶 LATS1/2(large tumor suppressor 1/2)和接头蛋白 MOB1(MOB kinase activator 1), 活化的 LATS1/2 和 MOB1 复合体进一步磷酸化下游的靶蛋白, 即转录调控因子 TAZ 和 YAP<sup>[24-26]</sup>, 然而, MST1/2 是否直接参与 LATS1/2 的磷酸化激活是由细胞类型和上下游信号共同决定的。最近的研究发现了一个新的 LATS1/2 激酶——MAP4K(mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase)。3 组研究人员独立发现了 MAP4K 家族成员——果蝇 Hppy(happyhour)同源物 MAP4K1/2/3 和 Msn(misshapen)同源物 MAP4K4/6/7 可以作为 LATS1/2 的直接激酶<sup>[27-29]</sup>。总之, MST1/2 和 MAP4K 是两个主要的激酶家族, 可以感受多个信

号并直接磷酸化 LATS1/2 进而调节 TAZ/YAP 活性。

人 TAZ 第 89 位丝氨酸残基或 YAP 第 127 位丝氨酸残基被 LATS1/2 磷酸化时,TAZ/YAP 和 14-3-3 蛋白结合被滞留在细胞质中从而抑制其入核,其他丝氨酸残基磷酸化也会影响 TAZ/YAP 的转录活性<sup>[6,25]</sup>。多种细胞内外信号可以抑制 Hippo 信号通路的级联反应,导致 LATS1/2 活性降低,TAZ/YAP 去磷酸化并入核<sup>[30,31]</sup>。进入细胞核中的 TAZ/YAP 通过和多种转录因子结合并调控基因表达。结合的转录因子可能被激活<sup>[32,33]</sup>,也可能被抑制<sup>[18,19]</sup>。TEAD 家族转录因子是 TAZ/YAP 在细胞核中主要结合的转录因子,该家族蛋白包括 4 个成员:TEAD1/2/3/4。去磷酸化的 TAZ/YAP 与 TEAD 相互作用,并且作为转录共激活因子调节与细胞增殖、迁移和凋亡相关的基因表达<sup>[32,33]</sup>。

一直以来,研究人员认为 Hippo 信号通路对 TAZ/YAP 的调节机制主要是通过调节其亚细胞定位来实现的<sup>[6,22,33]</sup>。直到 2010 年,Liu 等<sup>[34]</sup>研究揭示了 TAZ 是一种非常不稳定的蛋白,其稳定性也受 Hippo 信号通路的调节。在高细胞密度时,Hippo 信号通

路被高度活化,TAZ 的第 311 位丝氨酸残基被 LATS1/2 磷酸化,CK1(casein kinase 1)进一步磷酸化 TAZ 的第 314 位的丝氨酸残基。磷酸化的 TAZ 产生可被 F-box 蛋白  $\beta$ -TrCP(beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase)识别的特定模序。 $\beta$ -TrCP 作为 E3 连接酶复合物的组分,将 TAZ 募集到 SCF(Skp, Cullin, F-box containing complex)连接酶上进行多泛素化修饰,并通过蛋白酶体降解<sup>[34]</sup>。除了 C 端的磷酸化-泛素化降解模式,TAZ 的 N 端会被 GSK3(glycogen synthase kinase 3)磷酸化从而通过泛素化-蛋白酶体途径降解<sup>[35]</sup>。类似的研究在 YAP 中也被报道<sup>[36]</sup>。以上研究表明,Hippo 信号通路可以通过亚细胞定位和蛋白稳定性这两种不同的机制对 TAZ/YAP 进行调节(图 1)。

## 2 Hippo 信号通路与细胞内外信号

研究发现细胞内外许多信号都可以刺激 Hippo 信号通路,包括接触抑制、细胞连接、细胞骨架重排、细胞能量状态和刺激 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)等(图 2)。此外,还有其

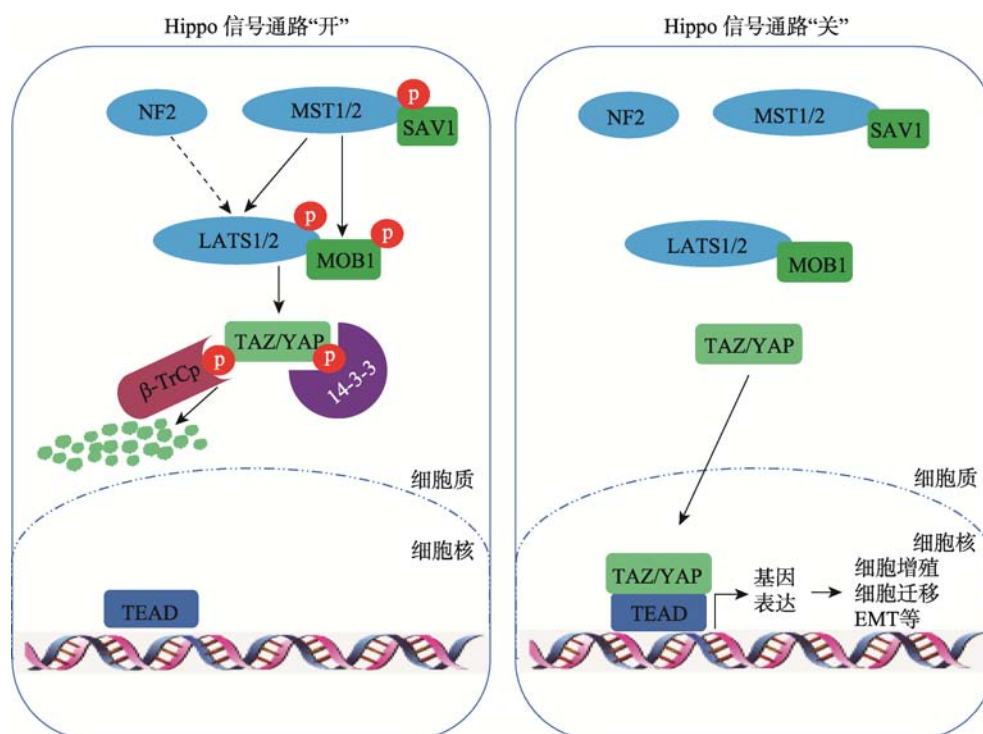


图 1 Hippo 信号通路的核心组分

Fig. 1 The core components of the Hippo signaling pathway

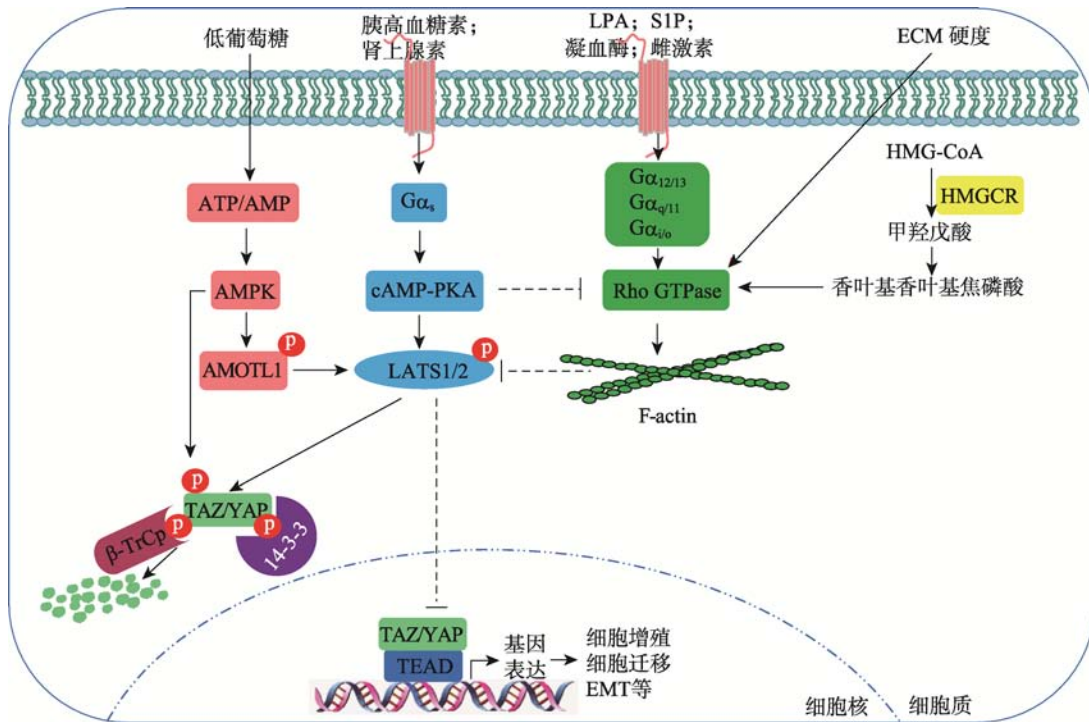


图 2 Hippo 信号通路受到多种上游信号的调节

Fig. 2 Regulation of the Hippo pathway by multiple intrinsic and extracellular signals

他信号可以通过不依赖于 Hippo 信号通路中激酶级联的方式调节 TAZ/YAP, 如缺氧和渗透压等。各种刺激信号使 Hippo 信号通路处于高度动态变化之中。

### 2.1 肌动蛋白-细胞骨架

肌动蛋白-细胞骨架和 Rho-ROCK(Ras homolog family member-Rho kinase)通路对于维持细胞形态、调节细胞增殖和分化是非常重要的。研究表明, Rho GTP 酶和肌动蛋白细胞骨架的动态变化在 Hippo 信号通路的调节中发挥核心作用(图 2)。主要表现在: (1)GPCR 的多种配体通过调节 Rho GTP 酶和肌动蛋白细胞骨架的排列可以活化或失活 TAZ/YAP<sup>[37, 38]</sup>; (2)过表达活性形式的 Rho GTP 酶或用 C3 毒素抑制 Rho GTP 酶可以显著调节 TAZ/YAP 的活性<sup>[39, 40]</sup>; (3)细胞通过调节细胞骨架的排列改变 TAZ/YAP 的活性<sup>[40]</sup>; (4)细胞外基质硬度和细胞形态通过 Rho GTP 酶调节 TAZ/YAP 的活性<sup>[39]</sup>; (5)接触抑制通过改变 F-肌动蛋白的排列可以使 TAZ/YAP 失活<sup>[6, 34]</sup>。因此, 肌动蛋白细胞骨架可能是 Hippo 信号通路的核心调节信号, 多个细胞外信号整合致使细胞骨架重组, 将信号进一步转导到 Hippo 激酶模块处。

### 2.2 GPCR 配体

近期研究表明, 细胞外配体和 Hippo 信号通路之间存在着密切联系(图 2)。在无血清培养条件下, LATS1/2 通过不依赖于 MST1/2 的方式被激活, 从而磷酸化并抑制 TAZ/YAP 活性。进一步加入血清中的两种主要脂质——溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)和鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P), 可以通过相应的 GPCR 和同源 G 蛋白  $\alpha$  亚基 12/13( $G$  protein subunit alpha 12/13,  $G\alpha_{12/13}$ )导致 TAZ/YAP 去磷酸化并累积<sup>[38, 41]</sup>。与 LPA 和 S1P 调节 TAZ/YAP 的作用一致, Zhou 等<sup>[42]</sup>研究证明雌激素同样可以诱导多种乳腺癌细胞中 TAZ/YAP 的激活。G 蛋白偶联的雌激素受体( $G$  protein-coupled estrogen receptor, GPER)刺激激活  $G$  蛋白  $\alpha$  亚基 q/11( $G$  protein subunit alpha q/11,  $G\alpha_{q/11}$ )、磷脂酶 C  $\beta$ -蛋白酶 C(phospholipase C  $\beta$ -protein kinase C, PLC $\beta$ -PKC)和 Rho-ROCK, 从而抑制 LATS1/2, 导致 TAZ 的去磷酸化和蛋白累积。更重要的是, 在人浸润性导管乳腺癌标本中, 总体 TAZ 和细胞核内 TAZ 的蛋白水平与 GPER 的表达水平呈正相关<sup>[42]</sup>。与  $G\alpha_{12/13}$ 、 $G\alpha_{q/11}$  和  $G$  蛋



白  $\alpha$  亚基 i/o(G protein subunit alpha i/o,  $G\alpha_{i/o}$ )相反, G 蛋白  $\alpha$  亚基 s(G protein subunit alpha s,  $G\alpha_s$ )对 TAZ/YAP 的活化起相反的作用。Yu 等<sup>[43]</sup>发现  $G\alpha_s$  的过表达诱导 LATS1/2 激活使 TAZ/YAP 磷酸化<sup>[38]</sup>。环磷酸腺苷(cAMP)作为  $G\alpha_s$  下游的第二信使可以通过蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)和 Rho GTP 酶介导  $G\alpha_s$  诱导的 TAZ/YAP 失活。GPCR 是哺乳动物中最大的膜受体家族,参与调控多种生理和病理活动。GPCR 和 Hippo 信号通路之间的联系为 TAZ/YAP 的调节提供新的上游信号,这意味着在不同细胞类型和不同细胞内外信号情况下 TAZ/YAP 可被高度动态调控并参与多种生理病理过程<sup>[44,45]</sup>。

### 2.3 代谢和营养

近期研究发现,能量状态、糖酵解和甲羟戊酸生物合成可以调节 TAZ/YAP 活性,TAZ/YAP 感受和协调营养状态以调节基因转录和细胞增殖(图 2)。肿瘤细胞中通常发生从氧化呼吸到有氧糖酵解的代谢重编程,称为 Warburg 效应<sup>[46,47]</sup>。越来越多的证据表明,有氧糖酵解可以促进肿瘤的发生发展。研究发现能量状态与 Hippo 信号通路也密切相关。在葡萄糖缺乏时,LATS1/2 的活性显著增加,从而抑制 TAZ/YAP。AMPK(AMP-activated protein kinase)是感知葡萄糖的主要激酶之一,能磷酸化 AMOTL1(angiomotin like 1)并激活 LATS1/2<sup>[48]</sup>。但也有研究表明,AMPK 可以直接磷酸化 YAP 的第 94 位丝氨酸残基,进而抑制 YAP 与 TEAD 发生相互作用<sup>[49,50]</sup>。然而,TAZ 是否也受到类似机制的调节目前尚未清楚。葡萄糖能以不依赖于 AMPK 和 LATS1/2 的方式激活 TAZ/YAP,当葡萄糖摄取增强或糖酵解高度活化时,6-磷酸果糖激酶(phosphofructokinase-1, PFK1)可以直接与 TEAD 和 TAZ/YAP 形成复合物,从而使 TAZ/YAP 的转录共激活活性全部活化<sup>[51]</sup>。所有这些研究均表明 TAZ/YAP 的活性受葡萄糖或糖酵解的严格调控,当葡萄糖缺乏时,TAZ/YAP 被限制以防止进一步能量的衰竭,从而维持细胞存活。

甲羟戊酸生物合成同样可以调节 TAZ/YAP 活性。Sorrentino 等<sup>[52]</sup>通过筛选 650 种经 FDA 批准过的化合物文库,发现作为 HMG-CoA 还原酶(hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, HMGCR)抑制剂的

他汀类药物可以显著降低 TAZ/YAP 的核定位。HMGCR 是甲羟戊酸途径的限速酶,可以为 Rho GTP 酶的异戊二烯化和膜结合提供香叶基香叶基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP),而 Rho GTP 酶可以作为 TAZ 的激活剂<sup>[38-40]</sup>。由于 Rho/ROCK/F-肌动蛋白在调节 Hippo 信号通路中起到核心作用,通过这些化合物干扰 Rho GTP 酶足以抑制 TAZ/YAP 的活性。因此,通过筛选或修饰靶向甲羟戊酸途径的化合物可以获得高效的 TAZ/YAP 抑制剂。

### 2.4 缺氧

缺氧是促进肿瘤发生的关键微环境因素之一。研究显示,缺氧环境可通过调节缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIF)的活性来诱导乳腺癌干细胞的肿瘤起始活性<sup>[53, 54]</sup>。缺氧时 HIF-1 $\alpha$  和 TAZ 之间存在相互作用从而共同调节基因转录。Xiang 等<sup>[55]</sup>报道缺氧条件调节 TAZ 以两种独立机制诱导乳腺癌干细胞的表型。首先,在多种乳腺癌细胞系中 TAZ 及其靶基因的 mRNA 水平在缺氧条件下(1% O<sub>2</sub>)以依赖于 HIF-1 $\alpha$  的形式上调。HIF-1 $\alpha$  可以直接与位于 WWTR1(WW domain containing transcription regulator 1)基因的外显子 2 和外显子 3 之间的 HIF 应答元件(HIF-responsive elements, HRE)结合,从而促进 TAZ 基因的转录;其次,作者发现缺氧诱导了 Hippo 信号通路中 TAZ 的上游激酶 LATS2 以 HIF-1 $\alpha$  和 SIAH1(Siah E3 ubiquitin protein ligase 1)依赖的方式通过蛋白酶体途径降解,从而使 TAZ 活化入核。有趣的是, Xiang 等<sup>[56]</sup>后续的研究表明 TAZ 和 HIF-1 $\alpha$  彼此相互作用,并在功能上作为彼此转录辅因子。HIF-1 $\alpha$  作为 TAZ/TEADs 复合物的共激活因子作用于靶基因(如结缔组织生长因子)的转录,TAZ 作为 HIF-1 $\alpha$  的共激活因子作用于缺氧状态的人乳腺癌细胞中靶基因,如丙酮酸脱氢酶激酶 1(pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)和乳酸脱氢酶 A(lactate dehydrogenase A, LDHA)的转录。Bendinelli 等<sup>[57]</sup>同样发现了该现象,他们认为 HIF-1 $\alpha$  和 TAZ 彼此相互作用,并在缺氧后共定位于细胞核中,且 HIF-1 的活性受 TAZ 严格调控;进一步研究表明,TAZ 可能参与乳腺癌在缺氧微环境下的骨转移。基于人乳腺癌数据库的分析发现,TAZ 和 HIF-1 $\alpha$  同时处于高

表达状态与乳腺癌患者低存活率密切相关。HIF-1 $\alpha$  和 TAZ/YAP 之间的相互作用增加彼此的转录活性,有助于在缺氧微环境下的基因表达。抑制 HIF-1 $\alpha$ 、TAZ/YAP 或两者组合的治疗策略可以提高癌症治疗效果,尤其是对于患有严重缺氧状况的实体瘤治疗。

### 3 Hippo 信号通路异常促进乳腺癌的发生发展

越来越多的研究显示, Hippo 信号通路的核心组分在多种人类癌症中表达异常,包括乳腺癌、脑胶质瘤、胃癌、肺癌、肝癌、结肠直肠癌和口腔鳞状细胞癌等。之前的研究表明, TAZ/YAP 可通过调控细胞增殖、迁移和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等方式促进肿瘤的发生发展<sup>[6,31,58,59]</sup>。

TAZ 蛋白在高度转移性的乳腺癌中表达水平和活性均有所上调。TAZ 的过表达足以诱导乳腺癌细胞的增殖、转化、迁移、侵袭和 EMT<sup>[58]</sup>,而敲低 TAZ 的表达会显著抑制 HCC1937 乳腺癌细胞系的生长<sup>[60]</sup>。当在 TAZ 低表达的乳腺上皮细胞系 MCF10A 中过表达 TAZ 时,细胞将会获得纺锤形、成纤维细胞样的形态,TAZ 可以通过与 TEADs 相互作用促进乳腺癌细胞的迁移、侵袭和 EMT<sup>[6,58]</sup>。在人乳腺癌样本中,TAZ 的表达情况与乳腺癌的分级密切相关,TAZ 表达越高,乳腺癌的级别越高,预后越差<sup>[59,61,62]</sup>。利用免疫组化方法在 640 例乳腺癌样本中检测 TAZ 的表达情况,发现 TAZ 在 65% 的三阴性乳腺癌中表达水平上升而且呈现核定位<sup>[61]</sup>。编码 TAZ 的基因在乳腺癌中也有显著的扩增,且 TAZ 的 mRNA 水平显著升高<sup>[61,62]</sup>。双调蛋白(amphiregulin, AREG)是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的配体之一。TAZ/TEAD 复合物可以通过诱导 AREG 的转录而实现一种依赖于 EGFR 且不依赖于表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的信号途径,进而驱动细胞增殖和迁移,而敲低 AREG 可以部分减弱 TAZ 依赖性的迁移。有意思的是,上述现象是非细胞依赖性的,被 TAZ 激活表达的 AREG 可以被分泌到细胞外,刺激相邻细胞的 EGFR 而引起其增殖和迁移。与体外细胞培养结果一致,TAZ 和 AREG 的表达在乳腺癌组织中呈正相关关系<sup>[63]</sup>。TAZ 还可以增加转录因子 KLF5(kruppel like factor 5)的蛋白

质稳定性,从而促进 *FGF-BP*(fibroblast growth factor-binding protein)基因转录和肿瘤生长<sup>[60]</sup>。此外,TAZ 对于维持乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs)的自我更新和肿瘤发生过程也是必需的。BCSCs 中 TAZ 的表达水平高于已经分化的乳腺癌细胞,敲低 BCSCs 中的 TAZ 则会抑制其迁移和转移<sup>[59,64]</sup>。KLF5 在 BCSCs 的干性维持中也发挥着重要的功能<sup>[65]</sup>,说明 TAZ 可能部分通过增加 KLF5 的稳定性来维持 BCSCs 的干性。另外,TAZ 和乳腺癌的耐药也密切相关,在乳腺上皮细胞系 MCF10 细胞中过表达 TAZ 可以促进细胞对紫杉醇的耐受;而在高表达 TAZ 的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞中敲低 TAZ 可以增加细胞对紫杉醇的敏感性。TAZ 主要是通过促进下游靶基因 *Cyr61*(cysteine rich angiogenic inducer 61)和 *CTGF*(connective tissue growth factor)的转录来发挥耐药功能<sup>[66]</sup>。

与 TAZ 一样,YAP 也可以作为癌基因在体内外促进乳腺癌的发生和进展。PyMT(polyoma middle T antigen)诱导的乳腺癌肿瘤中 YAP 的表达增加,而抑制 YAP 时 PyMT 诱导的肿瘤生长显著减慢<sup>[67,68]</sup>。YAP 的表达量及亚细胞定位与乳腺癌的分型密切相关。在 E-钙粘蛋白缺陷的浸润性小叶乳腺癌中,YAP 有更高的核定位比例,提示 YAP 可能参与浸润性小叶乳腺癌的发生和发展<sup>[69]</sup>。另一项研究显示,具有 YAP 高表达的人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)阳性乳腺癌患者的生存期较短<sup>[70]</sup>。YAP 主要通过 TEAD 等转录因子的相互作用促进乳腺癌细胞生长、进展和转移<sup>[67]</sup>,其他的转录因子也可能参与到这一过程中。KLF5 是促进乳腺细胞增殖和存活的致癌转录因子<sup>[71]</sup>。研究发现 YAP 可以与 KLF5 相互作用并阻止其被 E3 泛素连接酶 WWP1(WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1)进行泛素化,增加 KLF5 蛋白质的稳定性。YAP 过表达能够增加 KLF5 及其下游靶基因的表达,包括 *FGF-BP* 和 *ITGB2*(integrin subunit beta 2)。在 MCF10A 和 SW527 细胞中敲低 YAP 可以降低 KLF5、*FGF-BP* 和 *ITGB2* 的表达水平,并诱导细胞凋亡进而抑制肿瘤生长<sup>[72]</sup>。YAP 还可以通过促进透明质酸介导运动的受体(hyaluronan-mediated motility receptor, RHAMM)基因转录来促进乳

腺癌细胞的迁移和侵袭<sup>[73]</sup>。

对 TAZ/YAP 上游信号的研究表明, TAZ/YAP 在乳腺癌中发挥癌基因的功能(图 2)。除了 Hippo 信号通路的核心成员外, 越来越多的研究发现许多其他蛋白可以通过 Hippo 信号通路来促进乳腺癌的发生发展<sup>[74]</sup>。乳腺癌细胞经血清饥饿处理后, 高度活化的 LATS1/2 将诱导 130 kDa 同工型的血管动蛋白(Amot130)磷酸化, 并募集 E3 泛素连接酶 ITCH(E3 ubiquitin-protein ligase itchy homolog)来促进 YAP 的泛素化和降解, 最终抑制乳腺癌细胞的生长<sup>[75]</sup>。MARK4 能够结合 MST/SAV 复合物从而抑制 LAST 的磷酸化, 实现活化 TAZ/YAP 并促进乳腺癌细胞增殖和迁移<sup>[76]</sup>。孤儿受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1, ROR1)能够磷酸化人表皮生长因子受体 3(human epidermal growth factor receptor 3, HER3)1307 位酪氨酸残基从而募集 LLGL2, LLGL2(scribble cell polarity complex component)-MAYA(MST1/2-antagonizing for YAP activation)-NSUN6(NOP2/Sun RNA methyltransferase family member 6)RNA-蛋白复合物能够甲基化 MST 第 59 位的赖氨酸残基。被甲基化的 MST 失去激酶活性, 直接导致下游效应分子 TAZ/YAP 的激活并促进乳腺癌细胞骨转移<sup>[77]</sup>。这一系列研究均表明, TAZ/YAP 在乳腺癌生长过程中具有重要的促进作用。NPHP4(nephrocystin 4)是一种已知的纤毛相关蛋白, 能与 LATS1 相互作用并抑制 LATS1 磷酸化 TAZ/YAP。敲低 NPHP4 则会抑制乳腺癌细胞增殖<sup>[78]</sup>。另一个纤毛疾病蛋白 NPHP0(nephrocystin 9)与 14-3-3 竞争结合 TAZ, 从而与 TAZ 形成蛋白复合物并共同入核。敲低 NPHP9 同样抑制 TAZ 依赖性的乳腺癌细胞增殖<sup>[79]</sup>。抑制 G 蛋白亚基(Gβγ)和 RhoA 的香叶酰香叶酰化增强了 MST1/2 和 LATS1 的磷酸化, 从而抑制 TAZ/YAP 的活化, 减弱乳腺癌细胞的迁移<sup>[80]</sup>。整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)可以促进 YAP 核转运, 抑制 ILK 会导致 YAP 磷酸化, 使其滞留在细胞质中进而抑制肿瘤生长<sup>[81]</sup>。细胞外基质糖蛋白 EMILIN2(elastin microfibril interfacier 2)能够抑制 TAZ 活性和乳腺癌细胞的运动性<sup>[82]</sup>。细胞内一些经典信号通路与 Hippo 信号通路之间串话也逐渐被揭示。抑癌基因 PTEN(phosphatase and tensin

homolog)通过 PI3K(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)/AKT(AKT serine/threonine kinase)/GSK3 途径促进 TAZ 的 N 端磷酸化和蛋白酶体降解, 通过比较多种乳腺癌细胞系发现 TAZ 的表达量在 PTEN 突变的细胞系中明显增高<sup>[35]</sup>。最近研究发现, 转化生长因子 β(transforming growth factor beta, TGF-β)信号可以通过调节 TAZ/YAP 来调节乳腺癌细胞的转移。TAZ/YAP/TEAD 和 pSMAD2/3 结合形成特异性促癌转录程序, 诱导靶基因 NEGR1(neuronal growth regulator 1)和 UCA1(urothelial cancer associated 1)的表达, 进而促进乳腺癌细胞非锚定依赖性的生长、迁移和成瘤<sup>[83]</sup>。肾上腺糖皮质激素与配体结合, 诱导纤维连接蛋白 1(fibronectin1, FN1)的表达, 促进 Src(SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase)介导的细胞骨架重排, 进而使 YAP 入核, 促进乳腺癌的干性和耐药<sup>[84]</sup>。在乳腺癌细胞系中敲低 DLG5(discs large homolog 5), 使 Hippo 信号通路中的激酶处于失活状态, 促进 YAP 入核, 进而增加细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[85]</sup>。TAp63(tumor protein p63)通过调节 Hippo 信号通路抑制乳腺癌。在乳腺癌细胞中敲除 TAp63 可以抑制 Hippo 信号通路的活性, 升高 TAZ 表达水平, 最终促进肿瘤干细胞的自我更新<sup>[86]</sup>。在三阴性乳腺癌中, Aurora A 激酶可以在细胞核内磷酸化 YAP 的第 397 位丝氨酸残基, 促进 YAP 的功能<sup>[87]</sup>。

然而, YAP 的致癌作用尚存有争议。一些研究表明, YAP 在某些情况下可以作为乳腺癌中的肿瘤抑制因子。2008 年 Yuan 等<sup>[88]</sup>通过免疫组化发现, 与正常乳腺组织相比, 乳腺肿瘤组织中 YAP 的表达降低, YAP 的敲低保护了 MDA-MB-231 细胞免受失巢凋亡, 并促进了细胞迁移, 侵袭和肿瘤的生长。Yu 等<sup>[89]</sup>也得出了类似的结论, 他们在多种乳腺癌细胞系中均证实 miR-200a 可以通过靶向 YAP 使癌细胞逃避失巢凋亡并促进转移。同样, 细胞核内 YAP1 可以与 p53 家族成员 p73 相互结合并稳定 p73, 进而诱导促凋亡基因 PUMA(p53 upregulated modulator of apoptosis)在乳腺癌中的表达<sup>[90]</sup>。因此, YAP 在乳腺癌中的作用取决于具体的细胞环境。

Hippo 信号通路的其他元件在乳腺癌等肿瘤中



也有异常表达。在乳腺癌中 LATS1 和 LATS2 由于启动子区被高度甲基化而表达下调,进而使乳腺癌具备生物侵袭性<sup>[91]</sup>。最新的研究发现,LATS 能够促进雌激素受体  $\alpha$ (ER $\alpha$ )被 DDB1(damage specific DNA binding protein 1)-CUL4(cullin4)-DCAF1(DD-B1-CUL4 associated factor 1)复合物泛素化和蛋白酶体降解。而在 LATS 缺失的肿瘤细胞中,ER $\alpha$  和 TAZ/YAP 的蛋白质稳定性同时显著上调来协调控制乳腺癌细胞的命运<sup>[92]</sup>。这些元件大都通过 TAZ/YAP 这两个核心下游效应分子在肿瘤的发生发展中起着重要作用。

#### 4 Hippo 信号通路作为乳腺癌治疗靶点的临床策略

大量的研究表明:TAZ/YAP 作为 Hippo 信号通路中的核心元件在乳腺癌细胞的增殖、侵袭和转移等多个阶段发挥着重要作用。因此,TAZ/YAP 可能会成为有效的乳腺癌治疗靶点。

Hippo 信号通路主要通过 TEADs 等转录因子的相互作用和共激活来调节下游靶基因转录<sup>[32,33]</sup>。能够破坏 TAZ/YAP-TEAD 之间相互作用的化合物被认为是抑制 TAZ/YAP 致癌作用的候选药物<sup>[93]</sup>。Liu-Chittenden 等<sup>[94]</sup>通过筛选 FDA 批准的近 3000 种化合物,发现卟啉家族的成员如维替泊芬(VP)、血卟啉(HP)和原卟啉 IX(PPIX)能够显著抑制 TAZ/YAP 的活性。其中用作治疗黄斑变性的光敏剂维替泊芬能够显著解离 TAZ/YAP 和 TEAD 之间的相互作用,从而抑制下游靶基因转录。在小鼠模型中,维替泊芬能够阻断 YAP 诱导的肝癌发生,并且对携带 G 蛋白偶联受体  $\alpha$  亚基 q 编码基因(G protein subunit alpha q, *GNAQ*)突变的葡萄膜黑色素瘤细胞也表现出抗癌作用<sup>[93,95]</sup>。当然,不排除维替泊芬能以独立于 TAZ/YAP 的方式抑制癌细胞增殖和诱导癌细胞死亡的可能性<sup>[96]</sup>。VGLL4(vestigial like family member 4)也可以抑制 YAP-TEADs 复合物的形成,模拟 VGLL4 的肽段可以抑制人原发性胃癌细胞在裸鼠中成瘤<sup>[97,98]</sup>。基于 YAP/TEADs 复合物的结构,VGLL4 应当也具备破坏 TAZ 和 TEADs 之间的相互作用的效果。

另一种消除 TAZ/YAP 活性的策略是干扰其上

游调节物。正如上文提到的 Rho 蛋白和肌动蛋白细胞骨架能够广泛响应上游信号而调节 Hippo 信号通路,事实上,细胞骨架的动态变化就是 Hippo 信号通路的核心调控分子<sup>[31]</sup>。近几年的研究发现,抑制 Rho GTP 酶可以激活 LAT1/2 激酶活性,从而抑制 TAZ/YAP。最近,Sorrentino 等<sup>[52]</sup>发现他汀类药物可以抑制甲羟戊酸途径的限速酶 HMGCR,强烈减少 TAZ/YAP 的核定位。甲羟戊酸途径对于 Rho GTP 酶的异戊二烯化、膜结合和激酶活化是必需的。HMGCR 的抑制会强烈激活 LATS1/2 并降低 TAZ/YAP 的转录活性,从而抑制乳腺癌细胞的增殖和干性维持等作用。目前,亟待测试其他临床使用的甲羟戊酸途径的抑制剂,例如唑来膦酸(FDPS 抑制剂)、GGTI-2133(GGPP 抑制剂)和卵清蛋白抑制剂(SREBP 抑制剂)是否具有与他汀药物类似的抑制 TAZ/YAP 的作用。

#### 5 结语与展望

Hippo 信号通路作为控制细胞内外环境稳定的重要信号通路,在细胞增殖、凋亡、器官生长和肿瘤发生等过程中发挥着重要作用。在乳腺癌中,Hippo 信号通路的各个核心组分均存在表达异常的现象。例如,高表达的 TAZ 与乳腺癌的分级及预后情况密切相关。而 YAP 在乳腺癌中的作用还取决于具体的细胞环境,某些情况下甚至可以作为肿瘤抑制因子而抑制乳腺癌的发展。除 Hippo 信号通路的核心成员外,其他元件也可以通过 TAZ/YAP 这两个核心下游效应物在乳腺癌的发生发展中发挥着间接作用。

然而,Hippo 信号通路的各组分在乳腺癌中的具体功能和机制仍存在许多亟待解决的问题:

(1)目前已有的转基因小鼠模型中,几种 Hippo 信号通路关键组分(例如 MST1/2 和 MOB)在乳腺发育、乳腺癌发生和发展中的生理和病理作用还缺乏深入研究;

(2)如何在临床中运用 TAZ/YAP 靶向治疗乳腺癌是当前的核心挑战。现有的研究主要是根据每个单独的 Hippo 信号通路成员的免疫组化染色来确定其与乳腺癌恶性进展的关系。事实上,Hippo 上游信号、核心成员或下游效应物中任何一个发生异常都



会“殊途同归”的促进乳腺癌的发生发展。因此,如何在组织化学检查中定义 Hippo 信号通路活化值得商榷;

(3)众所周知,TAZ/YAP 的细胞核定位以及下游靶基因的表达可以更好地反映 Hippo 信号通路的活化程度。根据 Hippo 信号通路特征(Hippo signaling pathway signature)的变化作为标志物来研究 Hippo 信号通路在乳腺癌的分型、分级或转移可能比单一基因更加准确。这样的研究也可能帮助医生更加精准地选择合适的病人进行靶向 Hippo 信号通路的治疗;

(4)TAZ/YAP 作为 Hippo 信号通路中的下游效应物,受到相似的功能调节,并含有相似的结构域和基序,包括 14-3-3 结合基序、WW 结构域、卷曲螺旋结构域和 PDZ 结合基序。然而,这两种蛋白具有不同的组织表达模式,在特异性器官中的功能也不同。TAZ 和 YAP 之间的内在关系及区别仍需要深入研究;

(5)当前已发现 TAZ/YAP 的磷酸化及多泛素化修饰参与 TAZ/YAP 的亚细胞定位、稳定性和活性的调节。TAZ/YAP 是否还存在其他翻译后修饰?

(6)Hippo 信号通路中 TAZ/YAP 上游调节组分和下游靶基因尚未完全鉴定。作为 Hippo 信号通路的核心调控原件,细胞骨架是如何通过 LATS 依赖或非依赖的方式调控 TAZ/YAP 的?有哪些激酶或蛋白复合物可以感受细胞骨架的变化并将信号传递给 TAZ/YAP 呢?

进一步研究 TAZ/YAP 的调节机制及功能将揭开 Hippo 信号通路更多的奥秘,并有助于乳腺癌等癌症的靶向治疗。

## 参考文献(References):

- [1] Siegel R, Ma JM, Zou ZH, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9–29. [DOI]
- [2] Perou CM, Sørli T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge Ø, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000, 406(6797): 747–752. [DOI]
- [3] The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2012, 490(7418): 61–70. [DOI]
- [4] Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(1): 63–79. [DOI]
- [5] Zhao B, Wei XM, Li WQ, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu JD, Li L, Zheng P, Ye KQ, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*, 2007, 21(21): 2747–2761. [DOI]
- [6] Lei QY, Zhang H, Zhao B, Zha ZY, Bai F, Pei XH, Zhao SM, Xiong Y, Guan KL. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(7): 2426–2436. [DOI]
- [7] Cui CB, Cooper LF, Yang XL, Karsenty G, Aukhil I. Transcriptional coactivation of bone-specific transcription factor Cbfa1 by TAZ. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(3): 1004–1013. [DOI]
- [8] Jeong H, Bae S, An SY, Byun MR, Hwang JH, Yaffe MB, Hong JH, Hwang ES. TAZ as a novel enhancer of MyoD-mediated myogenic differentiation. *FASEB J*, 2010, 24(9): 3310–3320. [DOI]
- [9] Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp PA, Hopkins N, Yaffe MB. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, 2005, 309(5737): 1074–1078. [DOI]
- [10] Park KS, Whitsett JA, Di Palma T, Hong JH, Yaffe MB, Zannini M. TAZ interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-C. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17384–17390. [DOI]
- [11] Murakami M, Tominaga J, Makita R, Uchijima Y, Kurihara Y, Nakagawa O, Asano T, Kurihara H. Transcriptional activity of Pax3 is co-activated by TAZ. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(2): 533–539. [DOI]
- [12] Di Palma T, D'Andrea B, Liguori GL, Liguoro A, de Cristofaro T, Del Prete D, Pappalardo A, Mascia A, Zannini M. TAZ is a coactivator for Pax8 and TTF-1, two transcription factors involved in thyroid differentiation. *Exp Cell Res*, 2009, 315(2): 162–175. [DOI]
- [13] Varelas X, Sakuma R, Samavarchi-Tehrani P, Peerani R, Rao BM, Dembowy J, Yaffe MB, Zandstra PW, Wrana JL. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(7): 837–848. [DOI]
- [14] Mahoney WM, Jr, Hong JH, Yaffe MB, Farrance IKG. The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially

- with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *Biochem J*, 2005, 388(1): 217–225. [DOI]
- [15] Hong JH, Yaffe MB. TAZ: a  $\alpha$  &  $\beta$ -catenin-like molecule that regulates mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Cycle*, 2006, 5(2): 176–179. [DOI]
- [16] Chan SW, Lim CJ, Huang C, Chong YF, Gunaratne HJ, Hogue KA, Blackstock WP, Harvey KF, Hong W. WW domain-mediated interaction with Wbp2 is important for the oncogenic property of TAZ. *Oncogene*, 2011, 30(5): 600–610. [DOI]
- [17] Remue E, Meerschaert K, Oka T, Boucherie C, Vandekerckhove J, Sudol M, Gettemans J. TAZ interacts with zonula occludens-1 and-2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS Lett*, 2010, 584(19): 4175–4180. [DOI]
- [18] Kim M, Kim T, Johnson RL, Lim DS. Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. *Cell Rep*, 2015, 11(2): 270–282. [DOI]
- [19] Valencia-Sama I, Zhao YL, Lai D, Janse van Rensburg HJ, Hao YW, Yang XL. Hippo component TAZ functions as a co-repressor and negatively regulates  $\Delta$ Np63 transcription through TEA domain (TEAD) transcription factor. *J Biol Chem*, 2015, 290(27): 16906–16917. [DOI]
- [20] Hossain Z, Ali SM, Ko HL, Xu JL, Ng CP, Guo K, Qi Z, Ponniah S, Hong WJ, Hunziker W. Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of *Wwtr1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(5): 1631–1636. [DOI]
- [21] Tian Y, Kolb R, Hong JH, Carroll J, Li DW, You J, Bronson R, Yaffe MB, Zhou J, Benjamin T. TAZ promotes PC2 degradation through a SCF <sup>$\beta$ -Trcp</sup> E3 ligase complex. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(18): 6383–6395. [DOI]
- [22] Reginensi A, Scott RP, Gregorieff A, Bagherie-Lachidan M, Chung C, Lim DS, Pawson T, Wrana J, McNeill H. Yap-and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet*, 2013, 9(3): e1003380. [DOI]
- [23] Nakatani K, Maehama T, Nishio M, Goto H, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A. Targeting the Hippo signalling pathway for cancer treatment. *J Biochem*, 2016, 161(3): 237–244. [DOI]
- [24] Harvey K, Tapon N. The Salvador-Warts-Hippo pathway—an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3): 182–191. [DOI]
- [25] Zhao B, Li L, Lei QY, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev*, 2010, 24(9): 862–874. [DOI]
- [26] Hoa L, Kulaberoglu Y, Gundogdu R, Cook D, Mavis M, Gomez M, Gomez V, Hergovich A. The characterisation of LATS2 kinase regulation in Hippo-YAP signalling. *Cell Signal*, 2016, 28(5): 488–497. [DOI]
- [27] Li Q, Li SX, Mana-Capelli S, Flach RJR, Danai LV, Amcheslavsky A, Nie YC, Kaneko S, Yao XH, Chen XC, Cotton JL, Mao JH, McCollum D, Jiang J, Czech MP, Xu L, Ip YT. The conserved misshapen-warts-Yorkie pathway acts in enteroblasts to regulate intestinal stem cells in *Drosophila*. *Dev Cell*, 2014, 31(3): 291–304. [DOI]
- [28] Meng ZP, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, Park HW, Mo JS, Lu WQ, Lu SC, Flores F, Yu FX, Halder G, Guan KL. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun*, 2015, 6: 8357. [DOI]
- [29] Zheng YG, Wang W, Liu B, Deng H, Uster E, Pan DJ. Identification of Happyhour/MAP4K as Alternative Hpo/Mst-like Kinases in the Hippo Kinase Cascade. *Dev Cell*, 2015, 34(6): 642–655. [DOI]
- [30] Liu CY, Lv XB, Li TT, Xu YP, Zhou X, Zhao SM, Xiong Y, Lei QY, Guan KL. PP1 cooperates with ASPP2 to dephosphorylate and activate TAZ. *J Biol Chem*, 2011, 286(7): 5558–5566. [DOI]
- [31] Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. *Cell*, 2015, 163(4): 811–828. [DOI]
- [32] Zhang H, Liu CY, Zha ZY, Zhao B, Yao J, Zhao SM, Xiong Y, Lei QY, Guan KL. TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 2009, 284(20): 13355–13362. [DOI]
- [33] Zhao B, Ye X, Yu JD, Li L, Li WQ, Li SM, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, Lai ZC, Guan KL. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev*, 2008, 22(14): 1962–1971. [DOI]
- [34] Liu CY, Zha ZY, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, Li TT, Chan SW, Lim CJ, Hong WJ, Zhao SM, Xiong Y, Lei QY, Guan KL. The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF <sup>$\beta$ -Trcp</sup> E3 ligase. *J Biol Chem*, 2010, 285(48): 37159–37169. [DOI]
- [35] Huang W, Lv XB, Liu CY, Zha ZY, Zhang H, Jiang Y, Xiong Y, Lei QY, Guan KL. The N-terminal phosphodegron targets TAZ/WWTR1 protein for SCF <sup>$\beta$ -Trcp</sup>-dependent degradation in response to phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *J Biol Chem*, 2012, 287(31): 26245–26253. [DOI]
- [36] Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev*, 2010, 24(1): 72–85. [DOI]
- [37] Mo JS, Yu FX, Gong R, Brown JH, Guan KL. Regulation of the Hippo-YAP pathway by protease-activated receptors

- (PARs). *Genes Dev*, 2012, 26(19): 2138–2143. [DOI]
- [38] Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao JG, Yuan H, Tumaneng K, Li HR, Fu XD, Mills GB, Guan KL. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*, 2012, 150(4): 780–791. [DOI]
- [39] Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanonato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 2011, 474(7350): 179–183. [DOI]
- [40] Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu JD, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev*, 2012, 26(1): 54–68. [DOI]
- [41] Miller E, Yang JY, DeRan M, Wu CL, Su AI, Bonamy GM, Liu J, Peters EC, Wu X. Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP. *Chem Biol*, 2012, 19(8): 955–962. [DOI]
- [42] Zhou X, Wang SY, Wang Z, Feng X, Liu P, Lv XB, Li FL, Yu FX, Sun YP, Yuan HX, Zhu HG, Xiong Y, Lei QY, Guan KL. Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer. *J Clin Invest*, 2015, 125(5): 2123–2135. [DOI]
- [43] Yu FX, Zhang YF, Park HW, Jewell JL, Chen Q, Deng YT, Pan DJ, Taylor SS, Lai ZC, Guan KL. Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev*, 2013, 27(11): 1223–1232. [DOI]
- [44] Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev*, 2013, 27(4): 355–371. [DOI]
- [45] Zhou X, Wang Z, Huang W, Lei QY. G protein-coupled receptors: bridging the gap from the extracellular signals to the Hippo pathway. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2015, 47(1): 10–15. [DOI]
- [46] Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 1956, 124(3215): 267–270. [DOI]
- [47] Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*, 1956, 123(3191): 309–314. [DOI]
- [48] DeRan M, Yang JY, Shen CH, Peters EC, Fitamant J, Chan P, Hsieh M, Zhu SY, Asara JM, Zheng B, Bardeesy N, Liu J, Wu X. Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiotensin-like 1 protein. *Cell Rep*, 2014, 9(2): 495–503. [DOI]
- [49] Mo JS, Meng ZP, Kim YC, Park HW, Hansen CG, Kim S, Lim DS, Guan KL. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(4): 500–510. [DOI]
- [50] Wang WQ, Xiao ZD, Li X, Aziz KE, Gan BY, Johnson RL, Chen JJ. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(4): 490–499. [DOI]
- [51] Enzo E, Santinon G, Pocaterra A, Aragona M, Bresolin S, Forcato M, Grifoni D, Pession A, Zanonato F, Guzzo G, Bicciato S, Dupont S. Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *EMBO J*, 2015, 34(10): 1349–1370. [DOI]
- [52] Sorrentino G, Ruggeri N, Specchia V, Cordenonsi M, Mano M, Dupont S, Manfrin A, Ingallina E, Sommaggio R, Piazza S, Rosato A, Piccolo S, Del Sal G. Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(4): 357–366. [DOI]
- [53] Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, Clouthier SG, Wicha MS. Anti-angiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(8): 2784–2789. [DOI]
- [54] Schwab LP, Peacock DL, Majumdar D, Ingels JF, Jensen LC, Smith KD, Cushing RC, Seagroves TN. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2012, 14: R6. [DOI]
- [55] Xiang LS, Gilkes DM, Hu HX, Takano N, Luo WB, Lu HQ, Bullen JW, Samanta D, Liang HJ, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 mediates TAZ expression and nuclear localization to induce the breast cancer stem cell phenotype. *Oncotarget*, 2014, 5(24): 12509–12527. [DOI]
- [56] Xiang LS, Gilkes DM, Hu HX, Luo WB, Bullen JW, Liang HJ, Semenza GL. HIF-1 $\alpha$  and TAZ serve as reciprocal co-activators in human breast cancer cells. *Oncotarget*, 2015, 6(14): 11768–11778. [DOI]
- [57] Bendinelli P, Maroni P, Matteucci E, Luzzati A, Perrucchini G, Desiderio MA. Hypoxia inducible factor-1 is activated by transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) versus WWdomain-containing oxidoreductase (WWOX) in hypoxic microenvironment of bone metastasis from breast cancer. *Eur J Cancer*, 2013, 49(11): 2608–2618. [DOI]
- [58] Chan SW, Lim CJ, Guo K, Ng CP, Lee I, Hunziker W, Zeng Q, Hong WJ. A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res*, 2008, 68(8): 2592–2598. [DOI]
- [59] Cordenonsi M, Zanonato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, Inui M, Montagner M, Parenti AR, Poletti A, Daidone MG, Dupont S, Basso G, Bicciato S, Piccolo S. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell*, 2011, 147(4): 759–772. [DOI]

- [60] Zhao D, Zhi X, Zhou ZM, Chen C. TAZ antagonizes the WWP1-mediated KLF5 degradation and promotes breast cell proliferation and tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 2012, 33(1): 59–67. [DOI]
- [61] Díaz-Martín J, López-García MÁ, Romero-Pérez L, Atienza-Amores MR, Pecero ML, Castilla MÁ, Biscuola M, Santón A, Palacios J. Nuclear TAZ expression associates with the triple-negative phenotype in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2015, 22(3): 443–454. [DOI]
- [62] Skibinski A, Breindel JL, Prat A, Galván P, Smith E, Rolfs A, Gupta PB, Labaer J, Kuperwasser C. The Hippo transducer TAZ interacts with the SWI/SNF complex to regulate breast epithelial lineage commitment. *Cell Rep*, 2014, 6(6): 1059–1072. [DOI]
- [63] Yang N, Morrison CD, Liu PJ, Miecznikowski J, Bshara W, Han S, Zhu Q, Omilian AR, Li X, Zhang J. TAZ induces growth factor-independent proliferation through activation of EGFR ligand amphiregulin. *Cell Cycle*, 2012, 11(15): 2922–2930. [DOI]
- [64] Bartucci M, Dattilo R, Moriconi C, Pagliuca A, Mottolese M, Federici G, Di Benedetto A, Todaro M, Stassi G, Sperati F, Amabile MI, Pillozzi E, Patrizii M, Biffoni M, Maugeri-Saccà M, Piccolo S, De Maria R. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene*, 2015, 34(6): 681–690. [DOI]
- [65] Liu R, Shi PG, Nie Z, Liang HC, Zhou ZM, Chen WL, Chen HJ, Dong C, Yang RX, Liu SL, Chen CS. Mifepristone Suppresses Basal Triple-Negative Breast Cancer Stem Cells by Down-regulating KLF5 Expression. *Theranostics*, 2016, 6(4): 533–544. [DOI]
- [66] Lai D, Ho KC, Hao YW, Yang XL. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the Hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Res*, 2011, 71(7): 2728–2738. [DOI]
- [67] Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang ZG, Hynes RO. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(37): E2441–E2450. [DOI]
- [68] Chen Q, Zhang NL, Gray RS, Li HL, Ewald AJ, Zahnow CA, Pan DJ. A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis. *Gene Dev*, 2014, 28(5): 432–437. [DOI]
- [69] Vlug EJ, Van De Ven RAH, Vermeulen JF, Bult P, Van Diest PJ, Derksen PWB. Nuclear localization of the transcriptional coactivator YAP is associated with invasive lobular breast cancer. *Cell Oncol*, 2013, 36(5): 375–384. [DOI]
- [70] Kim SK, Jung WH, Koo JS. Yes-associated protein (YAP) is differentially expressed in tumor and stroma according to the molecular subtype of breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 3224–3234. [DOI]
- [71] Liu R, Dong JT, Chen C. Role of KLF5 in hormonal signaling and breast cancer development. *Vitam Horm*, 2013, 93: 213–225. [DOI]
- [72] Zhi X, Zhao D, Zhou ZM, Liu R, Chen CS. YAP promotes breast cell proliferation and survival partially through stabilizing the KLF5 transcription factor. *Am J Pathol*, 2012, 180(6): 2452–2461. [DOI]
- [73] Wang ZY, Wu YP, Wang HF, Zhang YQ, Mei L, Fang XX, Zhang XD, Zhang F, Chen HB, Liu Y, Jiang YY, Sun SN, Zheng Y, Li N, Huang LQ. Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(1): E89–E98. [DOI]
- [74] Shi PG, Feng J, Chen CS. Hippo pathway in mammary gland development and breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2015, 47(1): 53–59. [DOI]
- [75] Adler JJ, Johnson DE, Heller BL, Bringman LR, Ranahan WP, Conwell MD, Sun Y, Hudmon A, Wells CD. Serum deprivation inhibits the transcriptional co-activator YAP and cell growth via phosphorylation of the 130-kDa isoform of Angiomotin by the LATS1/2 protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17368–17373. [DOI]
- [76] Arash E H, Shibani A, Song SY, Attisano L. MARK4 inhibits Hippo signaling to promote proliferation and migration of breast cancer cells. *EMBO Rep*, 2017, 18(3): 420–436. [DOI]
- [77] Li CL, Wang SY, Xing Z, Lin AF, Liang K, Song J, Hu QS, Yao J, Chen ZY, Park PK, Hawke DH, Zhou JW, Zhou Y, Zhang SX, Liang H, Hung MC, Gallick GE, Han L, Lin CR, Yang LQ. A ROR1-HER3-lncRNA signalling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(2): 106–119. [DOI]
- [78] Habbig S, Bartram MP, Müller RU, Schwarz R, Andriopoulos N, Chen SH, Sägmüller JG, Hoehne M, Burst V, Liebau MC, Reinhardt HC, Benzing T, Schermer B. NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J Cell Biol*, 2011, 193(4): 633–642. [DOI]
- [79] Habbig S, Bartram MP, Sägmüller JG, Griessmann A, Franke M, Müller RU, Schwarz R, Hoehne M, Bergmann C, Tessmer C, Reinhardt HC, Burst V, Benzing T, Schermer B. The ciliopathy disease protein NPHP9 promotes nuclear delivery and activation of the oncogenic transcriptional regulator TAZ. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(26): 5528–5538. [DOI]



- [80] Mi W, Lin Q, Childress C, Sudol M, Robishaw J, Berlot CH, Shabahang M, Yang W. Geranylgeranylation signals to the Hippo pathway for breast cancer cell proliferation and migration. *Oncogene*, 2015, 34(24): 3095–3106. [DOI]
- [81] Serrano I, McDonald PC, Lock F, Muller WJ, Dedhar S. Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase. *Nat Commun*, 2013, 4: 2976. [DOI]
- [82] Marastoni S, Andreuzzi E, Paulitti A, Colladel R, Pellicani R, Todaro F, Schiavinato A, Bonaldo P, Colombatti A, Mongiat M. EMILIN2 down-modulates the Wnt signalling pathway and suppresses breast cancer cell growth and migration. *J Pathol*, 2014, 232(4): 391–404. [DOI]
- [83] Hiemer SE, Szymaniak AD, Varelas X. The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor  $\beta$ -induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2014, 289(19): 13461–13474. [DOI]
- [84] Sorrentino G, Ruggeri N, Zannini A, Ingallina E, Bertolio R, Marotta C, Neri C, Cappuzzello E, Forcato M, Rosato A, Mano M, Biciatto S, Del Sal G. Glucocorticoid receptor signalling activates YAP in breast cancer. *Nat Commun*, 2017, 8: 14073. [DOI]
- [85] Liu J, Li J, Li PP, Wang YC, Liang ZY, Jiang YN, Li J, Feng C, Wang RQ, Chen H, Zhou C, Zhang JM, Yang J, Liu PJ. Loss of DLG5 promotes breast cancer malignancy by inhibiting the Hippo signaling pathway. *Sci Rep*, 2017, 7: 42125. [DOI]
- [86] Su X, Napoli M, Abbas HA, Venkatanarayan A, Bui NHB, Coarfa C, Gi YJ, Kittrell F, Gunaratne PH, Medina D, Rosen JM, Behbod F, Flores ER. TAp63 suppresses mammary tumorigenesis through regulation of the Hippo pathway. *Oncogene*, 2016, 36(17): 2377–2393. [DOI]
- [87] Chang SS, Yamaguchi H, Xia W, Lim SO, Khotskaya Y, Wu Y, Chang WC, Liu Q, Hung MC. Aurora A kinase activates YAP signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 2017, 36(9): 1265–1275. [DOI]
- [88] Yuan M, Tomlinson V, Lara R, Holliday D, Chelala C, Harada T, Gangeswaran R, Manson-Bishop C, Smith P, Danovi SA, Pardo O, Crook T, Mein CA, Lemoine NR, Jones LJ, Basu S. Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast. *Cell Death Differ*, 2008, 15(11): 1752–1759. [DOI]
- [89] Yu SJ, Hu JY, Kuang XY, Luo JM, Hou YF, Di GH, Wu J, Shen ZZ, Song HY, Shao ZM. MicroRNA-200a promotes anoikis resistance and metastasis by targeting YAP1 in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(6): 1389–1399. [DOI]
- [90] Matallanas D, Romano D, Yee K, Meissl K, Kucerova L, Piazzolla D, Baccarini M, Vass JK, Kolch W, O'Neill E. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol Cell*, 2007, 27(6): 962–975. [DOI]
- [91] Takahashi Y, Miyoshi Y, Takahata C, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Down-regulation of *LATS1* and *LATS2* mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(4): 1380–1385. [DOI]
- [92] Britschgi A, Duss S, Kim S, Couto JP, Brinkhaus H, Koren S, De Silva D, Mertz KD, Kaup D, Varga Z, Voshol H, Vissieres A, Leroy C, Roloff T, Stadler MB, Scheel CH, Miraglia LJ, Orth AP, Bonamy GM, Reddy VA, Bentires-Alj M. The Hippo kinases LATS1 and 2 control human breast cell fate via crosstalk with ER $\alpha$ . *Nature*, 2017, 541(7638): 541–545. [DOI]
- [93] Sudol M, Shields DC, Farooq A. Structures of YAP protein domains reveal promising targets for development of new cancer drugs. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(7): 827–833. [DOI]
- [94] Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee SJ, Anders RA, Liu JO, Pan DJ. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev*, 2012, 26(12): 1300–1305. [DOI]
- [95] Feng X, Degese MS, Iglesias-Bartolome R, Vaque JP, Molinolo AA, Rodrigues M, Zaidi MR, Ksander BR, Merlino G, Sodhi A, Chen Q, Gutkind JS. Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell*, 2014, 25(6): 831–845. [DOI]
- [96] Zhang HB, Ramakrishnan SK, Triner D, Centofanti B, Maitra D, Győrffy B, Sebolt-Leopold JS, Dame MK, Varani J, Brenner DE, Fearon ER, Omary MB, Shah YM. Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1. *Sci Signal*, 2015, 8(397): 98. [DOI]
- [97] Jiao S, Wang HZ, Shi ZB, Dong AM, Zhang WJ, Song XM, He F, Wang YC, Zhang ZZ, Wang WJ, Wang X, Guo T, Li PX, Zhao Y, Ji H, Zhang L, Zhou ZC. A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer Cell*, 2014, 25(2): 166–180. [DOI]
- [98] Zhang WJ, Gao YJ, Li PX, Shi ZB, Guo T, Li F, Han XK, Feng Y, Zheng C, Wang ZY, Li FM, Chen H, Zhou ZC, Zhang L, Ji HB. VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell Res*, 2014, 24(3): 331–343. [DOI]