

Hippo 信号通路结构生物学研究进展

胡立桥¹, 周兆才², 田伟¹

1. 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074;

2. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031

摘要: 生物体内存在多种信号转导通路参与发育调控和组织稳态维持等重要过程, 其信号异常与多种疾病特别是癌症的发生和发展密切相关。进化上高度保守的 Hippo 信号通路在个体发育和稳态平衡中发挥极为关键的作用。Hippo 信号通路主要通过一系列相关激酶的相互作用和级联磷酸化来传递信号, 能抑制细胞增殖并促进凋亡, 在很多组织器官中控制细胞数量和器官大小。Hippo 信号通路在一系列恶性肿瘤中出现显著异常, 被认为是癌症治疗和再生医学的重要靶标。目前, Hippo 信号通路中大部分关键组分已经确定, 而其具体信号调控机制及功能正在完善之中。本文总结了目前已知的 Hippo 信号通路各蛋白成员的结构信息, 重点从结构生物学角度对其信号的转导与调控机制进行分析, 并对已有的 Hippo 信号通路靶向小分子及多肽抑制剂进行梳理, 以期深化人们对该通路关键蛋白质机器的理解, 并进一步促进相关的功能研究和潜在的治疗干预研发。

关键词: Hippo 信号通路; 癌症; 蛋白质相互作用; 蛋白质分子结构; 抑制剂

Research progresses on the molecular structure of the Hippo signaling pathway components

Liqiao Hu¹, Zhaocai Zhou², Wei Tian¹

1. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

2. Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

Abstract: The Hippo signaling pathway has been identified to be involved in development and tissue homeostasis during the past decade, and is evolutionarily conserved from *Drosophila* to mammals. It transduces the signal through a series of protein-protein interaction and kinase cascades, to control the cell number and organ size by inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis. Dysregulation of the Hippo signaling pathway is associated with tumorigenesis and cancers, so it is a crucial target for cancer therapy and regeneration medicine. Most of the Hippo signaling pathway components have been identified, and the cellular function and molecular mechanism have been revealed by structural and functional researches. In this review, we summarize the molecular structure of Hippo signaling pathway components and related targeting inhibitors from a structural view. We hope to improve the understandings of the regulation mechanism of the Hippo signaling transduction, and facilitate further functional studies and potential the-

收稿日期: 2017-02-23; 修回日期: 2017-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31500629)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31500629)]

作者简介: 胡立桥, 博士研究生, 研究方向: 结构生物学。E-mail: liq@hust.edu.cn

通讯作者: 田伟, 博士, 教授, 研究方向: 生物化学和结构生物学。E-mail: tianwei@hust.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-062

网络出版时间: 2017/6/13 15:15:43

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170704.1610.004.html>

rapeutic interventions.

Keywords: Hippo signaling pathway; cancer; protein-protein interaction; molecular structure of protein; inhibitor

Hippo 信号通路在很多组织器官中通过抑制细胞增殖和促进凋亡来调控器官大小,在发育和稳态平衡中发挥重要作用^[1-6]。Hippo 信号通路的核心成员首先是在果蝇中通过遗传筛选被鉴定出来。在果蝇中,该通路主要包括 Hpo、Sav、Wts、Mob1 和 Yki,这些蛋白的激活会导致果蝇组织的过度生长^[7-16]。Hpo、Sav、Wts 和 Mob1 形成激酶级联反应,其中 Hpo-Sav 复合物磷酸化 Wts 和 Mob1,然后活化的 Wts-Mob1 复合物进一步磷酸化转录共激活因子 Yki 并使其失活^[11,16-22]。Hippo 信号通路在哺乳动物中也高度保守,主要包括 MST1/2、SAV1、LATS1/2、MOB1A/B 和 YAP/TAZ^[19,23,24]。磷酸化的 YAP/TAZ 被 14-3-3 蛋白募集,从而滞留在细胞质中^[23-25],然后进一步被蛋白酶体降解^[26,27]。在缺乏或阻断 Hippo 信号转导的情况下,未磷酸化的 YAP/TAZ 进入细胞核作为转录共激活因子,结合并激活 TEA 结构域家族转录因子 TEAD(果蝇中同源物为 Sd,哺乳动物中含有 TEAD1-4,也分别称为 TEF-1、TEF-4、TEF-5 和 TEF-3),进而调控下游靶基因如 *CTGF1* 和 *Cyr61* 等的转录表达,促进细胞增殖并抑制细胞凋亡。

近年来,很多 Hippo 信号通路的调节因子被鉴定出来^[28-31]。细胞中一些顶端-基底极性的蛋白质组分,如 NF2、KIBRA、CRB、AMOT、SCRIB 和 DLG 等蛋白,通过调节 Hippo 信号通路组分的亚细胞定位来调控该信号通路的活性。平面细胞极性也可以激活或抑制 Hippo 信号,在果蝇中 Fat 和 Dachous 能够影响 Wts 和 Yki 活动。也有实验数据表明,细胞外基质和细胞骨架也可以影响 YAP/TAZ 活性^[32]。Hippo 信号通路的其他调控蛋白,包括 RASSFs、GPCR(G 蛋白耦联受体)、TAO1、MARK1、SIK1、MASK 和 PP2A 等,也是其他信号通路的重要组分,表明 Hippo 和其他信号通路之间存在广泛的相互联系^[33],如 Wnt 信号中的 DVL 和 β -catenin,能够调节 YAP/TAZ 的定位、降解和活性^[34]。YAP/TAZ 与 SMAD 家族成员共同维持干细胞多能性或诱导特异性干细胞分化的功能^[35]。近 10 年来,科学家们对

Hippo 信号通路的生化特性和结构特征开展了大量的研究,深入揭示了 Hippo 信号转导的分子机制。本综述重点关注 Hippo 上游调控蛋白、核心激酶与 TEAD 转录复合物,以及靶向 Hippo 信号通路的抑制剂,从结构生物学角度讨论 Hippo 信号通路调控的分子机制。

1 核心激酶级联效应的上游调控

1.1 NF2/Merlin

NF2 最初是在 II 型神经纤维瘤(neurofibromatosis type 2)中被鉴定出来的抑癌基因(果蝇中的同源基因为 *Mer*)^[36,37]。NF2 编码蛋白为 Merlin,主要定位在细胞质膜上,处于 Hippo 信号通路中核心激酶的上游,可以直接招募 LATS1/2,促进 MST 对 LATS1/2 的磷酸化,从而激活整个 Hippo 信号通路^[38]。Merlin 属于 ERM(Ezrin-radixin-moesin family)家族蛋白,其氨基端含有一个典型的 FERM 结构域,羧基端(CTD)能够与 FERM 结构域相互作用^[39-41]。与普通 ERM 蛋白不同的是,Merlin 蛋白的氨基端和羧基端的结合并不紧密,自身结构维持在一种半张开构象^[42]。Merlin 蛋白的 FERM-CTD 晶体结构显示,FERM 结构域是典型的三叶草结构,CTD 由 4 个短 α 螺旋组成且与 FERM 形成闭合状态(图 1A)。其中尾部 A585W 突变能够显著增强 CTD 和 FERM 的相互作用,并且 C 端 $\alpha 1$ 的疏水结合也构成了极强的相互作用。而在 FERM 结构域与 LATS1/2 的复合物结构中,LATS1/2 中 FBD (FERM binding domain)与 Merlin_CTD 中 $\alpha 1$ 结合到 FERM 上几乎相同的位置(图 1B)。这两种复合物分子结构清晰地揭示了 Merlin 进行张开—闭合两种构象转换的分子基础,以及张开状态结合 LATS1/2 的分子机制^[43]。

2 核心激酶复合物结构

2.1 MST1/2 激酶及其调节因子 SAV1 和 RASSFs

MST1/2 激酶属于 STE20 激酶亚家族,由 N 端激酶结构域、中部抑制区和 C 端 SARAH(Sav/Rassf/Hpo)结构域组成^[44-46]。MST1/2 激酶结构具有典型

的激酶折叠方式，结构上分为 N-lobe 和 C-lobe^[47]。活性构象的 MST1 晶体结构显示，其活性 loop 中 T177 和 T183 残基被磷酸化并呈现出一种扩展构象，磷酸化的 T183 中的磷酸基团能够与 HRD 基团中的 R181 和 R148 形成静电相互作用(图 2A)。同时，活

性 loop 中的 T183 也是主要的自磷酸化位点，在 MST4 中也发现了类似的自身磷酸化方式^[48~50]。相反，已报道的 MST2 激酶结构展示出了无活性构象，其中 DFG 基团中的 D146 突变为天冬酰胺，非磷酸化的活性 loop 折叠成螺旋状态^[47]。MST1 和 MST2 激

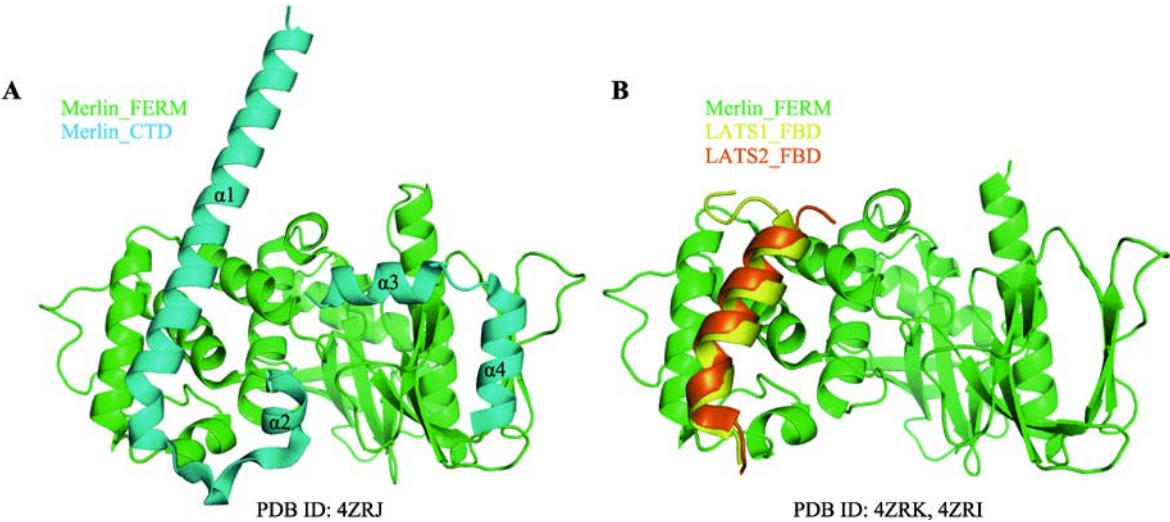


图 1 Merlin 蛋白的 FERM-CTD 结构(A)及 Merlin_FERM 与 LATS1/2_FBD 复合物结构(B)
Fig. 1 The structure of Merlin FERM-CTD (A) and Merlin_FERM-LATS1/2_FBD complexes (B)

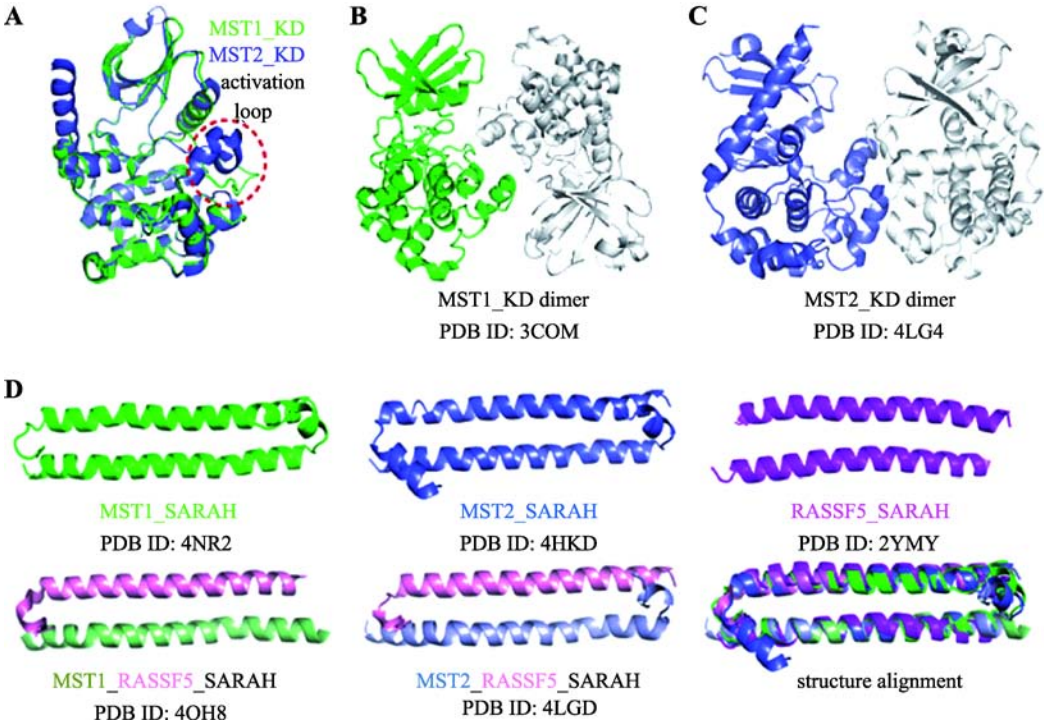


图 2 MST1/2 激酶结构与 SARAH 同源、异源二聚体结构
Fig. 2 Structures of MST1/2 kinases and SARAH in homodimers and hetero-dimers
A~C : MST1/2 的激酶结构与二聚化状态；D : MST1/2 与 RASSF5 的 SARAH 结构域同源或异源二聚体结构。

酶结构域在晶体中形成二聚体(图 2, B 和 C), 主要由 C-lobe 中的 α EF 和 α G 螺旋介导。在无活性的 MST2 激酶结构域中, 活性 loop 也参与二聚化。两种 MST 结构揭示了 MST1/2 如何发挥其激酶活性以及磷酸化基团发生活化时的分子特征变化。

MST1/2 的中部抑制性区域是不具备典型折叠的无序状态, 位于激酶结构域和 SARAH 结构域之间^[51,52]。该区域含有半胱天冬酶(caspase)识别位点, 半胱天冬酶消化掉 MST1/2 的抑制性结构域, 导致细胞凋亡中的 MST1/2 活化^[53]。MST1 抑制域也能增加其 SARAH 域二聚体的热力学稳定性, 但 MST1/2 抑制域的抑制机制还有待进一步研究。

MST1/2 的 SARAH 结构域可以介导其自身的二聚化, 或与其他蛋白的 SARAH 结构域形成异源二聚体^[19,44,54~56]。MST1/2 的调节因子主要包括 SAV1 和 RASSF 蛋白家族。RASSF 蛋白家族包含 10 个成员(RASSF1~10), 其 N 端或 C 端均包含一个保守的 Ras 结合区域。RASSF1~6 的 C 端含有 SARAH 结构域, RASSF7~10 中则没有该结构域^[57,58]。SAV1 包含两个 WW 域和 C 端的 SARAH 结构域。SARAH 结构域可介导 MST1/2 与其调节因子 SAV1 和 RASSF 的同源和异源二聚化, 在调节 MST1/2 激酶活性方面发挥重要作用^[19,44,45,54~56]。

MST1/2 的 SARAH 结构域在单体状态下是热力学不稳定的, 而由 SARAH 结构域介导的同源二聚化则是激酶活性所必需的^[57,59]。MST1/2 或 RASSF5 的 SARAH 结构域单独形成对称的同源二聚体^[52,56,60~62]。MST1/2 的 SARAH 同源二聚体的每个单体都含有两个螺旋 H1 和 H2, 而 RASSF5 的单体只有一个螺旋,

即对应于 MST1/2 蛋白 SARAH 的 H2 螺旋。在异源二聚体相互作用中, RASSF5_SARAH 和 MST1/2_SARAH 的 H2 螺旋折叠成反平行卷曲螺旋。疏水相互作用主导着 SARAH 域同源或异源二聚化, 而静电相互作用和氢键进一步稳定二聚体界面(图 2D)。尽管这些 SARAH 结构域的总体结构是相似的, 但局部构象不同, 意味着 SARAH 结构域具有动态性质^[60~62]。

SAV1 的结合可增强 MST1/2 激酶活性, 而 RASSFs 对 MST1/2 的影响还不明确^[50,51,59,63,64]。与同源二聚化的方式极为类似, MST1/2_SARAH 结构域与 RASSF5_SARAH 结构域形成异源二聚体, 但异源二聚体具有更多的分子间氢键和疏水相互作用, 构象更为稳定^[52,61,65]。因此, SARAH 结构域作为通用二聚化模块发挥作用时, 优选异源二聚体。当与 MST1/2 形成异源二聚体时, SAV1_SARAH 结构采用相似的折叠。SAV1 和 RASSFs 对 MST1/2 激活的差异效应可能是不同的招募分子引起的, 且依赖于不同的细胞环境。

SAV1 含有两个 WW 结构域——WW1 和 WW2, 可以结合 LATS1/2^[15]。WW 结构域的命名源于内部两个保守的色氨酸残基^[66]。与典型的 WW 结构域一样, SAV1_WW1 结构域是由 3 条反平行 β -折叠链组成的单体(图 3A)。SAV1 的 WW1 结构域可以结合 PPxY 序列, 介导“蛋白-蛋白”间的相互作用, 但其配体结合的特异性仍有待进一步探究。在 SAV1_WW2 结构中, 具有类似的 WW 折叠, 但 SAV1_WW2 形成对称的类似 β -clam 样的同源二聚体(图 3B)^[67]。不同于 WW 单体结构, WW2 结构域中存在一些

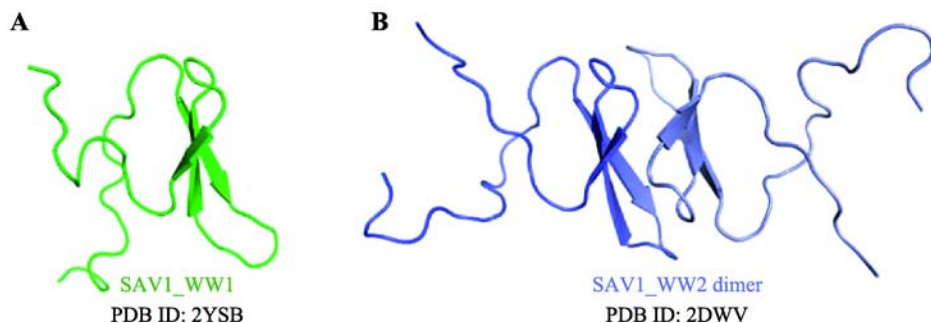


图 3 SAV1 蛋白 WW1 与 WW2 的分子结构及其二聚化状态

Fig. 3 The structure of SAV1_WW1 and WW2 dimer

A: SAV1_WW1 单体结构; B: SAV1_WW2 二聚化状态。

疏水性残基(如 V244 和 F249)参与形成二聚体的相互作用界面。但 SAV1_WW2 结构域的二聚体功能目前仍不清楚。

2.2 pMST2-MOB1 复合物

MOB1 在酵母和哺乳动物等真核生物中高度保守。人源 MOB1 结构由 4 个左手螺旋束和几个柔性环组成,其中螺旋 H2、H4、H5 和 H7 形成四螺旋束,一端由螺旋 H3 和 H6 封闭^[68~71]。两个半胱氨酸(C79 和 C84)和两个组氨酸(H161 和 H166)非常保守,能够配位锌原子以稳定 MOB1 的结构(图 4A)^[70]。

在 pMST2-MOB1 结构中,MOB1 核心(52~211 残基)与游离 MOB1 构象相似,表明 pMST2 的结合没有明显改变 MOB1 核心的构象。pMST2-MOB1 相互作用的界面分为两个部分:在第一个位点(pT 结合位点)中,pMST2 的氨基酸残基(378~384)折叠成链 $\beta 1$,与 MOB1 的 S1/S2- β 发夹、螺旋 H5 和 H8 形成直接互作。MST2 的磷酸化残基 pT378 与 MOB1 中螺旋 H5 上的 K153、R154 和 R157 形成强作用力的氢键;在第二位点(HS 结合位点),pMST2 的氨基酸残基(390~398)结合到 MOB1 螺旋 H6 和 H9 之间的浅沟槽内。pMST2 的 Arg390 与 MOB1 的 Glu206 形成较强的静电相互作用。在此位点中,pMST2 中高度保守的 FMDYF 疏水序列折叠成短螺旋通过疏水相互作用与 MOB1 接触(图 4B)^[71]。

值得注意的是,MST 激酶家族还包含 MST3 和 MST4 等成员,它们的激酶结构域和 MST1/2 具有较高的一级序列同源性;而 MOB 家族除了 MOB1 之

外,也包含其他成员如 MOB4 等。目前,仍缺乏对于 MOB 家族和 MST 家族成员之间相互作用的系统性研究,其特异性结合与激活对 Hippo 信号通路的调节关系尚有待进一步探索。

2.3 LATS1/2-MOB1 复合物

在 Hippo 信号通路中,MST1/2 分别磷酸化 MOB1 和 LATS1/2,激活 LATS1/2 并增强其与 MOB1 的结合^[18,21]。磷酸化的 MOB1 进一步结合并促进 LATS1/2 自磷酸化和激酶活性,导致 LATS1/2 的完全激活。LATS1/2 属于 NDR(nuclear dbf2-related)家族类 A/G/C 激酶成员,主要包含 UBA 结构域、S100B 和 MOB 结合(SMA)结构域、激酶结构域和 AGC 激酶 C 端结构域。虽然尚未完全解析 LATS1/2 的分子结构,但 AGC 激酶活化的一般机制已较为清楚^[72]。AGC 激酶活化需要激酶结构域中的活性 loop 环和疏水基序的磷酸化。LATS1 的两个磷酸化位点 Ser909 和 Thr1079 能够被 MST1/2 磷酸化^[19]。疏水基序的磷酸化能够结合 AGC 激酶的 N-lobe 以稳定 αC 螺旋构象,而活性 loop 环的磷酸化可以改变催化中心的构象。这两处保守区域的磷酸化是进一步激活 AGC 激酶所必需的^[72]。与其他 AGC 激酶不同,LATS1/2 在激酶结构域之前具有 SMA 结构域,在激酶结构域具有自身抑制序列(autoinhibitory sequence, AIS)。MOB1 结合 LATS1/2 的 SMA 结构域并减轻 AIS 的抑制作用^[73,74]。

在人源 LATS1-pMOB1 复合物的晶体结构中,Mob1 呈现了与游离 MOB1 几乎相同的构象。MOB1

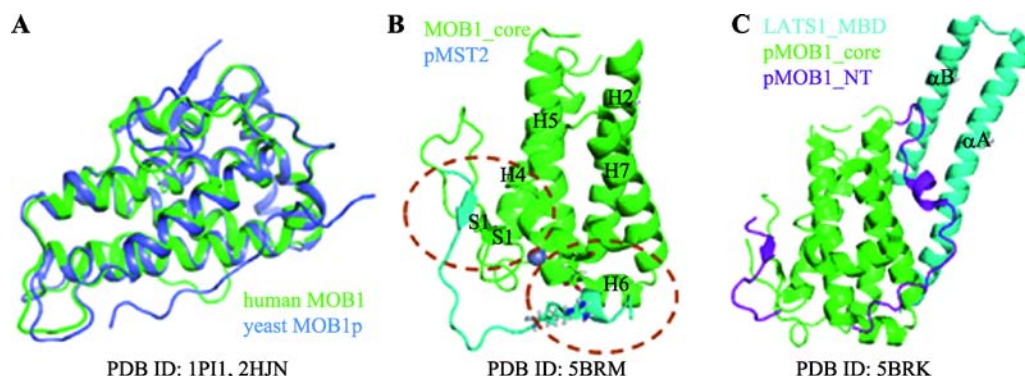


图 4 MOB1 与 MST2-MOB1、LATS1-MOB1 复合物晶体结构

Fig. 4 The structure of MOB1 and MST2/LATS1-MOB1 complexes

A :MOB1/MOB1p 结构 ;B pMST2-MOB1 复合物结构 ,左上虚线圆圈所示为 pT 位点 ,右下虚线圆圈所示为 HS 位点 ;C :LATS1-pMOB1 复合物结构。

的 N 端形成 3 个二级结构元件： β 链 S0， $_{310}$ 螺旋 H0 和 α 螺旋 H1。这 3 个元件在分子内与 MOB1 核心区域相互作用(图 4C)^[74]。N 端的磷酸化苏氨酸(pT12)结合 MOB1 的 pT 结合位点，螺旋 H0 结合到 MOB1 的 HS 结合位点，而 α 螺旋 H1 与核心区域的螺旋 H7 通过疏水和电荷相互作用。在此结构中，LATS1(632~699)折叠成两个反向平行的螺旋，与 pMOB1 的 H2、H7 和 NT 残基(35~51)形成的表面发生直接相互作用。LATS1 和 pMST2 结合 MOB1 的表面不重叠，这表明 LATS1 和 MST2 可以同时结合 MOB1。pMOB1 和 LATS1 之间有 3 个主要互作面：界面 1 涉及 LATS1 中 α A 的 N 末端部分和 MOB1 中 H0 与 H1 之间的 loop 区域；界面 2 和 3 彼此接近，主要涉及 LATS1 中 α A 的中间部分和 α B 的 C 端部分，与 MOB1 的 H2 和 H7 螺旋以及 H4 与 H5 之间的 loop 形成静电相互作用^[74]。

2.4 LATS-YAP/TAZ 复合物

YAP/TAZ 在一级序列上大致分为 N 端 TEAD 结合域(TBD)、转录激活域和 C 端 PDZ 结合域。此外，YAP 最长的亚型含有 WW1 和 WW2 两个 WW 结构域，而在人源 TAZ 中只有一个 WW 结构域。YAP/TAZ 通过 WW 结构域与多种蛋白相互作用，如 LATS1/2、SMAD1/7、AMOT 和 P73，调节多种信号通路传导^[4,75~77]。LATS1 和 LATS2 分别含有两个和一个 PPxY 序列。LATS1 中的第二个 PPxY 序列在 LATS2 中是保守的，该 PPxY 序列与 YAP 发生直接相互作用^[78]。LATS-YAP/TAZ 复合物目前并没有结构信息，

但是 YAP_WW1 或 WW2 与其他蛋白 PPxY 序列的复合物结构已被解析(图 5，A 和 B)^[79~83]。

YAP 的每个 WW 结构域由 3 条反平行 β -折叠链组成，由于 β 链之间 loop1 的残基不同，导致 YAP 的 WW1 和 WW2 结构域对结合对象具有不同的偏好^[81,84]。WW2 结构域结合 PPxY 序列，而 WW1 结构域可结合 PPxY 序列和 pSP 序列。YAP 通过其串联的 WW1 和 WW2 分别识别 SMAD1 的 pSP 序列和 PPxY 序列^[81]。在 YAP_WW1 与 WBP-1 的复合物结构中，WBP-1 的 PPxY 序列中的两个脯氨酸和一个酪氨酸与 YAP_WW1 结构域的疏水腔相互作用^[79,81]。PPxY 序列的周围残基也会影响到 WW 结构域的选择性结合。SMAD7 的 PPxY 序列的 N 端和 C 两端通过极性相互作用影响与 YAP_WW2 的相互作用^[84]。与 WW1 结构域相比，YAP 的 WW2 结构域对 SMAD7 的 PPxY 序列的亲和力较低，因为其 loop1 排斥 SMAD7 的 PPxY 序列(图 5B)。一些 YAP 结合蛋白具有两个或多个 PPxY 序列，可增强 YAP 串联 WW 结构域的结合能力^[82]。

2.5 YAP/TAZ-14-3-3 复合物

LATS1/2 磷酸化 YAP/TAZ 的 S127 位点(果蝇中 Wts 磷酸化 Yki 的 Ser168 位点)，导致磷酸化的 YAP/TAZ 与胞质内的 14-3-3 蛋白结合，从而滞留在细胞质内^[17,23~25]。14-3-3 σ 与 YAP 磷酸化肽段(124~133)的复合物结构(图 5C)显示，14-3-3 σ 蛋白呈现典型 W 形的二聚体形式，而 YAP 肽段与 14-3-3 σ 中由螺旋 H3、H5、H7 和 H9 产生的亲水亲脂性凹

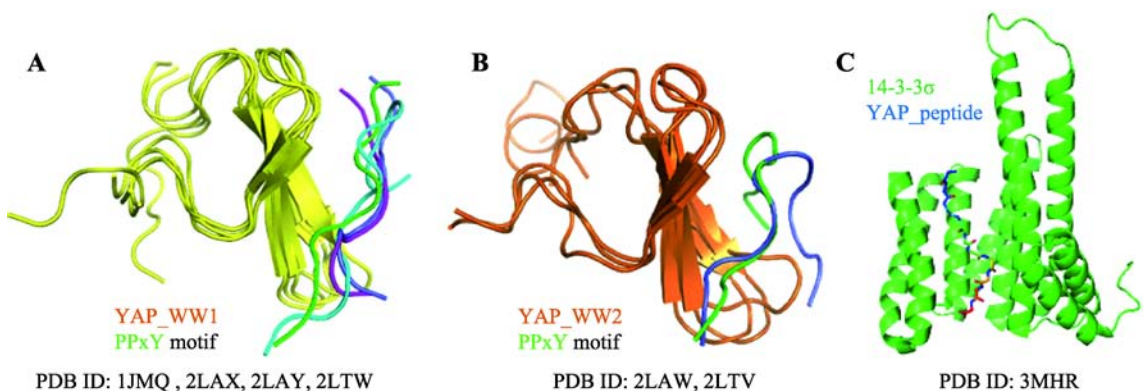


图 5 YAP 的 WW1/WW2 与 PPxY 片段的分子结构及 14-3-3 σ 与 YAP 片段的复合物结构

Fig. 5 The structure of YAP_WW1 and WW2 domains, the YAP-peptide and 14-3-3 σ complexes

A、B：YAP_WW1/WW2 与不同蛋白 PPxY 基序复合物结构；C：YAP 磷酸化片段与 14-3-3 σ 复合物结构。

槽相结合^[85]。该复合物结构从分子水平揭示了磷酸化的 YAP 蛋白被 14-3-3 蛋白滞留的分子机制。

3 TEAD 转录复合物结构

3.1 YAP/TAZ-TEAD 复合物

TEAD 蛋白家族(TEAD1~4)在一级结构上主要由 N 端 TEA 结构域和 C 端 YAP 结合域(YBD)组成^[86,87]。YAP/TAZ 通过其 TBD 结构域与 TEAD 的 YBD 区域形成复合物,反式激活下游基因的转录表达^[4,88]。TEAD_YBD 的分子结构由内部类似免疫球蛋白的 β -夹心折叠和外周 4 个短螺旋组成^[89~91]。YAP_TBD 由 β 折叠链、 α 螺旋和扭转螺旋串联组成,通过 3 个界面与 TEAD_YBD 结合(图 6A)^[89,90]。界面 1 为 YAP_TBD 的 β 链和 TEAD_YBD 的 $\beta 7$ 链互作形成反平行的 β -折叠。界面 2 上 YAP_TBD 的 α 螺旋结合到 TEAD_YBD 中的疏水槽内。在界面 3 上, YAP_TBD 的扭转螺旋嵌入 TEAD_YBD 的疏水口袋中。关键氨基酸的突变研究表明,界面 3 对 YAP-TEAD 复合物的形成至关重要。YAP 与 TEAD 相互作用的分子基础是 Hippo 信号通路的调控终端,是一些重要基因的转录起始所必须的。该复合物的分子结构不仅阐述了 YAP 与 TEAD 相互作用的分子机制,更为药物开发提供了结构依据。

3.2 VGLLs-TEAD 复合物

果蝇中 Vg 蛋白直接与 Sd 相互作用,激活果蝇翅膀特异性基因表达^[92~95]。哺乳动物中 VGLL1-4 (vestigial-like protein 1~4)可以充当转录共激活因子或辅助抑制因子。VGLL1 和 VGLL2 可激活 TEAD,促进肌细胞特异性增强因子 MEF2 和成肌细胞决定因子 MYOD1 的转录活性,而 VGLL4 则抑制 TEAD 转录活性。VGLL3 在软组织肉瘤中过表达,但在上皮性卵巢癌中发挥抑癌因子的作用^[96~106]。VGLL1~4 蛋白通过其 Tondu(TDU)结构域结合 TEAD_YBD(图 6, B~D)^[95,96,99,107]。VGLL1~3 蛋白具有一个 TDU 结构域,而 VGLL4 具有两个 TDU 结构域(TDU1 和 TDU2)。VGLL4 的串联 TDU 结构域可结合两个 TEAD 分子^[99]。VGLL1 和 VGLL4 的 TDU 以类似于 YAP 的方式与 TEAD 相互作用^[99,108]。与 YAP 不同的是,VGLLs-TEAD 复合物中缺少 YAP-TEAD 复合物结合界面 3 的相互作用。YAP 在界面 2 中含有保守的 LxxLF 序列,而 VGLL 中则是 VxxHF 序列。VGLL1_TDU 含有结合界面 1 和 2,而 VGLL4_TDU1 只有结合界面 2,但 VGLL4_TDU2 含有结合界面 1 和 2(图 6E)^[99,108]。相比 VGLL1_TDU 和 VGLL4_TDU1 的结合界面 2 中只含有一个 α 螺旋,在 VGLL4_TDU2 的结合界面 2 中存在额外的螺旋,

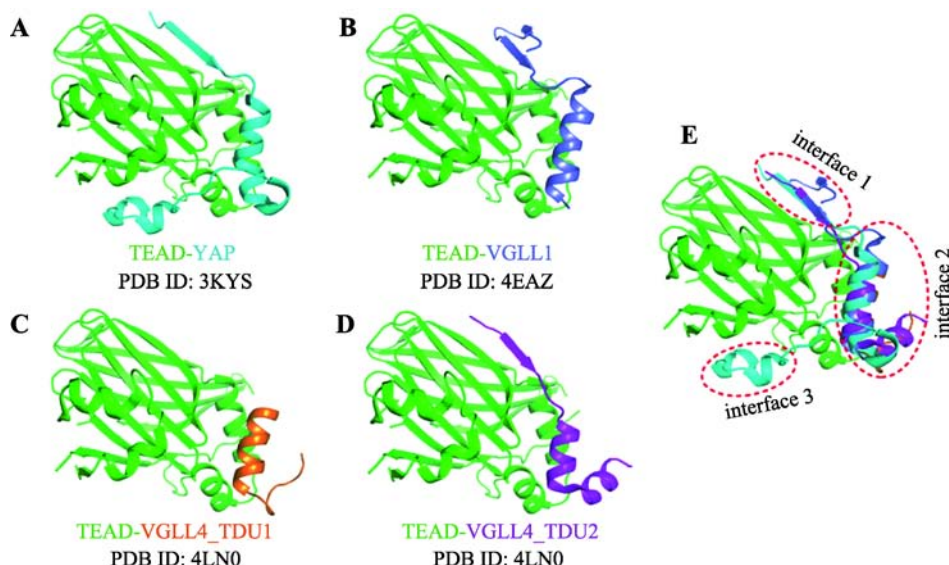


图 6 TEAD-YAP 和 TEAD-VGLLs 复合物结构

Fig. 6 The structure of TEAD-YAP and TEAD-VGLLs complexes

A~D: TEAD 与 YAP、VGLL1、VGLL4 复合物晶体结构; E: TEAD-YAP/VGLLs 复合物结构对比。

从而加强了与 TEAD 的相互作用(图 6 B~D)。总之, VGLL1 或 VGLL4 与 TEAD 相互作用中, TDU 结合界面 2 发挥重要作用。尽管 VGLL 蛋白与 TEAD 复合物的结构信息已较为完整, 但仍有许多问题需要进一步探究。例如, 抑制型 VGLL4 与激活型 VGLL1/2 的功能差异是由什么决定的? 是否 TDU 结构域的数量或非 TDU 区域决定了其功能差异?

3.3 TEAD-DNA 复合物

TEAD 作为 Hippo 信号通路下游转录激活因子, 其 N 端 TEA 结构域负责结合 DNA, 该结构域从酵母到哺乳动物其进化是相当保守的^[86,87]。TEA 能够结合 M-CAT(muscle-CAT, 5'-CATTCCT-3')等特异的 DNA 元件^[109]。在之前的 NMR 结构中, TEAD1_TEA 结构域由 3 个 α 螺旋(H1、H2 和 H3)组成, 按照螺旋-转角-螺旋(HTH)方式进行折叠(图 7A)^[110]。最近发表的 TEA_ΔL1 晶体结构显示了同样的结构类型^[111]。由于缺少 L1, 原 H1 的位置被摆到了 H2 的平行方向(图 7B), 但是 TEA_ΔL1 仍然保留了结合 DNA 的能力。最近, 转录因子 TEAD4 与 M-CAT 复合物的晶体结构也获得了解析, 研究发现 H3 决定了识别 DNA 的特异性, 更加直观准确地阐明了其结合 DNA 的分子机制^[112]。螺旋 H3 中的位点突变可以显著性下调 TEAD4 在靶基因启动子上的占有率, 阻碍 TEAD4 激活的靶基因转录, 抑制胃癌细胞生长。

4 靶向 Hippo 信号通路中的抑制剂

4.1 多巴酚丁胺(dobutamine)

Hippo 信号通路的激活能够促使 YAP 磷酸化,

从而导致 YAP 从核内到胞质的定位转移。由此在 U2OS 细胞中建立了 GFP-YAP 融合蛋白的稳定细胞系, 通过观察 GFP-YAP 融合蛋白的定位, 筛查到一系列已知化学特性的小分子对于 Hippo 信号通路的激活情况。研究发现, Aklomide、Cycloheximide 和 Dobutamine 这 3 种小分子能够明显地促进 YAP 在胞质内聚集; 进一步的实验证明, Dobutamine 能够有效抑制 YAP-TEAD 下游目的基因的转录水平; 并且, Dobutamine 引起的 YAP 磷酸化并不是直接通过 MST 或 LATS, 而是通过 β -肾上腺素受体信号通路发挥作用^[113]。

4.2 卟啉类抑制剂(porphyrin inhibitors)

最近有研究团队通过药物小分子文库筛选, 发现同属卟啉化合物家族的 3 个小分子 PPIX(protoporphyrin IX)、HP(hematoporphyrin)和 VP(verteporfin)能够特异性抑制 YAP 过表达所引起的组织过度生长^[114]。卟啉化合物是一类由 4 个吡咯类亚基的 α -碳原子通过次甲基桥(=CH-)互联而形成的大分子杂环化合物。在研究中发现, 这些小分子在 Hippo 信号通路中能够结合 YAP/Yki, 阻断了 YAP-TEAD 复合物的形成, 下调 TEAD 激活引起的基因转录水平。在缺失 NF2 的小鼠体内 VP 能够抑制肝脏的过度生长。

4.3 Super-TDU

VGLL4 能够与 TEAD 相互作用, 并且与 YAP 竞争结合 TEAD, 认为是 Hippo 信号通路的一种抑制因子。研究人员根据 VGLL4-TEAD4 和 YAP-TEAD 复合物的晶体结构设计了一种能够特异性结合 TEAD 并阻碍 YAP-TEAD 相互作用的多肽, 命名为

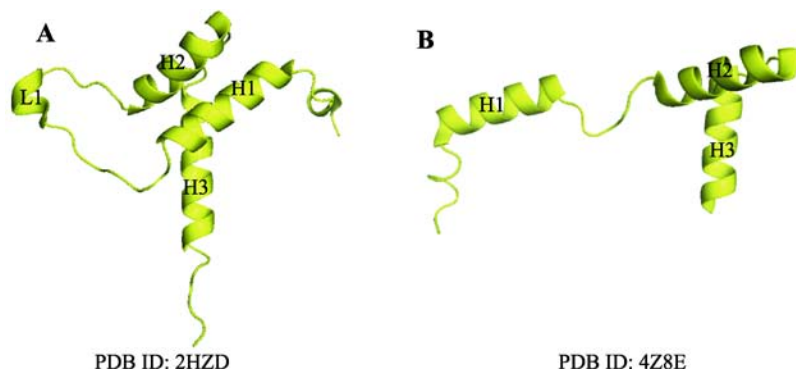


图 7 TEAD-TEA 的 NMR 结构(A)和 TEAD-TEA-ΔL1 晶体结构(B)

Fig. 7 The NMR structure of TEAD-TEA (A) and the crystal structure of TEA-ΔL1(B)

Super-TDU; Super-TDU 可以明显抑制 TEAD 下游转录基因的表达, 在小鼠成瘤实验中可以有效抑制肿瘤的生长^[99]。最新研究表明, 该 Super-TDU 可以同时靶向 Hippo 和 Wnt 信号通路而抑制肠癌^[115]。

4.4 XMU-MP-1

目前, 通过高通量的酶联免疫吸附实验筛选到了一种可逆且有效的 MST1/2 激酶活性抑制小分子—XMU-MP-1^[116]。在复合物的晶体结构中, MST2 保持了典型的活性构象, XMU-MP-1 紧密的嵌入到了 ATP 结合口袋中(图 8)。紧密的相互作用赋予了 XMU-MP-1 能够阻挡 MST1/2 的激酶活化过程, 抑制 MST1/2 的激酶活性, 进而激活下游 YAP-TEAD 复合物的转录活性并促进细胞增殖。小鼠体内药理学分析中, XMU-MP-1 可以明显促进小鼠肠与肝脏的修复与再生能力, 因此可以说 XMU-MP-1 具有成为靶向药物的巨大潜力。

4.5 GPCR-Hippo 相关的抑制剂

Hippo 信号通路的激活和抑制往往与多种信号通路相互交联, 如在 GPCR 信号通路中, 溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)、鞘氨醇 1-磷酸盐(sphingosine 1-phosphate, S1P)通过结合其相应受体, 引起 $G_{\alpha 12/13}$ -Rho GTPase 的活化和 Lats1/2 的抑制, 从而导致 YAP/TAZ 的去磷酸化和核内定位^[117]。因此, 拮抗 LPA、S1P 介导的受体信号传导能够有效抑制癌症中 YAP/TAZ 的活性。S1P 阻断抗体

Sphingomab 能够减少肺癌的转移^[118]。产生 S1P 的鞘氨醇激酶 1(sphingosine kinase 1, SPHK1)在癌症中表达过量, 并具有致癌作用^[119]。苯氧二醇(phenoxodiol)是一种异黄酮衍生物, 可以抑制 SPHK1 的活性, 已经在晚期癌症患者中进行临床试验^[120]。并且, 棕榈酰 α -溴亚甲基磷酸酯-1(BrP-LPA)可以拮抗 LPA 受体 1~4 的活性^[121]。

另外, $G_{\alpha s}$ -cAMP-PKA 信号能够激活 LATS1/2 促进 YAP/TAZ 的磷酸化。提高细胞内 cAMP 浓度可以阻止细胞生长, 诱导凋亡, 抑制各种癌症如乳腺癌和结肠癌的癌细胞迁移。其中 PKA 可以直接磷酸化 LATS1/2 或者通过抑制 RhoA 的活性来激活 LATS1/2^[122~124], 而毛喉素(forskolin)可以激活腺苷酸环化酶来提高 cAMP 水平^[124], 其他几种 forskolin 衍生物如 FSK88 和 coleusin 因子能够在人胃癌细胞中抑制增殖和诱导细胞周期停滞与细胞凋亡的作用^[126,127]。另外磷酸二酯酶抑制剂(PDE inhibitor)也能够升高 cAMP 浓度起到类似的作用, 如 rolipram, 能够在脑瘤细胞中抑制肿瘤生长^[128]。

5 展 望

Hippo 信号通路高度保守且在各类组织器官中发挥调节作用, 正受到越来越多的关注。信号转导主要涉及多种蛋白-蛋白以及蛋白-DNA 间的相互作用, 这些蛋白之间的相互作用形成一个复杂的网络来调节 Hippo 信号通路(图 9)。Hippo 信号通路的主

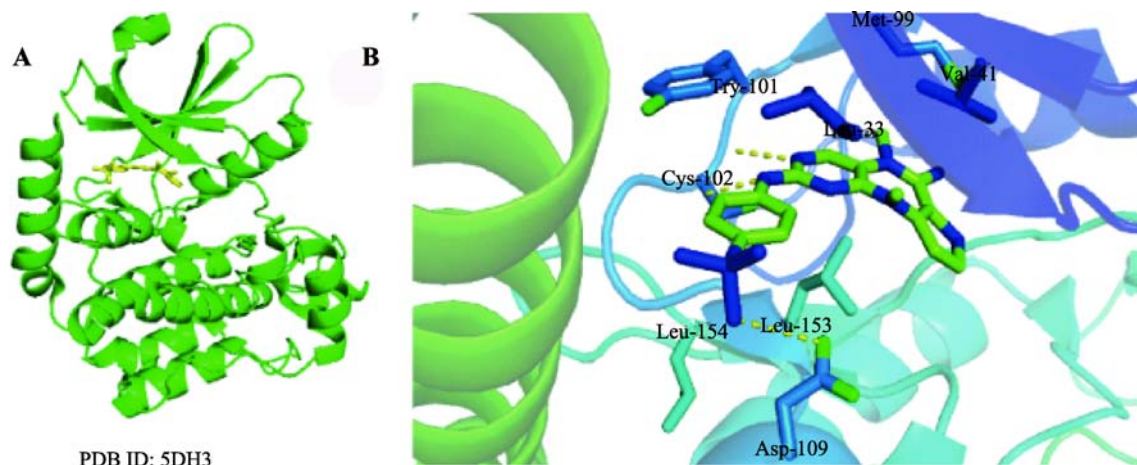


图 8 XMU-MP-1 结合 MST2 结构

Fig. 8 The structure of XMU-MP-1 binding to MST

A: MST2-XMU-MP-1 结构; B: XMU-MP-1 嵌入到 MST2 分子内部具体构象。

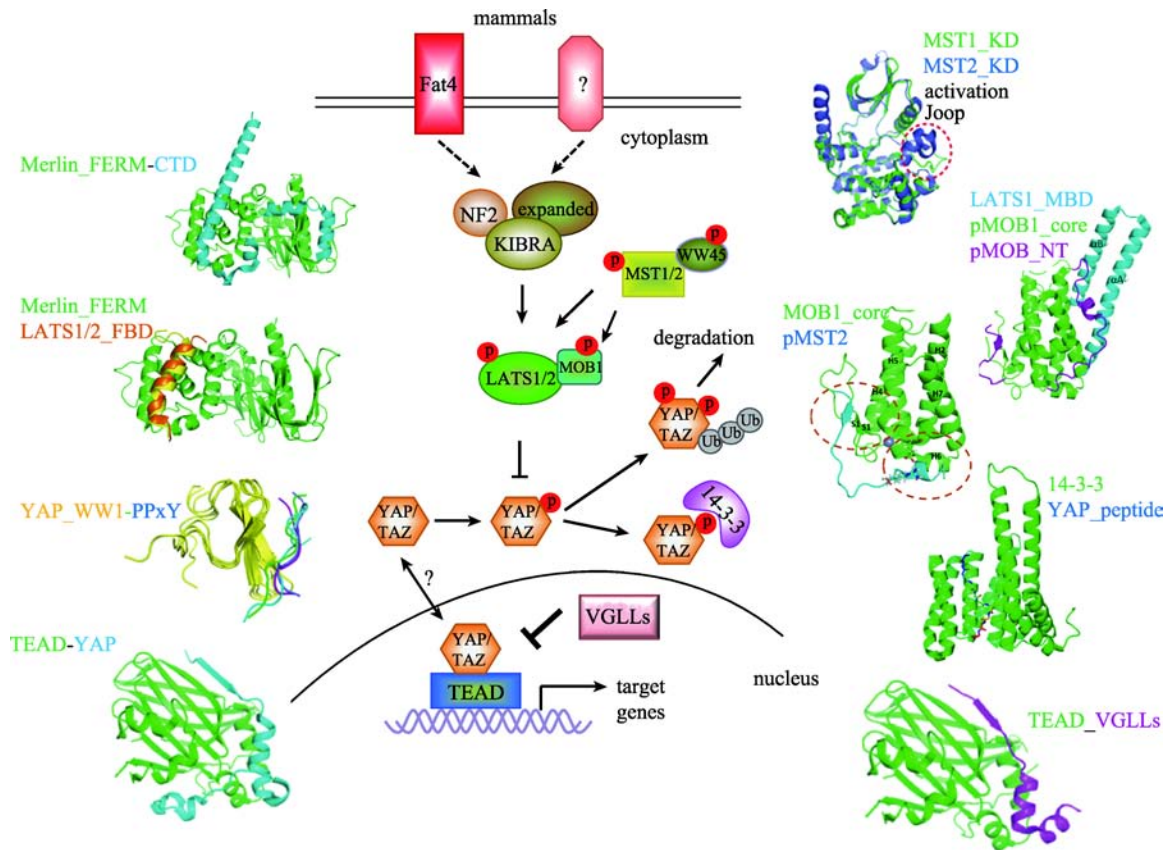


图 9 Hippo 信号通路中核心组分示意图与关键蛋白结构总览

Fig. 9 A structural overview and signal transduction of Hippo pathway core components

要组分和相关复合物的结构解析可以在分子水平上揭示精细的分子调节机制。到目前为止, Hippo 信号通路的核心蛋白及其复合物的结构生物学研究已越来越清晰, 极大揭示了 Hippo 信号传递过程中的分子调控机制。特别是 NF2-LATS、MST-MOB、MOB-LATS 和 YAP-TEAD 等关键复合物的结构学研究, 很大程度上阐释了 Hippo 通路中信号传导过程的分子机制与分子基础。目前较为缺失的是 MST-LATS 和 LATS-YAP 的复合物结构, 对它们结构的解析会更清晰地揭示 Hippo 信号通路的分子机制与结合特征。

Hippo 信号通路中多个核心级联激酶与调控因子已被鉴定为肿瘤抑制因子, 尤其是关键蛋白 YAP/TAZ 的磷酸化水平和胞内定位与多种疾病, 特别是肿瘤的发生发展, 具有非常密切的相关性。基于明确的相互作用和清晰的三维结构, 可以设计靶向小分子或多肽化合物抑制激酶或 YAP/TAZ 活性, 达到抑制肿瘤发生发展的治疗效果。

Hippo 信号通路还是一个新兴的领域, 还有很多复杂的上游调控机制和具体的信号传递机制有待深入的研究。宏观上, Hippo 信号通路的未来结构生物学研究可能会集中于以下两个方面: (1) 其他调控因子与 Hippo 信号通路组分的结构生物学研究; (2) Hippo 信号通路的上游调控机制, 特别是 NF2/Expand/Kibra 三元复合物以及一些相关膜蛋白如 Fat4 等的结构生物学研究。特别值得一提的是, Hippo 信号通路的干预和阻遏是国际上的关注热点, 相关小分子抑制剂的开发和研究对于很多疾病的临床治疗有很大的借鉴意义。

参考文献(References):

- [1] Pan DJ. Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev*, 2007, 21(8): 886–897. [DOI]
- [2] Zhao B, Lei QY, Guan KL. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(6): 638–646.

- [DOI]
- [3] 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]
- [4] Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(8): 877–883. [DOI]
- [5] Saucedo LJ, Edgar BA. Filling out the Hippo pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(8): 613–621. [DOI]
- [6] Zhang L, Yue T, Jiang J. Hippo signaling pathway and organ size control. *Fly*, 2009, 3(1): 68–73. [DOI]
- [7] Harvey KF, Pfleger CM, Hariharan IK. The *Drosophila* Mst ortholog, *hippo*, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*, 2003, 114(4): 457–467. [DOI]
- [8] Jia JH, Zhang WS, Wang B, Trinko R, Jiang J. The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev*, 2003, 17(20): 2514–2519. [DOI]
- [9] Pantalacci S, Tapon N, Léopold P. The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(10): 921–927. [DOI]
- [10] Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao CY, Halder G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(10): 914–920. [DOI]
- [11] Lai ZC, Wei XM, Shimizu T, Ramos E, Rohrbraugh M, Nikolaidis N, Ho LL, Li Y. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*, 2005, 120(5): 675–685. [DOI]
- [12] Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev*, 1995, 9(5): 534–546. [DOI]
- [13] Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* Lats gene encodes a putative protein kinase. *Development*, 1995, 121(4): 1053–1063. [DOI]
- [14] Kango-Singh M, Nolo R, Tao CY, Verstreken P, Hiesinger PR, Bellen HJ, Halder G. Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development*, 2002, 129(24): 5719–5730. [DOI]
- [15] Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DCR, Schiripo TA, Haber DA, Hariharan IK. Salvador promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*, 2002, 110(4): 467–478. [DOI]
- [16] Wu SA, Huang JB, Dong JX, Pan DJ. Hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with *salvador* and *warts*. *Cell*, 2003, 114(4): 445–456. [DOI]
- [17] Huang JB, Wu SA, Barrera J, Matthews K, Pan DJ. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell*, 2005, 122(3): 421–434. [DOI]
- [18] Wei XM, Shimizu T, Lai ZC. Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO J*, 2007, 26(7): 1772–1781. [DOI]
- [19] Chan EHY, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schäfer A, Nigg EA, Silljé HHW. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*, 2005, 24(12): 2076–2086. [DOI]
- [20] Hirabayashi S, Nakagawa K, Sumita K, Hidaka S, Kawai T, Ikeda M, Kawata A, Ohno K, Hata Y. Threonine 74 of MOB1 is a putative key phosphorylation site by MST2 to form the scaffold to activate nuclear Dbf2-related kinase 1. *Oncogene*, 2008, 27(31): 4281–4292. [DOI]
- [21] Praskova M, Xia F, Avruch J. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr Biol*, 2008, 18(5): 311–321. [DOI]
- [22] Zhang L, Ren FF, Zhang Q, Chen YB, Wang B, Jiang J. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell*, 2008, 14(3): 377–387. [DOI]
- [23] Dong JX, Feldmann G, Huang JB, Wu SA, Zhang NL, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan DJ. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell*, 2007, 130(6): 1120–1133. [DOI]
- [24] 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]
- [25] 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]
- [26] Liu CY, Zha ZY, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, Li TT, Chan SW, Lim CJ, Hong W, Zhao SM, Xiong Y, Lei QY, Guan KL. The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF ^{β -TRCP} E3 ligase. *J Biol Chem*, 2010, 285(48): 37159–37169. [DOI]
- [27] Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF ^{β -TRCP}. *Genes Dev*, 2010, 24(1): 72–85. [DOI]
- [28] Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev*, 2013, 27(4): 355–371. [DOI]
- [29] 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]
- [30] Lawrence PA, Casal J. The mechanisms of planar cell polarity, growth and the Hippo pathway: some known unknowns. *Dev Biol*, 2013, 377(1): 1–8. [DOI]
- [31] Schroeder MC, Halder G. Regulation of the Hippo pathway by cell architecture and mechanical signals. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(7): 803–811. [DOI]
- [32] Halder G, Dupont S, Piccolo S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(9): 591–600. [DOI]
- [33] Attisano L, Wrana JL. Signal integration in TGF- β , WNT, and Hippo pathways. *F1000Prime Rep*, 2013, 5: 17. [DOI]
- [34] Bernascone I, Martin-Belmonte F. Crossroads of Wnt and Hippo in epithelial tissues. *Trends Cell Biol*, 2013, 23(8): 380–389. [DOI]
- [35] 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]
- [36] Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, Pulst SM, Lenoir G, Bijlsma E, Fashold R, Dumanski J, Jong PD, Parry D, Eldridge R, Aurias A, Delattre O, Thomas G. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature*, 1993, 363(6429): 515–521. [DOI]
- [37] Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, Haase VH, Ambrose CM, Munroe D, Bove C, Haines JL, Martuza RL, MacDonald ME, Seizinger BR, Short MP, Buckler AJ, Gusella JF. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell*, 1993, 72(5): 791–800. [DOI]
- [38] Yin F, Yu JZ, Zheng YG, Chen Q, Zhang NL, Pan DJ. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell*, 2013, 154(6): 1342–1355. [DOI]
- [39] Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell*, 2000, 101(3): 259–270. [DOI]
- [40] Li QZ, Nance MR, Kulikauskas R, Nyberg K, Fehon R, Karplus PA, Bretscher A, Tesmer JJG. Self-masking in an intact ERM-merlin protein: an active role for the central α -helical domain. *J Mol Biol*, 2007, 365(5): 1446–1459. [DOI]
- [41] Gonzalez-Agosti C, Wiederhold T, Herndon ME, Gusella J, Ramesh V. Interdomain interaction of merlin isoforms and its influence on intermolecular binding to NHE-RF. *J Biol Chem*, 1999, 274(48): 34438–34442. [DOI]
- [42] Sher I, Hanemann CO, Karplus PA, Bretscher A. The tumor suppressor merlin controls growth in its open state, and phosphorylation converts it to a less-active more-closed state. *Dev Cell*, 2012, 22(4): 703–705. [DOI]
- [43] Li YJ, Zhou H, Li FZ, Chan SW, Lin ZJ, Wei ZY, Yang Z, Guo FS, Lim CJ, Xing WC, Shen YQ, Hong WJ, Long JF, Zhang MJ. Angiomotin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Res*, 2015, 25(7): 801–817. [DOI]
- [44] Creasy CL, Ambrose DM, Chernoff J. The Ste20-like protein kinase, Mst1, dimerizes and contains an inhibitory domain. *J Biol Chem*, 1996, 271(35): 21049–21053. [DOI]
- [45] Scheel H, Hofmann K. A novel inter action motif, SARAH, connects three classes of tumor suppressor. *Curr Biol*, 2003, 13(23): R899–R900. [DOI]
- [46] Valverde P. Cloning, expression, and mapping of hWW45, a novel human WW domain-containing gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(3): 990–998. [DOI]
- [47] Ni LS, Li S, Yu JZ, Min JK, Brautigam CA, Tomchick DR, Pan DJ, Luo XL. Structural basis for autoactivation of human Mst2 kinase and its regulation by RASSF5.

- Structure*, 2013, 21(10): 1757–1768. [DOI]
- [48] Record CJ, Chaikuad A, Rellos P, Das S, Pike ACW, Fedorov O, Marsden BD, Knapp S, Lee WH. Structural comparison of human mammalian Ste20-like kinases. *PLoS One*, 2010, 5(8): e11905. [DOI]
- [49] Shi ZB, Jiao S, Zhang Z, Ma M, Zhang Z, Chen CC, Wang K, Wang HZ, Wang WJ, Zhang L, Zhao Y, Zhou ZC. Structure of the MST4 in complex with MO25 provides insights into its activation mechanism. *Structure*, 2013, 21(3): 449–461. [DOI]
- [50] Lee SJ, Cobb MH, Goldsmith EJ. Crystal structure of domain-swapped STE20 OSR1 kinase domain. *Protein Sci*, 2009, 18(2): 304–313. [DOI]
- [51] Hwang E, Ryu KS, Pääkkönen K, Güntert P, Cheong HK, Lim DS, Lee JO, Jeon YH, Cheong C. Structural insight into dimeric interaction of the SARAH domains from Mst1 and RASSF family proteins in the apoptosis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(22): 9236–9241. [DOI]
- [52] Constantinescu Aruxandei D, Makbul C, Koturenkiene A, Ludemann MB, Herrmann C. Dimerization-induced folding of MST1 SARAH and the influence of the intrinsically unstructured inhibitory domain: low thermodynamic stability of monomer. *Biochemistry*, 2011, 50(51): 10990–11000. [DOI]
- [53] de Souza PM, Lindsay MA. Mammalian Sterile20-like kinase 1 and the regulation of apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(3): 485–488. [DOI]
- [54] Oh HJ, Lee KK, Song SJ, Jin MS, Song MS, Lee JH, Im CR, Lee JO, Yonehara S, Lim DS. Role of the tumor suppressor RASSF1A in Mst1-mediated apoptosis. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2562–2569. [DOI]
- [55] Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, Nedwidek M, Chen T, Zhang XF, Seed B, Avruch J. Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol*, 2002, 12(4): 253–265. [DOI]
- [56] Katagiri K, Imamura M, Kinashi T. Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nat Immunol*, 2006, 7(9): 919–928. [DOI]
- [57] Volodko N, Gordon M, Salla M, Ghazaleh HA, Baksh S. RASSF tumor suppressor gene family: biological functions and regulation. *FEBS Lett*, 2014, 588(16): 2671–2684. [DOI]
- [58] Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 114–128. [DOI]
- [59] Praskova M, Khokhlatchev A, Ortiz-Vega S, Avruch J. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J*, 2004, 381(2): 453–462. [DOI]
- [60] Makbul C, Constantinescu Aruxandei D, Hofmann E, Schwarz D, Wolf E, Herrmann C. Structural and thermodynamic characterization of Nore1-SARAH: a small, helical module important in signal transduction networks. *Biochemistry*, 2013, 52(6): 1045–1054. [DOI]
- [61] Hwang E, Cheong HK, Mushtaq AU, Kim HY, Yeo KJ, Kim E, Lee WC, Hwang KY, Cheong C, Jeon YH. Structural basis of the heterodimerization of the MST and RASSF SARAH domains in the Hippo signalling pathway. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70(7): 1944–1953. [DOI]
- [62] Liu GG, Shi ZB, Jiao S, Zhang ZZ, Wang WJ, Chen CC, Hao Q, Zhang M, Feng M, Xu L, Zhang Z, Zhou ZC, Zhang M. Structure of MST2 SARAH domain provides insights into its interaction with RAPL. *J Struct Biol*, 2014, 185(3): 366–374. [DOI]
- [63] 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]
- [64] Guo C, Tommasi S, Liu LM, Yee JK, Dammann R, Pfeifer GP. RASSF1A is part of a complex similar to the *Drosophila* Hippo/Salvador/Lats tumor-suppressor network. *Curr Biol*, 2007, 17(8): 700–705. [DOI]
- [65] Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS J*, 2006, 273(18): 4264–4276. [DOI]
- [66] Bork P, Sudol M. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(12): 531–533. [DOI]
- [67] Ohnishi S, Güntert P, Koshiba S, Tomizawa T, Akasaka R, Tochio N, Sato M, Inoue M, Harada T, Watanabe S, Tanaka A, Shirouzu M, Kigawa T, Yokoyama S. Solution structure of an atypical WW domain in a novel β -clam-like dimeric form. *FEBS Lett*, 2007, 581(3): 462–468. [DOI]
- [68] Stavridi ES, Harris KG, Huyen Y, Bothos J, Verwoerd PM, Stayrook SE, Pavletich NP, Jeffrey PD, Luca FC.

- Crystal structure of a human Mob1 protein: toward understanding Mob-regulated cell cycle pathways. *Structure*, 2003, 11(9): 1163–1170. [DOI]
- [69] Ponchon L, Dumas C, Kajava AV, Fesquet D, Padilla A. NMR solution structure of Mob1, a mitotic exit network protein and its interaction with an NDR kinase peptide. *J Mol Biol*, 2004, 337(1): 167–182. [DOI]
- [70] Mrkobrada S, Boucher L, Ceccarelli D, Tyers M, Sicheri F. Structural and functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Mob1. *J Mol Biol*, 2006, 362(3): 430–440. [DOI]
- [71] Ni LS, Zheng YG, Hara M, Pan DJ, Luo XL. Structural basis for Mob1-dependent activation of the core Mst-Lats kinase cascade in Hippo signaling. *Genes Dev*, 2015, 29(13): 1416–1431. [DOI]
- [72] Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(1): 9–22. [DOI]
- [73] Bichsel SJ, Tamaskovic R, Stegert MR, Hemmings BA. Mechanism of activation of NDR (nuclear Dbf2-related) protein kinase by the hMOB1 protein. *J Biol Chem*, 2004, 279(34): 35228–35235. [DOI]
- [74] Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA. The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(1): 50–58. [DOI]
- [75] Park HW, Guan KL. Regulation of the Hippo pathway and implications for anticancer drug development. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(10): 581–589. [DOI]
- [76] Sudol M, Harvey KF. Modularity in the Hippo signaling pathway. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(11): 627–633. [DOI]
- [77] Hergovich A. Mammalian Hippo signalling: a kinase network regulated by protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(1): 124–128. [DOI]
- [78] Hao YW, Chun A, Cheung K, Rashidi B, Yang XL. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of onco-gene YAP. *J Biol Chem*, 2008, 283(9): 5496–5509. [DOI]
- [79] Macias MJ, Hyvönen M, Baraldi E, Schultz J, Sudol M, Saraste M, Oschkinat H. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*, 1996, 382(6592): 646–649. [DOI]
- [80] Pires JR, Taha-Nejad F, Toepert F, Ast T, Hoffmüller U, Schneider-Mergener J, Kühne R, Macias MJ, Oschkinat H. Solution structures of the YAP65 WW domain and the variant L30 K in complex with the peptides GTPPPPYTVG, N-(n-octyl)-GPPPY and PLPPY and the application of peptide libraries reveal a minimal binding epitope. *J Mol Biol*, 2001, 314(5): 1147–1156. [DOI]
- [81] Aragón E, Goerner N, Zaromytidou AI, Xi QR, Escobedo A, Massagué J, Macias MJ. A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code. *Genes Dev*, 2011, 25(12): 1275–1288. [DOI]
- [82] Webb C, Upadhyay A, Giuntini F, Eggleston I, Furutani-Seiki M, Ishima R, Bagby S. Structural features and ligand binding properties of tandem WW domains from YAP and TAZ, nuclear effectors of the Hippo pathway. *Biochemistry*, 2011, 50(16): 3300–3309. [DOI]
- [83] 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]
- [84] Aragón E, Goerner N, Xi QR, Gomes T, Gao S, Massagué J, Macias MJ. Structural basis for the versatile interactions of Smad7 with regulator WW domains in TGF- β pathways. *Structure*, 2012, 20(10): 1726–1736. [DOI]
- [85] Schumacher B, Skwarczynska M, Rose R, Ottmann C. Structure of a 14-3-3 σ -YAP phosphopeptide complex at 1.15 Å resolution. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2010, 66(9): 978–984. [DOI]
- [86] Andrianopoulos A, Timberlake WE. ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell*, 1991, 3(8): 747–748. [DOI]
- [87] Bürglin TR. The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell*, 1991, 66(1): 11–12. [DOI]
- [88] Vassilev A, Kaneko KJ, Shu HJ, Zhao YM, DePamphilis ML. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev*, 2001, 15(10): 1229–1241. [DOI]
- [89] Chen LM, Chan SW, Zhang XQ, Walsh M, Lim CJ, Hong WJ, Song HW. Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the hippo pathway. *Genes Dev*, 2010, 24(3): 290–300. [DOI]
- [90] Li Z, Zhao B, Wang P, Chen F, Dong ZH, Yang HR, Guan KL, Xu YH. Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes Dev*, 2010, 24(3): 235–240. [DOI]
- [91] Tian W, Yu JZ, Tomchick DR, Pan DJ, Luo XL. Struc-

- tural and functional analysis of the YAP-binding domain of human TEAD2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(16): 7293–7298. [DOI]
- [92] Halder G, Polaczyk P, Kraus ME, Hudson A, Kim J, Laughon A, Carroll S. The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes Dev*, 1998, 12(24): 3900–3909. [DOI]
- [93] Paumard-Rigal S, Zider A, Vaudin P, Silber J. Specific interactions between *vestigial* and *scalloped* are required to promote wing tissue proliferation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol*, 1998, 208(8): 440–446. [DOI]
- [94] Simmonds AJ, Liu XF, Soanes KH, Krause HM, Irvine KD, Bell JB. Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev*, 1998, 12(24): 3815–3820. [DOI]
- [95] Guss KA, Nelson CE, Hudson A, Kraus ME, Carroll SB. Control of a genetic regulatory network by a selector gene. *Science*, 2001, 292(5519): 1164–1167. [DOI]
- [96] Chen HH, Mullett SJ, Stewart AFR. Vgl-4, a novel member of the vestigial-like family of transcription cofactors, regulates α_1 -adrenergic activation of gene expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 2004, 279(29): 30800–30806. [DOI]
- [97] Maeda T, Chapman DL, Stewart AFR. Mammalian vestigial-like 2, a cofactor of TEF-1 and MEF2 transcription factors that promotes skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48889–48898. [DOI]
- [98] Günther S, Mielcarek M, Krüger M, Braun T. VITO-1 is an essential cofactor of TEF1-dependent muscle-specific gene regulation. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(2): 791–802. [DOI]
- [99] 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 HB, 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]
- [100] Guo T, Lu Y, Li PX, Yin MX, Lv DK, Zhang WJ, Wang HZ, Zhou ZC, Ji HB, Zhao Y, Zhang L. A novel partner of Scalloped regulates Hippo signaling via antagonizing Scalloped-Yorkie activity. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1201–1214. [DOI]
- [101] Zhang WJ, Gao YJ, Li PX, Shi ZB, Guo T, Li F, Han XK, Feng Y, Zheng C, Wang ZY, Li FM, Chen HQ, 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]
- [102] Koontz LM, Liu-Chittenden Y, Yin F, Zheng YG, Yu JZ, Huang B, Chen Q, Wu SA, Pan DJ. The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression. *Dev Cell*, 2013, 25(4): 388–401. [DOI]
- [103] Pobbati AV, Hong WJ. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(5): 390–398. [DOI]
- [104] Mielcarek M, Piotrowska I, Schneider A, Günther S, Braun T. VITO-2, a new SID domain protein, is expressed in the myogenic lineage during early mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns*, 2009, 9(3): 129–137. [DOI]
- [105] Hélias-Rodzewicz Z, Pérot G, Chibon F, Ferreira C, Lagarde P, Terrier P, Coindre JM, Aurias A. *YAP1* and *VGLL3*, encoding two cofactors of TEAD transcription factors, are amplified and overexpressed in a subset of soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49(12): 1161–1171. [DOI]
- [106] Gambaro K, Quinn MCJ, Wojnarowicz PM, Arcand SL, de Ladurantaye M, Barrès V, Ripeau JS, Killary AM, Davis EC, Lavoie J, Provencher DM, Mes-Masson AM, Chevrette M, Tonin PN. *VGLL3* expression is associated with a tumor suppressor phenotype in epithelial ovarian cancer. *Mol Oncol*, 2013, 7(3): 513–530. [DOI]
- [107] Vaudin P, Delanoue R, Davidson I, Silber J, Zider A. TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (vg) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for Vg function in wing formation. *Development*, 1999, 126(21): 4807–4816. [DOI]
- [108] Pobbati AV, Chan SW, Lee I, Song HW, Hong WJ. Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD complexes. *Structure*, 2012, 20(7): 1135–1140. [DOI]
- [109] Mar JH, Ordahl CP. M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(8): 4271–4283. [DOI]
- [110] Anbanandam A, Albarado DC, Nguyen CT, Halder G, Gao XL, Veeraraghavan S. Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17225–17230. [DOI]
- [111] Lee DS, Vornrhein C, Albarado D, Raman C, Veerarag-

- havan S. A potential structural switch for regulating DNA-binding by TEAD transcription factors. *J Mol Biol*, 2016, 428(12): 2557–2568. [DOI]
- [112] Shi Z, He F, Chen M, Hua L, Wang W, Jiao S, Zhou ZC. DNA-binding mechanism of the Hippo pathway transcription factor TEAD4. *Oncogene*, 2017, doi: 10.1038/onc.2017.24. [DOI]
- [113] Bao YJ, Nakagawa K, Yang ZY, Ikeda M, Withanage K, Ishigami-Yuasa M, Okuno Y, Hata S, Nishina H, Hata Y. A cell-based assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. *J Biochem*, 2011, 150(2): 199–208. [DOI]
- [114] 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]
- [115] Jiao S, Li CC, Hao Q, Miao HF, Zhang L, Li L, Zhou ZC. VGLL4 targets a TCF4-TEAD4 complex to coregulate Wnt and Hippo signalling in colorectal cancer. *Nat Commun*, 2017, 8: 14058. [DOI]
- [116] Fan FQ, He ZX, Kong LL, Chen QH, Yuan Q, Zhang SH, Ye JJ, Liu H, Sun XF, Geng J, Yuan LZ, Hong LX, Xiao C, Zhang WJ, Sun XH, Li YZ, Wang P, Huang LH, Wu XR, Ji ZL, Wu Q, Xia NS, Gray NS, Chen LF, Yun CH, Deng XM, Zhou DW. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration. *Sci Transl Med*, 2016, 8(352): 352ra108. [DOI]
- [117] Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao JG, Yuan HX, 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]
- [118] Ponnusamy S, Selvam SP, Mehrotra S, Kawamori T, Snider AJ, Obeid LM, Shao Y, Sabbadini R, Ogretmen B. Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(8): 761–775. [DOI]
- [119] Cuvillier O, Ader I, Bouquerel P, Brizuela L, Malavaud B, Mazerolles C, Rischmann P. Activation of sphingosine kinase-1 in cancer: implications for therapeutic targeting. *Curr Mol Pharmacol*, 2010, 3(2): 53–65. [DOI]
- [120] Kelly MG, Mor G, Husband A, O'Malley DM, Baker L, Azodi M, Schwartz PE, Rutherford TJ. Phase II evaluation of phenoxodiol in combination with cisplatin or paclitaxel in women with platinum/taxane-refractory/resistant epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancers. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(4): 633–639. [DOI]
- [121] Jiang GW, Xu Y, Fujiwara Y, Tsukahara T, Tsukahara R, Gajewiak J, Tigyi G, Prestwich GD. α -Substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA. *ChemMedChem*, 2007, 2(5): 679–690. [DOI]
- [122] 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]
- [123] Savai R, Pullamsetti SS, Banat GA, Weissmann N, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT. Targeting cancer with phosphodiesterase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19(1): 117–131. [DOI]
- [124] Kim M, Kim M, Lee S, Kuninaka S, Saya H, Lee H, Lee S, Lim DS. cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. *EMBO J*, 2013, 32(11): 1543–1555. [DOI]
- [125] D'Orazio JA, Nobuhisa T, Cui RT, Arya M, Spry M, Wakamatsu K, Igras V, Kunisada T, Granter SR, Nishimura EK, Ito S, Fisher DE. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of *Mc1r* in UV-induced tanning. *Nature*, 2006, 443(7109): 340–344. [DOI]
- [126] Li ZH, Wang JZ. A forskolin derivative, FSK88, induces apoptosis in human gastric cancer BGC823 cells through caspase activation involving regulation of Bcl-2 family gene expression, dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome *c* release. *Cell Biol Int*, 2006, 30(11): 940–946. [DOI]
- [127] Sun B, Geng S, Huang XJ, Zhu J, Liu S, Zhang YJ, Ye J, Li YJ, Wang JZ. Coleusin factor exerts cytotoxic activity by inducing G₀/G₁ cell cycle arrest and apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cells. *Cancer Lett*, 2011, 301(1): 95–105. [DOI]
- [128] Goldhoff P, Warrington NM, Limbrick DD Jr, Hope A, Woerner BM, Jackson E, Perry A, Piwnica-Worms D, Rubin JB. Targeted inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase-4 promotes brain tumor regression. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(23): 7717–7725. [DOI]