

YAP 蛋白 T425A 位点突变对 YAP 功能的影响

杨阳露¹, 邹壮志¹, 袁方², 毛蓓蓓³

1. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049;
2. 中国人民解放军总医院肿瘤科, 北京 100853;
3. 中国科学院生物物理研究所, 脑与认知国家重点实验室, 北京 100101

摘要: Hippo 信号通路在个体发育与组织生长中发挥了关键的作用, YAP(Yes-associated protein)是该通路中主要的下游效应因子。已有的研究表明 YAP 活性与肿瘤的发生发展密切相关, 然而关于 YAP 活性的调控机制目前还不是很清楚。本研究将 YAP 蛋白(NP_001123617)第 425 位苏氨酸(T)突变为丙氨酸(A), 发现 YAP T425A 突变能减弱 YAP 的转录活性, 并通过免疫荧光实验发现该位点的突变还能阻滞 YAP 进入细胞核。该位点对 YAP 活性的调控并不依赖于 YAP 在 S127 位点受到的磷酸化调控。同时本研究在细胞水平上检测到 T425A 位点突变能部分降低 YAP 对细胞迁移的促进作用。本研究主要揭示了 YAP T425 位点对 YAP 进出细胞核及其转录活性调控的重要作用, 丰富了 Hippo 通路的调节机理和 YAP 在肿瘤发生发展中的作用研究。

关键词: YAP; YAP T425A; YAP 转录活性; YAP 核定位; 细胞迁移

The roles of YAP T425A mutation in the regulation of YAP activity

Yanglu Yang¹, Zhuangzhi Zou¹, FangYuan², Beibei Mao³

1. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
2. Department of Oncology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;
3. State key Laboratory of Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: The Hippo signaling pathway plays a critical role in body development and tissue growth. As the core effector of the Hippo signaling pathway, Yes-associated protein (YAP) has been reported to be involved in various kinds of human cancers. However, the mechanism for the regulation of YAP activity has not been completely understood. In this study, we constructed a YAP Thr425Ala mutant and found that this mutation decreased YAP transcriptional activity. Further, T425A retained YAP in the cytoplasm without affecting the phosphorylation of YAP S127. Moreover, we observed that the T425A mutation attenuated the ability of YAP in driving MCF10A cell migration. Our research indicates that T425 of YAP is important for the regulation of YAP localization and activity.

Keywords: YAP; YAP T425A; YAP transcriptional activity; YAP nuclear localization; cell migration

收稿日期: 2017-02-28; 修回日期: 2017-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81402319)和北京市科技新星计划项目(编号: Z161100004916133)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81402319) and Beijing Novel Project (No. Z161100004916133)]

作者简介: 杨阳露, 硕士研究生, 专业方向: 分子生物学。E-mail: luyao0@163.com

通讯作者: 毛蓓蓓, 博士, 副研究员, 研究方向: 肿瘤分子生物学。E-mail: m8244@163.com

袁方, 博士, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤学。E-mail: yuanfsc@gmail.com

DOI: 10.16288/j.ycz.17-068

网络出版时间: 2017/6/28 15:11:24

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170628.1511.002.html>

在许多物种中, Hippo 信号通路通过参与对细胞增殖和细胞凋亡的调控在组织器官的生长与发育中起到关键作用。最早在果蝇(*Drosophila*)中发现了 Hippo 信号通路, 研究发现 Hippo 通路元件的基因突变会导致组织的生长异常^[1-3]。从果蝇到哺乳动物, Hippo 信号通路对组织生长的调控作用具有高度保守性^[4]。在哺乳动物中, Hippo 信号通路核心的组成部分包括激酶级联蛋白 MST1/2(果蝇中的 Hippo)和 LATS1/2(果蝇中的 Warts), 而 YAP(果蝇中的 Yorkie) 和其同源蛋白 TAZ 是该通路的主要下游效应因子^[5,6]。接受上游信号刺激后, MST1/2 被激活并磷酸化 LATS1/2, 磷酸化的 LATS1/2 进而磷酸化 YAP(Yes-associated protein), 并抑制 YAP 的活性^[7]。许多的研究报道已发现 Hippo 信号通路中的基因突变或失活和肿瘤的发生发展密切联系^[8]。已有许多研究揭示了 YAP 在肿瘤发生发展中的促进作用, 此外, 在许多人类肿瘤中都观察到了 YAP 蛋白的表达水平升高和在细胞核中聚积的现象^[9-11]。因此针对 YAP 作用机制的研究也为肿瘤的治疗提供了一种新的可能。

目前关于 YAP 功能的研究表明, YAP 主要是在细胞核中通过与转录因子结合发挥转录调控的作用^[2]。活化的 LATS1/2 能磷酸化 YAP 蛋白的 127 位丝氨酸, YAP 在 S127 位点(对应小鼠的 S112)的磷酸化产生了一个可使 YAP 与 14-3-3 蛋白分子结合的位点, 二者的相互作用使得 YAP 被滞留在胞浆中^[12]。若 Hippo 信号通路失活, YAP 得以进入细胞核中并发挥转录激活的功能。作为一个辅助转录因子, YAP 蛋白没有直接与 DNA 结合的功能域, 它必须通过与其他转录因子(主要是 TEADs 家族蛋白)相互作用来调控下游靶基因的转录表达, 从而促进细胞增殖或抑制凋亡^[2,13]。根据文献报道, S127 位点的磷酸化状态是调控 YAP 进出细胞核的主要原因, 然而已有研究发现 YAP S127A 突变的转基因小鼠(*Mus musculus*)在其成长发育中并无明显异常, 这说明 YAP 同 14-3-3 蛋白分子的结合与否并非是调控 YAP 功能活性的唯一因素^[14], 因此关于 YAP 功能所受调控的分子机制的研究尚有许多空白待填。

本研究通过两种磷酸化位点的预测方式(Netphos3.1 和 GPS.3)发现 YAP(NP_001123617)第 425 位

点的苏氨酸(T)是一个潜在的磷酸化位点, 该位点在斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠和人(*Homo sapiens*)等多种种属中高度保守, 并且在 YAP 的同源蛋白 TAZ 中也发现了这个保守位点, 据此推测该位点在 YAP 活性调控中可能具有重要的作用。因此, 本研究首先构建了 YAP T425A 的突变体, 发现该突变体显著影响了 YAP 的转录活性, 并初步探究了该突变体减弱 YAP 转录活性的分子机制。综合实验结果, 本研究发现了一个参与调控 YAP 活性的新的功能位点 T425, 该位点对 YAP 在肿瘤迁移中的功能起到了重要作用。此外, T425 位点对 YAP 进出细胞核的调控很可能是独立于已知的 YAP S127 位点的磷酸化调控。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK293T 细胞和 MCF7 细胞系购自 ATCC 细胞库; MCF10A 细胞系由浙江大学赵斌教授馈赠。pEGFP-C3-YAP、pQCXIH、pQCXIH-Flag-YAP 均为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、细胞转染与稳定细胞系的构建

HEK293T 细胞、MCF7 细胞和 MCF10A 细胞均在 37℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 其中 HEK293T 细胞和 MCF7 细胞所用培养基为添加了 10% 胎牛血清(Hyclone, USA)和 50 μg/mL 青霉素/链霉素溶液(碧云天生物技术有限公司)的 DMEM 培养基(Invitrogen-Life Technologies, USA)。MCF10A 细胞所用培养基为添加了 5% 马血清(Invitrogen-Life Technologies, USA)、20 ng/mL 表皮生长因子(Pepro Tech, USA)、0.5 μg/mL 氢化可的松(Sigma Aldrich, USA)、10 μg/mL 胰岛素(Sigma Aldrich, USA)、100 ng/mL 霍乱毒素(Sigma Aldrich, USA)和 50 μg/mL 青霉素/链霉素溶液的 DMEM/F12 培养基(Invitrogen Life Technologies, USA)。细胞正常传代培养。培养的细胞传代 24 h 后可进行转染, 转染用的转染试剂为 Vigofect(威格拉斯生物技术有限公司), 使用比例和方法遵循说明书。

在本实验中用到的稳定细胞系有过表达野生型或者 T425A 突变型的 Flag-YAP 的 MCF7 细胞系和

MCF10A 细胞系。其中病毒载体为逆转录病毒载体 pQCXIH。将野生型(WT)或 T425A 突变型 YAP cDNA 构建到该逆转录病毒载体上,在 HEK293T 细胞中同包装载体 PV 和 MD 按 2:1:1 的比例进行细胞转染,24 h 后收集上清得到病毒溶液,经 0.45 μm 的滤膜过滤,储存在 -80°C 。以病毒溶液感染 MCF7 细胞或 MCF10A 细胞,加入终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的聚凝胺,6 h 后换成正常培养基继续培养,40 h 后加入潮霉素(Sigma Aldrich, USA)进行筛选,获得稳定细胞系。

1.2.2 点突变质粒的构建

以 pQCXIH-Flag-YAP 和 pEGFP-C3-YAP 为模板,引物为 T425A mut(R: 5'-GTGGATGAGATGGATGTCAGGTGATACTATC-3'; F: 5'-GATAGTATCACCTGCATCCATCTCATCCAC-3'),根据高保真 DNA 聚合酶(KAPA Biosystems, USA)说明书配置 PCR 体系并设置 PCR 条件,PCR 产物与 1 μL *Dpn* (New England Biolabs, USA)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 3 h 后继续进行分子克隆。

1.2.3 Western blotting 与免疫共沉淀(Co-IP)

用 1 \times 上样缓冲液(62.5 mmol/L Tris-HCl pH6.8、2% SDS、10% 甘氨酸、50 mmol/L 二硫苏糖醇、0.01% 苯溴苄基)裂解细胞,根据蛋白分子大小制备相应浓度的 SDS-PAGE 蛋白胶,上样进行蛋白电泳并转膜。

HEK293T 细胞中转染野生型或者 T425A 突变型 YAP 过表达的质粒,空载体为对照,24 h 后收集细胞,经 IP 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH7.5、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTA、5 mmol/L 焦磷酸钠、25 mmol/L NaF、1% Triton X-100、1 mol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)、蛋白酶抑制剂 cocktail (Biotool))裂解细胞,低温离心机 12 000 r/min 离心 15 min,取上清,与 1 μg 的抗 GFP 标签抗体和 10 μL 的蛋白 G 琼脂糖凝珠共同置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下旋转孵育 3 h。低温离心机 3000 r/min 离心 3 min,弃上清,以 IP 洗液(50 mmol/L Tris-HCl pH7.5、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTA、5 mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、25 mmol/L NaF、0.05% Triton X-100、1 mol/L PMSF、蛋白酶抑制剂 cocktail)洗琼脂糖凝珠,4 旋转 5 min,低温离心 3000 r/min 离心 3 min,重复 5 次。最后彻底吸净液体,并以加样缓冲液洗脱琼脂

糖凝珠上的蛋白,进行 Western blotting。Western blotting 所用的抗 Flag 标签抗体购自 Sigma Aldrich 公司,抗 GFP 标签抗体购自 Invitrogen-Life Technologies 公司,pYAP-S127 抗体购自 Cell Signaling Technologies 公司(USA),抗 pan 14-3-3(H-3)抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司(USA),抗 GAPDH 抗体购自康为世纪生物科技有限公司。

1.2.4 RNA 提取与实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

利用 TRIzol 试剂(Invitrogen-Life Technologies, USA)分离提取 MCF7 细胞中的 RNA。提取的 RNA 用反转录试剂盒(全式金生物技术有限公司)配制反转录体系,根据试剂盒说明书设置反应条件,得到 cDNA 产物,并用于 qRT-PCR 扩增。qRT-PCR 扩增体系包括:2 \times UltraSYBR Mixture(康为世纪生物科技有限公司)10 μL ,上、下游引物(10 nmol/L)各 0.5 μL ,cDNA 产物 1 μL ,DEPC(焦炭酸二乙酯)水 8 μL 。qRT-PCR 扩增条件 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,40 个循环。qRT-PCR 扩增引物见表 1。

1.2.5 双荧光素酶报告基因检测实验

荧光素酶活性的检测依照其产品说明书(Pro-mega, USA)提供的方法进行。在 24 孔细胞培养皿中培养 HEK293T 细胞,转染 YAP WT 或 YAP T425A 突变体,同时共转 YAP 的下游报告基因 3 \times sd 质粒^[15]和内参 pCMV-Renilla 质粒。转染 24 h 后,收集细胞并检测荧光素酶(萤火虫荧光素酶)的活性。测得的荧

表 1 qRT-PCR 扩增引物

Table 1 The primers of qRT-PCR

扩增基因	引物序列(5' 3')
ACTIN	F: CATCACCATCTTCCAGGAG
	R: AGGCTGTTGTCATACTTCTC
CTGF	F: CAGCATGGACGTTTCGTCTG
	R: AACCACGGTTTGGTCCTTGG
CDK6	F: TCTTCATTACACCGAGTAGTGC
	R: TGAGGTTAGAGCCATCTGGAAA
CYR61	F: CTCGCCTTAGTCGTCACCC
	R: CGCCGAAGTTGCATTCCAG
YAP	F: TAGCCCTGCGTAGCCAGTTA
	R: TCATGCTTAGTCCACTGTCTGT

光素酶值以各自的 Renila 值为参照校准。

1.2.6 免疫荧光染色

MCF7 细胞经 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 清洗 2 遍。0.1% Triton X-100 室温孵育 30 min 使细胞通透, 3% BSA 封闭 1 h。以 DAPI 染核 10 min, PBS 清洗 2 遍后, 经抗荧光淬灭封片剂(碧云天生物技术有限公司)封片, 共聚焦荧光显微镜下观察拍照。

1.2.7 Transwell 细胞迁移实验

MCF10A 细胞铺种在 transwell (Merck & Millipore, Billerica, MA, USA)迁移小室的上层, transwell 小室的上层和下层都添加培养基, 细胞培养 24 h 后, 将培养基弃掉, PBS 清洗一遍, transwell 小室用 0.2% 结晶紫染色 10 min, PBS 清洗, 显微镜下观察拍照。小室膜上的细胞以二甲基亚砷充分溶解, 测量溶解物在 570 nm 处的光密度值(OD)并进行数据分析, 该 OD 值代表了细胞迁移的水平。

1.2.8 统计学分析

所有统计数值都以均值 \pm 标准误(means \pm SD)表示, 两组样本之间的差异显著性进行 *t*-test 检验(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 YAP T425A 突变抑制 YAP 的转录活性

通过比较 YAP 的 T425 位点在不同种属间的保守性, 发现在不同种属中, T425 位点在 YAP 与其同源蛋白 TAZ 中是高度保守的(图 1A)。因此本研究在乳腺癌细胞系 MCF7 中构建了过表达 Flag-YAP 野生型(WT)和 T425A 突变的稳定细胞系, 并检测 YAP T425 位点的突变是否影响 YAP 的转录激活能力。在 MCF7 细胞上构建过表达 Flag-YAP WT 和 T425A 的稳定细胞系, Western blotting 结果检测到野生型和 T425A 突变的 Flag-YAP 都有显著的过表达效率(图 1B)。以 qRT-PCR 检测 YAP 下游 3 个经典的靶基因 *CTGF*、*CDK6* 和 *CYR61* 的 mRNA 水平(图 1C)。结果显示, 同野生型 YAP 相比, T425A 突变的 YAP 蛋白对 *CTGF*、*CDK6* 和 *CYR61* 的 mRNA 水平的诱导均有显著的减弱。为了进一步验证 T425A 突变影

响了 YAP 的转录活性, 本研究也进行了双荧光素酶报告基因检测实验。由于在 MCF7 细胞中瞬时转染效率过低, 本研究在 HEK293T 细胞中转染野生型和 T425A 突变的 GFP-YAP, 同时过表达 3 \times sd 报告基因质粒和 pCMV-Renila 质粒, 通过 Western blotting 检测到 GFP-YAP WT 和 T425A 的成功过表达(图 1D), 同时检测报告基因荧光素酶的强度, 结果显示 YAP WT 能显著上调 3 \times sd 的转录水平, 而过表达 YAP T425A 突变体后, YAP 对 3 \times sd 的转录激活能力明显比野生型弱(图 1E)。上述结果均说明 YAP T425 位点突变能够抑制 YAP 的转录激活能力。

2.2 乳腺癌细胞 MCF7 中 YAP T425A 突变阻滞 YAP 蛋白进入细胞核

作为转录辅助因子, YAP 转录调控功能受到其核定位的影响, 因此本研究检测了 T425 位点突变是否影响 YAP 进出细胞核状态。在 MCF7 细胞中, 过表达 GFP-YAP 的野生型和 T425A 突变质粒, 观察野生型和突变体的 GFP-YAP 蛋白在 MCF7 细胞中的定位情况(图 2)。结果发现, 野生型的 GFP-YAP 在细胞浆和细胞核内均匀分布, T425A 突变的 YAP 蛋白则主要定位在细胞核外(图 2A)。对 YAP 亚细胞定位的统计分析发现, 大约 80% 的突变型 YAP 被阻滞在胞浆中(图 2B)。这说明 T425 位点是调控 YAP 蛋白进出细胞核的重要位点。

2.3 YAP T425A 突变不影响 YAP S127 位点的磷酸化

在 Hippo 信号通路中, LATS1/2 通过对 YAP 蛋白的磷酸化来调控 YAP 的活性, S127 位点的磷酸化介导了 YAP 同 14-3-3 蛋白的结合, 因此该位点的磷酸化状态对 YAP 进出细胞核的调控起到十分关键的作用。由于 YAP T425 位点突变阻滞了 YAP 蛋白进入细胞核, 本文进一步探究了该突变是否促进了 YAP S127 位点的磷酸化水平从而使 YAP 蛋白更多地滞留在胞浆中。在 HEK293T 细胞中分别转染野生型或 T425A 突变的 GFP-YAP 表达质粒。通过抗 GFP 标签抗体富集 GFP-YAP, 经免疫印迹检测 YAP S127 位点的磷酸化水平。结果表明, 与野生型相比, T425A 突变的 YAP 蛋白上 S127 位点的磷酸化程度没有显著变化(图 3)。与此一致的是, YAP 与 14-3-3 蛋白的相互作用也无显著增加。免疫共沉淀实验结

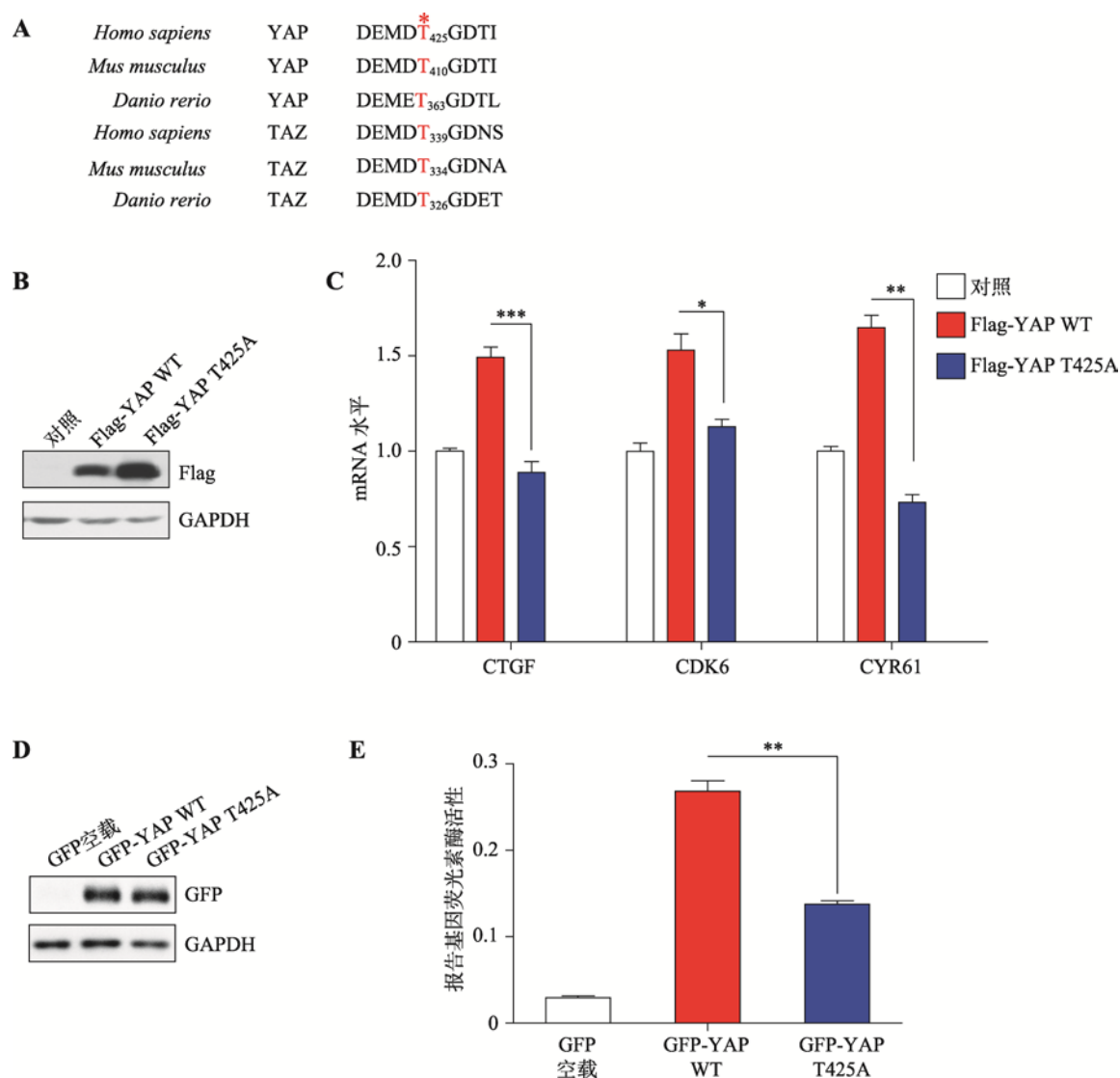


图 1 YAP T425A 突变抑制 YAP 的转录活性

Fig. 1 The YAP T425A mutant inhibits the transcriptional activity of YAP

A : YAP 及同源蛋白 TAZ 在 425 位点(对应人源 YAP)的蛋白序列对比 ; B : Western blotting 检测 Flag-YAP 过表达的效率 ; C : qRT-PCR 检测稳定过表达 Flag-YAP WT 和 Flag-YAP T425A 的 MCF7 细胞中 *CTGF*、*CDK6* 和 *CYR61* 的 mRNA 水平 ; D : Western blotting 检测 GFP-YAP WT 和 T425A 的表达水平 ; E : 双荧光素酶报告基因法检测野生型 YAP 和 T425A 突变的 YAP 的转录活性。数据结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, t -test 检验数据差异的显著性, 其中 $*P < 0.05$ 表示有统计学差异, $**P < 0.01$ 表示有显著的统计学差异, $***P < 0.001$ 表示有极其显著的统计学差异。

果表明, YAP T425 位点的突变可能是通过其他方式而不是参与 Hippo 信号通路中 LATS1/2 对 YAP 的磷酸化调控来阻滞 YAP 进入细胞核。

2.4 MCF10A 细胞中 T425A 突变抑制了 YAP 促进细胞迁移的能力

侵袭和转移是恶性肿瘤重要的生物学特性, 已有研究表明 YAP 在多种肿瘤发展中能够促进细胞转

移^[16,17], 且已有文献报道 YAP 能促进人乳腺上皮细胞系 MCF10A 的转移^[18]。因此, 本文探究在 MCF10A 细胞中, YAP T425 位点的突变是否影响其对细胞迁移的促进作用。首先通过逆转录病毒感染的方式获得稳定过表达 Flag-YAP 野生型或 Flag-YAP T425A 突变体的 MCF10A 细胞系, 通过 Western blotting(图 4A)和实时荧光定量 PCR 的方法(图 4B)都检测到野生型和 T425A 突变的 Flag-YAP 成功的过表达。

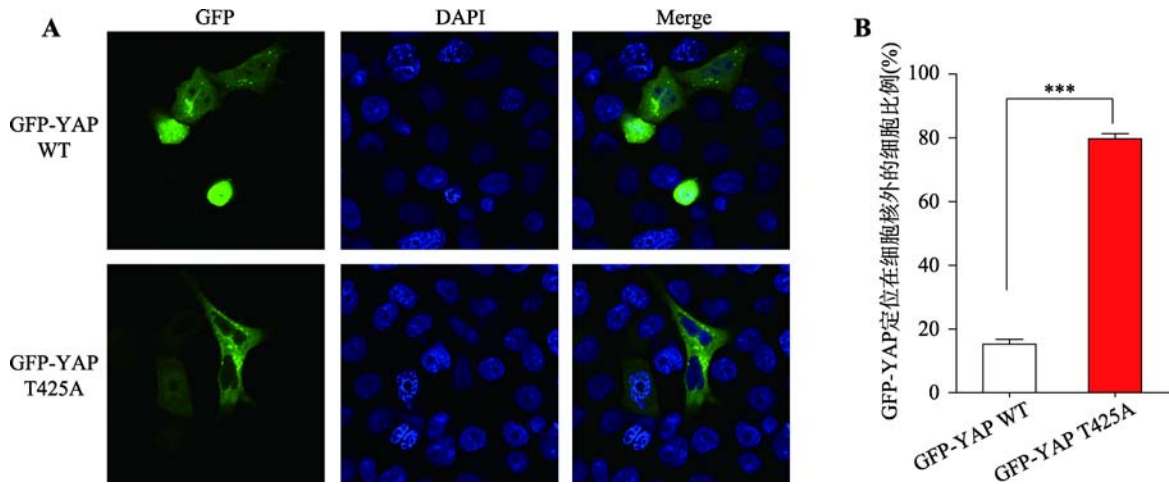


图 2 乳腺癌细胞 MCF7 中 YAP T425A 突变阻滞 YAP 蛋白进入细胞核

Fig. 2 The YAP T425A mutant inhibits YAP nuclear translocation in MCF7 breast cancer cells

A: 通过免疫荧光染色在共聚焦荧光显微镜下观察 MCF7 细胞中 GFP-YAP 野生型和 T425A 突变体在细胞中的定位情况; B: 统计分析 MCF7 细胞中 GFP-YAP WT 和 GFP-YAP T425A 过表达蛋白定位在细胞核外的比例。数据结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, t -test 检验数据差异的显著性, *** $P < 0.001$ 表示有极其显著的统计学差异。

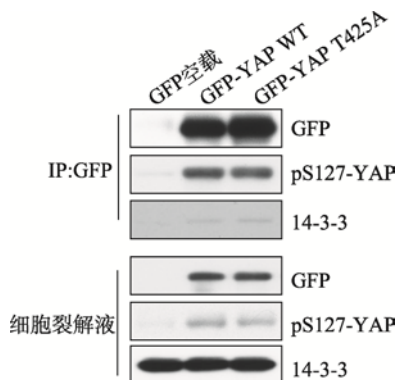


图 3 YAP T425A 突变不影响 YAP S127 位点的磷酸化
Fig. 3 The YAP T425A mutant is independent of YAP S127 phosphorylation

在 HEK293T 细胞中分别转染 GFP-YAP WT 和 GFP-YAP T425A 质粒, 以空载体为对照组, 转染 24 h 后, 收集并裂解细胞, 以抗 GFP 标签抗体富集裂解液中的 GFP-YAP 蛋白, Western blotting 检测免疫共沉淀复合物中的 14-3-3 蛋白水平和 YAP S127 位点的磷酸化水平。

Transwell 小室细胞迁移实验表明, 野生型 YAP 能明显促进 MCF10A 细胞的迁移水平, 而 YAP T425A 突变体的过表达对 MCF10A 细胞迁移的诱导能力有显著减弱(图 4: C, D)。这一结果提示 YAP T425 突变能抑制 YAP 诱导肿瘤细胞迁移的能力。

3 讨论

YAP 蛋白在胞浆和细胞核中都有分布, 由于该

蛋白主要参与转录调控, 因此 YAP 的细胞定位与它的功能密切相关。Hippo 信号通路在对 YAP 的功能调控中起到关键作用, 但越来越多的研究表明 Hippo 信号通路并非是调控 YAP 活性的唯一上游通路, YAP 进出细胞核所受的分子调控机制仍有待更多的研究发现。Hippo 信号通路中上游激酶 LATS1/2 主要磷酸化 YAP 的 S127 位点, 该位点的磷酸化使得 YAP 与 14-3-3 蛋白结合并被滞留在细胞核外^[19]。除此之外, YAP 还受到其他的磷酸化调控, 相应的磷酸化位点也陆续被发现。例如, 腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK (Adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase) 能直接磷酸化 YAP 的 S61/S94/T119 位点并使 YAP 定位在核内^[20,21]; 高渗透压能够激活 NLK (Nemo-like kinase), 活化的 NLK 进而磷酸化 YAP 的 S128 位点, 减弱 YAP 与 14-3-3 蛋白的结合强度并促进 YAP 在核内的聚积, 使得 YAP 的转录活性增强^[22]。在细胞核中 YAP 主要与 TEADs 家族转录因子相互作用, 其与 TEAD 结合区域内的 S94 位点突变将导致 YAP 转录活性的丧失^[13]。除了磷酸化调控外, 已有研究表明 YAP 的核定位也存在其他的调控机制, 如血管抑素结合蛋白 AMOT (Angiomotin) 能通过与 YAP 的直接作用使 YAP 被隔离在核外^[23]。综上所述, YAP 蛋白上的诸多氨基酸位点对于 YAP 的功能调控十分重要。本研究发现了参与调控

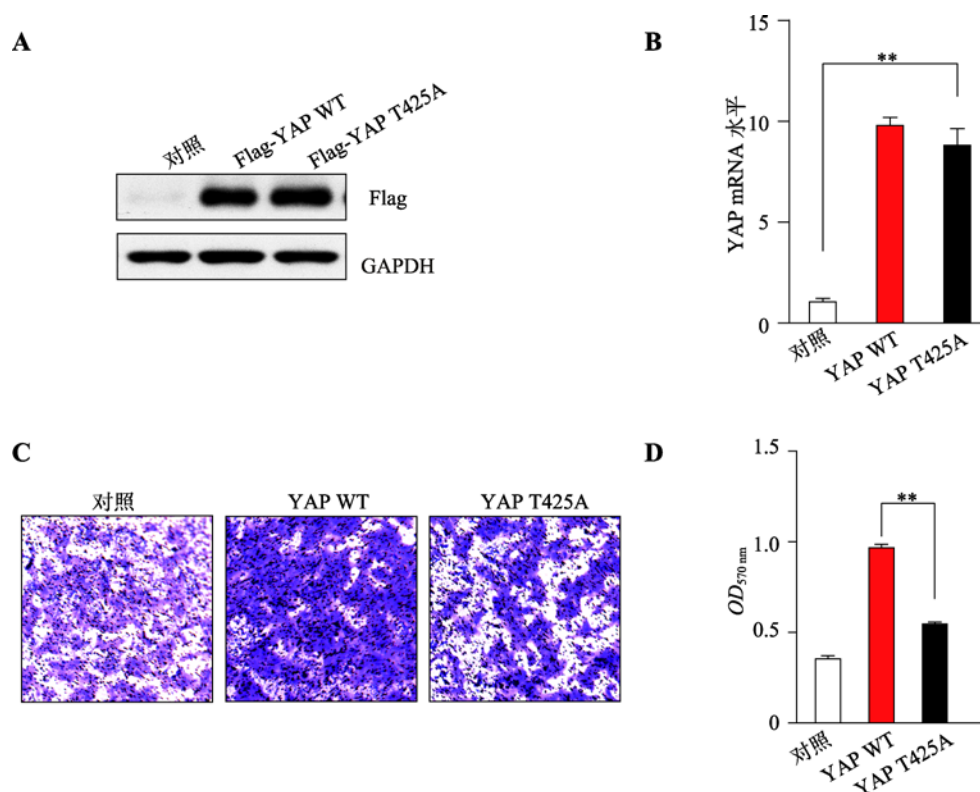


图 4 MCF10A 细胞中 T425A 突变抑制了 YAP 促进细胞迁移的能力

Fig. 4 The YAP T425A mutant suppresses YAP-promoted MCF10A cell migration

A: Western blotting 检测 Flag-YAP WT 和 T425A 的过表达效率; B: qRT-PCR 检测 Flag-YAP WT 和 T425A 的过表达效率; C: Transwell 细胞迁移实验检测 Flag-YAP WT 和 Flag-YAP T425A 的过表达对 MCF10A 细胞迁移水平的影响(在显微镜下随机选取典型的视野图, 观察拍照); D: 将 C 图中 Transwell 上的细胞溶解, 测量 3 组细胞在 570 nm 波长处的 OD 值。数据结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, t -test 检验数据差异的显著性, ** $P < 0.01$ 表示有显著的统计学差异。

YAP 功能的一个新的重要位点——425 位的苏氨酸, 并在细胞水平上对该位点的功能进行了初步实验研究。

本研究发现 YAP T425A 突变能显著降低 YAP 的转录活性, 并通过免疫荧光检测到 T425A 突变阻断了 YAP 进入细胞核。通过免疫共沉淀实验, 研究发现 T425A 突变并未导致 S127 位点的磷酸化水平有显著改变, 且 YAP 与 14-3-3 蛋白的相互作用强度也未见显著的上升, 这表明 T425 位点对 YAP 进出细胞核的调控机制可能并非依赖于 YAP/14-3-3 的相互作用。由于磷酸化调控在 YAP 的亚细胞定位中起到关键作用, 而蛋白在苏氨酸位点的磷酸化现象十分常见, 因此 T425 位点也许也是通过磷酸化作用来调控 YAP 的活性。尽管本研究发现 T425A 影响了 YAP 的核定位和转录活性, 但仍缺乏 T425 位点本身存在磷酸化的直接证据, 未来计划在细胞内过表达野生型或突变型 YAP 蛋白, 并通过免疫沉淀和质谱

分析该位点的磷酸化状态, 进一步通过位点特异性的抗体验证内源 YAP 在 T425 位点的磷酸化现象, 进而预测并验证可能调控该位点磷酸化的上游激酶, 发现 LATS 非依赖的磷酸化调控 YAP 的信号通路。

YAP 通过调控细胞增殖或细胞凋亡来协助维持细胞生长和组织器官大小的稳态^[24]。YAP 活性受到的调控与肿瘤的发生发展密切相关。除了促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用外, 有研究者发现 YAP 能诱导上皮细胞向间质细胞的转变过程并促进肿瘤的侵袭和转移^[25]。本研究在 MCF10A 细胞中检测到 YAP T425A 突变能削弱 YAP 对细胞迁移的促进作用。因此, 针对 YAP T425 位点的研究也可能为肿瘤的治疗提供更多可行的方案。

参考文献(References):

- [1] 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]
- [2] Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev*, 2014, 94(4): 1287–1312. [DOI]
 - [3] Hansen CG, Moroishi T, Guan KL. YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(9): 499–513. [DOI]
 - [4] Harvey K, Tapon N. The Salvador-Warts-Hippo pathway—an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3): 182–191. [DOI]
 - [5] Meng ZP, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev*, 2016, 30(1): 1–17. [DOI]
 - [6] 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]
 - [7] Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the roots of cancer. *Cancer Cell*, 2016, 29(6): 783–803. [DOI]
 - [8] Zeng Q, Hong WJ. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell*, 2008, 13(3): 188–192. [DOI]
 - [9] 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]
 - [10] Zhang X, George J, Deb S, Degoutin JL, Takano EA, Fox SB, AOCs Study group, Bowtell DDL, Harvey KF. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene. *Oncogene*, 2011, 30(25): 2810–2822. [DOI]
 - [11] Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, Dong JX, Maitra A, Pan DJ, Montgomery EA, Anders RA. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum Pathol*, 2008, 39(11): 1582–1589. [DOI]
 - [12] Wang KN, Degerny C, Xu MH, Yang XJ. YAP, TAZ, and Yorkie: a conserved family of signal-responsive transcriptional coregulators in animal development and human disease. *Biochem Cell Biol*, 2009, 87(1): 77–91. [DOI]
 - [13] Zhao B, Ye X, Yu JD, Li L, Li WQ, Li SM, Yu JJ, 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]
 - [14] Chen Q, Zhang NL, Xie R, Wang W, Cai J, Choi KS, David KK, Huang B, Yabuta N, Nojima H, Anders RA, Pan DJ. Homeostatic control of Hippo signaling activity revealed by an endogenous activating mutation in YAP. *Genes Dev*, 2015, 29(12): 1285–1297. [DOI]
 - [15] Mao B, Hu F, Cheng J, Wang P, Xu M, Yuan F, Meng S, Wang Y, Yuan Z, Bi W. SIRT1 regulates YAP2-mediated cell proliferation and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2014, 33(11): 1468–1474. [DOI]
 - [16] Fu D, Lv XM, Hua GH, He CB, Dong JX, Lele SM, Li DWC, Zhai QL, Davis JS, Wang C. YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(2): 297–310. [DOI]
 - [17] Cai H, Xu Y. The role of LPA and YAP signaling in long-term migration of human ovarian cancer cells. *Cell Commun Signal*, 2013, 11(1): 31. [DOI]
 - [18] Zhang JM, Smolen GA, Haber DA. Negative regulation of YAP by LATS1 underscores evolutionary conservation of the *Drosophila* Hippo pathway. *Cancer Res*, 2008, 68(8): 2789–2794. [DOI]
 - [19] 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]
 - [20] 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]
 - [21] Santinon G, Pocaterra A, Dupont S. Control of YAP/TAZ activity by metabolic and nutrient-sensing pathways. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(4): 289–299. [DOI]
 - [22] Moon S, Kim W, Kim S, Kim Y, Song Y, Bilousov O, Kim J, Lee T, Cha B, Kim M, Kim H, Katanaev VL, Jho EH. Phosphorylation by NLK inhibits YAP-14-3-3-interactions and induces its nuclear localization. *EMBO Rep*, 2017, 18(1): 61–71. [DOI]
 - [23] Chan SW, Lim CJ, Chong YF, Pobbati AV, Huang CX, Hong WJ. Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomin. *J Biol Chem*, 2011, 286(9): 7018–7026. [DOI]
 - [24] Zhu C, Li L, Zhao B. The regulation and function of YAP transcription co-activator. *Acta Biochim Biophys Sinica (Shanghai)*, 2015, 47(1): 16–28. [DOI]
 - [25] 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]