

Effect of *MARCH2* on Autophagy and Growth of Ovarian Cancer HO-8910 Cells

Dan Xia

Pathology Department of Shandong Medical College, Linyi Shandong
Email: mary3515813@163.com

Received: Sep. 19th, 2019; accepted: Oct. 14th, 2019; published: Oct. 21st, 2019

Abstract

MARCH2 is a member of *MARCH* family, which is mainly responsible for vesicle transport. In this study, we constructed an over-expressed *MARCH2* and silenced *MARCH2* HO-8910 cell line to study the effect of *MARCH2* on the autophagy level of ovarian cancer cells. It was found that knockout of *MARCH2* could promote the formation of autophagosome and autophagic flow. On the contrary, overexpression of *MARCH2* could inhibit the formation of autophagosome and autophagic flow. Further studies showed that the absence of *MARCH2* mediated autophagy upstream of ULK1 and PIK3C3 complexes. In addition, *MARCH2* deficiency can inhibit cell proliferation in vitro and the growth of xenografts in nude mice. These effects are related to the activation of autophagic signals.

Keywords

MARCH2, Autophagy, HO-8910 Cells, Ovarian Cancer

*MARCH2*对卵巢癌HO-8910细胞自噬及生长的影响

夏丹

山东医学高等专科学校病理教研室, 山东 临沂
Email: mary3515813@163.com

收稿日期: 2019年9月19日; 录用日期: 2019年10月14日; 发布日期: 2019年10月21日

摘要

Membrane-associated RING-CH protein 2 (*MARCH2*)是MARCH家族成员之一,主要负责囊泡运输,本研究构建了过表达*MARCH2*和沉默*MARCH2*的HO-8910细胞系,目的是为了研究*MARCH2*对卵巢癌细胞自噬及生长的影响。研究发现,沉默*MARCH2*可以促进自噬体的形成和自噬流,相反,过表达*MARCH2*会抑制自噬体的形成和自噬流,进一步研究发现,*MARCH2*缺失介导的自噬作用在ULK1和PIK3C3-BECN1复合物的上游。此外,沉默*MARCH2*可以抑制体外细胞增殖,亦会抑制体外裸鼠移植瘤的生长。这些效应与自噬信号的活化有关系。

关键词

MARCH2, 自噬, HO-8910细胞, 卵巢癌

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

细胞自噬(Autophagy)是细胞依赖溶酶体对大批量蛋白和细胞器(如线粒体等)进行降解的一条重要途径[1] [2] [3]。细胞自噬在进化过程中高度保守,从酵母、线虫、果蝇到脊椎动物和人都可以找到参与细胞自噬的同源蛋白。这些细胞自噬蛋白的定位、修饰及相互作用网络决定着自噬体的形成、成熟、降解以及再生等动态过程。细胞自噬不仅对细胞在应激情况下(如饥饿、缺氧)的存活、程序性细胞死亡、抗原呈递以及细胞内病原体的清除有重要作用,而且对个体发育也至关重要。研究表明,细胞自噬异常可引发多种人类重大疾病,如肿瘤、自身免疫性疾病、心血管病、神经系统疾病、代谢综合症等,细胞自噬异常严重影响细胞和生物个体的发育、生长和衰老过程[3]。

自噬受到多个信号通路的调节,其中MTOR信号通路发挥重要的作用[3]。自噬的起始是由ULK1和PIK3C3两个激酶相互协调共同作用的结果,ULK1是ULK1复合物的一部分,当营养缺乏时,ULK1被激活,其下游的PIK3C3亦被激活,ULK1和PIK3C3的激活会招募更多的ATG蛋白到phagophore膜,从而促进自噬体的形成[4] [5]。

膜相关环指蛋白2(Membrane-associated RING-CH protein 2, *MARCH2*)包含RING结构域,具有E3连接酶活性[6]。*MARCH2*首次是作为与病毒免疫逃逸蛋白相关的泛素连接酶家族成员之一被发现的[7]。*MARCH2*通过与STX6相互作用参与囊泡运输[8]。作为E3泛素连接酶,*MARCH2*能泛素化几种底物,DLG1 [9]、 β 2AR [10]和CFTR [11]。我们的前期研究显示,*MARCH2*可以负向调控细胞自噬[12],这个机制包括PIK3CA-AKT-MTOR和CFTR信号通路的抑制。然而,*MARCH2*在肿瘤中的作用尚不可知。

本研究中,我们展示了应用CRISPR/Cas9基因编辑生物技术敲除*MARCH2*会抑制卵巢癌的体内、外生长,这种抑制是通过自噬通路的效应实现的。

2. 材料和方法

2.1. 抗体和试剂

本研究所用试剂和抗体列表,如表1所示。

Table 1. List of reagents and antibodies used in this study
表 1. 本研究所用试剂和抗体列表

试剂名称	货号	公司
DMEM 培养基	12800-017	
TRIzol	15596-026	
Opti-MEM	31985-047	Invitrogen 公司
Lipo2000	11668-019	
DEPC	750024	
抗 ACTB/ β -actin 抗体	KM9001	天津三箭公司
RIPA 裂解液	P0013B	碧云天生物技术研究所
BCA Protein Assay 蛋白定量试剂盒	P0010	
硝酸纤维素膜(NC 膜)	10401396	Whatman 公司
胎牛血清	SH30088.03	Hyclone 公司
MegaTran 1.0	TT200004	Biotum 公司
抗磷酸化 MTOR (Ser2448)抗体	2971S	
抗磷酸化 RPS6KB1 (Thr389)抗体	9234S	Cell Signaling technology 公司
抗 p62/SQSTM1 抗体	5114	
抗 LC3B 抗体	L7543	
bafilomycin A ₁	B1793	Sigma Aldrich 公司
3-methyladenine	M9281	
磷酸酶抑制剂 Cocktail	04906837001	Roche 公司
蛋白酶抑制剂 Cocktail	04693116001	
DyLight 800/DyLight 680-conjugated secondary antibodies against rabbit	611-145-002/611-144-002	Rockland 公司
DyLight 800/DyLight 680-conjugated secondary antibodies against mouse	610-145-002/610-144-002	
DM2000	CW0632A	康为试剂公司
2 × Taq mix	CW0690C	
biotinylated secondary antibody	PV-9000	Origene 公司
苏木素染色液	ZLI-9610	
中性树脂	G8590	Cayman 公司
切片刀片	819	索莱宝公司
粘附载玻片	188105	Leica 公司

2.2. 细胞培养、转染和处理

HO-8910 细胞均培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基(12800-017; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)中, 37°C, 5% CO₂ 无菌培养箱, 常规传代。细胞转染使用 MegaTran 1.0 转染试剂(TT200004; ORIGEN, Rockville, MD, USA), 按说明书操作步骤转染 pcDB-*MARCH2* 或空载质粒, 选择 G418 构建过表达 *MARCH2* 细胞系, 空载转染细胞系做对照。

2.3. 应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建敲除 *MARCH2* 基因的细胞系

应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建敲除 *MARCH2* 基因的 HO-8910 细胞系。由上海南方模式生物科技发展有限公司设计 CRISPR 干扰靶序列, 人 *MARCH2* 的靶序列为 TCCAAGGTCGTGGAGGCTACGGG (第二外显子), 对克隆进行筛选。

2.4. 细胞活力检测

使用 CellTiter96 AQueous One Solution 细胞增殖检测试剂盒(G3582; Promega, Madison, WI, USA), 按照操作手册进行。细胞活力计算方法: 细胞活力 = 实验组吸光度/对照组吸光度 × 100%。每个实验设置 3 个复孔, 独立重复 3 次。

2.5. Westernblot

细胞总蛋白的提取: 将细胞置于冰上, 用冰预冷的 1 × PBS 洗两遍, 刮下细胞, 收集到 1.5 ml 离心管中, 于 4°C, 2000 g 离心 5 分钟。去除上清, 在沉淀中加入细胞裂解液(20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 蛋白酶抑制剂 Cocktail), 吹吸混匀, 冰上放置 30 分钟, 4°C, 15000 g 离心 20 分钟, 上清转入新管。细胞提取的蛋白按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书提供的方法进行蛋白定量。每组细胞蛋白取 30 μg, 加入蛋白上样缓冲液, 于 95°C 水浴煮 5 分钟。15% 丙烯酰胺胶 SDS-PAGE 电泳; 100 V 电转 2 小时; 5% 牛奶(TBST 液配制)室温封闭 1 小时; 加入相应的一抗, 4°C 过夜; 用 TBST 充分洗膜 3 次, 每次 10 分钟; 然后加入相应的 DyLight 680/800 标记的二抗(1:10000), 室温避光反应 1 小时; TBST 洗膜后使用 Odyssey Infrared Imager 检测荧光信号并分析灰度值。

2.6. 裸鼠移植瘤模型构建

选用 6~8 周雌性 BALB/c 裸鼠(北京大学医学部实验动物中心)构建裸鼠移植瘤模型。所有动物在无病原环境下饲养, 所有实验程序和协议由北京大学实验动物护理管理局批准。将对照(野生型) HO-8910 细胞或 Cas9-*MARCH2*HO-8910 细胞注射在 BALB/c 裸鼠(n = 6)右侧腋窝皮下, 注射总体积为 100 μl (4 × 10⁶ 细胞) [13]。在注射后第 20 天, 处死小鼠, 剥离肿瘤并拍照。取部分肿瘤组织匀浆并提取蛋白, 应用 Western blot 法检测 SQSTM1、LC3B 和 ACTB 的表达水平。

2.7. 免疫组织化学染色

采用免疫组化 SP 法, 抗原修复为高压热修复, 修复液使用 1 mmol/L EDTA (pH9.0), 一抗 4°C 孵育过夜, 操作步骤按照试剂说明书进行, DAB 显色。由两位病理医师独立阅片综合判断。每张切片随机观察 5 个有代表意义的高倍视野, 每个高倍视野计数 150~200 个细胞, 蛋白表达采用免疫反应评分 (immunoreactivity score, IRS), 将着色细胞数比例与着色强度相结合。按着色细胞占计数细胞百分率计分: ≤5% 为 0 分, 6%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分。按着色强度计分: 无着色为 0 分, 淡黄为 1 分, 黄色为 2 分, 棕色为 3 分。将两项得分结果相乘: 0~1 分为阴性(-); 2~4 分为弱阳性(+); 5~8 分为中等阳性(++); 9~12 分为强阳性(+++)。如果两名病理医师评分差异 > 3 分, 则该标本需重新评分。

2.8. 统计学分析

Student's t 检验分析各组之间是否存在显著性差异, $p < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。ns 代表无显著性差异; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

3. 结果

3.1. 过表达/沉默 *MARCH2* 对卵巢癌细胞自噬水平的影响

3.1.1. *MARCH2* 在自噬体形成早期阶段的作用

我们构建了过表达 *MARCH2* 质粒以及 *MARCH2* shRNA, 将 *MARCH2*-MYC、Vector、sh*MARCH2* 或 shControl 转染卵巢癌 HO-8910 细胞, 经过嘌呤霉素以适合的浓度筛选得到过表达/沉默 *MARCH2* 的稳定细胞系, 并对其有效性进行 mRNA 及 Western blot 水平的鉴定(图 1), 结果显示 *MARCH2*-MYC 能有效增加细胞中 *MARCH2* 的 mRNA 及蛋白水平, 并且 *MARCH2* shRNA 能有效敲减细胞中 *MARCH2* 的 mRNA 及蛋白水平, 证实我们合成的 *MARCH2*-MYC 和 sh*MARCH2* 有效。

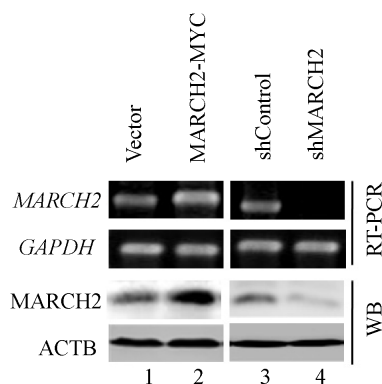


Figure 1. Identification of *MARCH2*-MYC and sh*MARCH2*

图 1. *MARCH2*-MYC、sh*MARCH2* 的鉴定

然后分析对自噬的效应。结果如图 2 所示, 与对照组相比, *MARCH2* 过表达能够减低本底 LC3B-II 的蛋白水平(图 2, lane 2 vs lane 1)。减低的 LC3B-II 可能源于自噬体生成的减少或降解的增多, 为了区分这两种可能性, 我们使用了自噬体晚期抑制剂巴弗洛霉素 A1 (BafA₁, 抑制囊泡 H⁺-ATPase, 溶酶体酸化受抑, 从而阻碍自噬体与溶酶体的融合)。结果显示, 经 BafA₁ 处理(孵育 6 小时)后, *MARCH2* 过表达细胞和对照细胞中 LC3B-II 蛋白水平明显高于未处理的细胞, 但过表达 *MARCH2* 细胞依然低于对照组(图 2, lane 4 vs lane 3)。上述结果表明, *MARCH2* 过表达引起的 LC3B-II 水平减低源于自噬体生成减少, 而不是自噬体降解增多。

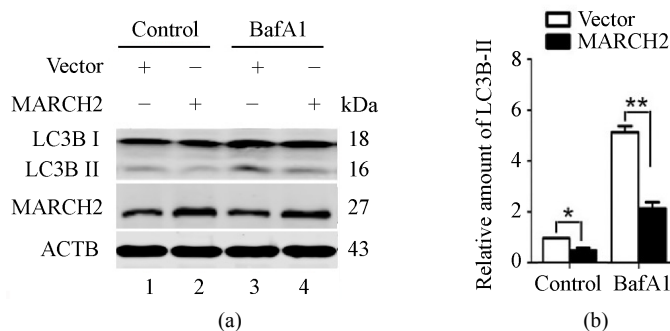


Figure 2. The levels of LC3B-II were detected by western blot

图 2. Western blot 检测 LC3B-II 水平变化(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

3.1.2. *MARCH2* 在自噬流(Autophagic Flux)中的作用

上述结果表明, *MARCH2* 过表达减少自噬体形成, 那么它对自噬流是否有影响?

与对照细胞相比, 过表达 *MARCH2* 细胞会导致内源性自噬底物 SQSTM1 水平有所升高(图 3(a)和图 3(b)), 预示着自噬水平的减低, 表明过表达 *MARCH2* 抑制自噬流。

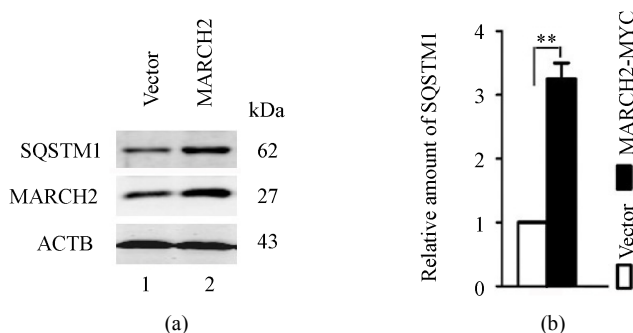


Figure 3. *MARCH2* overexpression impairs autophagic flux
图 3. *MARCH2* 过表达抑制自噬流(**, $p < 0.01$)

重复实验的数据显示, 与对照组相比, 敲减 *MARCH2* 能升高内源性 LC3B-II 的水平(图 4, lane 2 vs lane 1)。升高的 LC3B-II 可能由于自噬体生成增多, 也可能是自噬体降解减少, 用 BafA₁ 处理阻断溶酶体降解后, 与对照组相比, *MARCH2* 沉默细胞中内源性 LC3B-II 的水平进一步升高(图 4, lane 4 vs lane 3), 表明 *MARCH2* 沉默促进了自噬体的生成, 而不是阻断其降解。

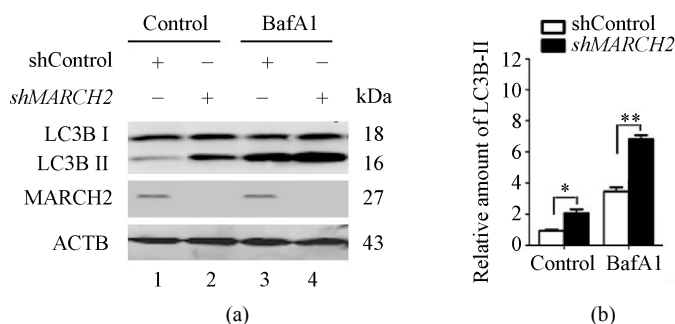


Figure 4. The levels of LC3B-II were detected by Western blot
图 4. Western blot 检测 LC3B-II 水平变化(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

为了进一步确定 *MARCH2* 对自噬作用的特异性, 我们还进行了补救实验。用对照 HO-8910 细胞(野生型)、*shMARCH2*HO-8910 细胞或转染 *MARCH2*-MYC 过表达质粒 24 小时的 *shMARCH2*HO-8910 细胞进行 Western blot 检测, 如图 5(a)和图 5(b)所示, 转入 *MARCH2*-MYC 过表达质粒可以逆转沉默 *MARCH2* 引起的 LC3B-II 增多。

与对照组相比, 沉默 *MARCH2* 细胞中内源性自噬底物 SQSTM1 (图 6(a)和图 6(b))明显减少, 表明沉默 *MARCH2* 促进自噬流。

3.1.3. 确定 *MARCH2* 调控卵巢癌细胞自噬的关键作用点

为了进一步明确 *MARCH2* 在自噬过程中作用的节点, 我们利用 Western blot 检测敲减自噬起始阶段将 PIK3C3-BECN1 复合体重新定位到内质网的关键分子 *ULK1* 对于沉默 *MARCH2* 诱导自噬的影响, 研究发现, 敲减 *ULK1* 能阻断 *MARCH2* 失活导致的 LC3B 脂化(图 7(a)和图 7(b), lane 4 vs lane 2)。上述结果

表明 ULK1 参与了 *MARCH2* 调控的细胞自噬。

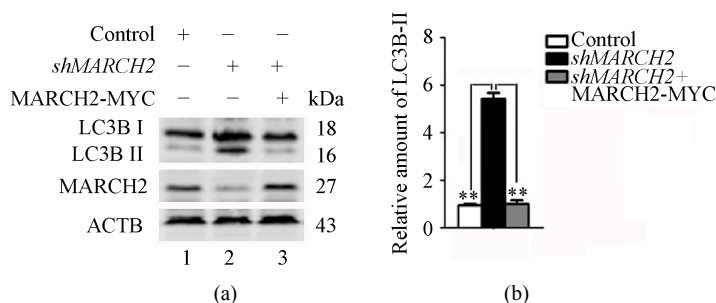


Figure 5. Exogenous *MARCH2* expression can remedy the up-regulation of *MARCH2* deficiency-induced autophagosome formation

图 5. 外源性 *MARCH2* 的表达能够补救 *MARCH2* 沉默上调的自噬体形成 (**, $p < 0.01$)

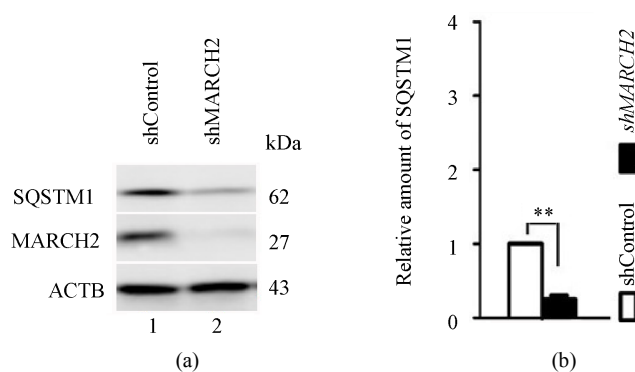


Figure 6. *MARCH2* silencing increases autophagic flux

图 6. 沉默 *MARCH2* 促进自噬流 (**, $p < 0.01$)

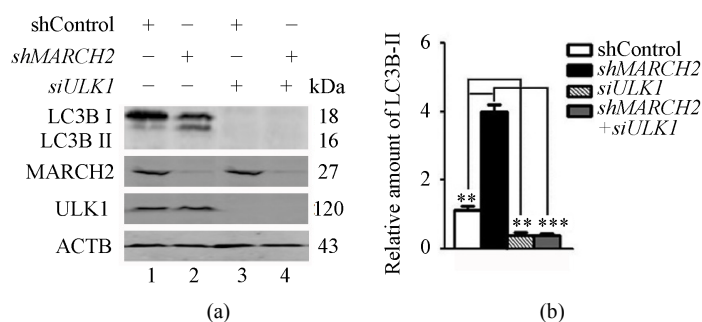


Figure 7. ULK1 knockdown inhibits *MARCH2* silencing-mediated autophagy

图 7. *ULK1* 敲减能够抑制沉默 *MARCH2* 诱导的自噬 (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

此外,我们还检测了 BECN1-PIK3C3 复合物对于敲减 *MARCH2* 诱导自噬的影响。3-MA (3-methylpurine) 是 PIK3C3 的抑制剂,能够抑制 PI3P 的形成,被广泛用来作为自噬的抑制剂。我们利用 Western blot 检测 3-MA 对于沉默 *MARCH2* 诱导自噬的影响,结果显示沉默 *MARCH2* 能够明显上调 LC3B-II 的水平(图 8(a)和图 8(b), lane 2 vs lane 1),而 3-MA 处理减弱沉默 *MARCH2* 诱导的 LC3B 转换(图 8(a)和图 8(b), lane 4 vs lane 2)。上述的研究结果证明 PIK3C3 的活性与沉默 *MARCH2* 诱导的自噬相关联。上述结果表明

MARCH2 缺失介导的自噬作用在 ULK1 和 PIK3C3-BECN1 复合物的上游。

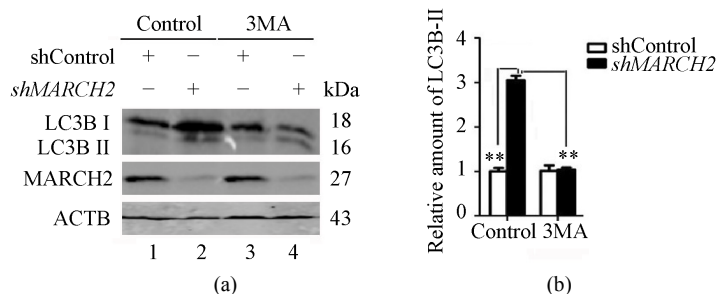


Figure 8. *MARCH2* silencing-mediated autophagy is associated with PIK3C3 activity

图 8. 沉默 *MARCH2* 诱导的自噬与 PIK3C3 的活性相关(**, $p < 0.01$)

3.2. *MARCH2* 调控的卵巢癌细胞自噬与信号通路

调节自噬的信号通路有多个, 其中最重要的是 MTOR 信号通路。为了证实 *MARCH2* 缺陷是否通过抑制 MTOR 通路来启动自噬, 我们对 MTOR 通路进行了检测。数据显示 *MARCH2* 缺陷的 HO-8910 细胞中 MTOR (Ser2448) 以及其下游的效应分子 RPS6KB1 激酶(Thr389)的磷酸化水平减低(图 9(a)), 表明 *MARCH2* 失活减弱了 MTOR 信号。相反地, 在 *MARCH2* 过表达细胞中 RPS6KB1 激酶的磷酸化水平升高(图 9(b)), 表明 *MARCH2* 过表达促进 MTOR 信号通路。

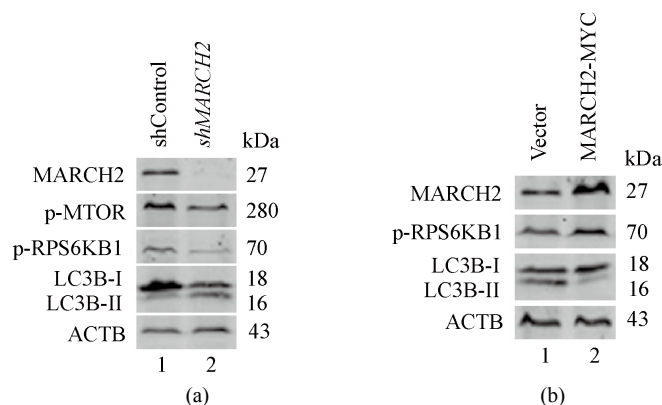


Figure 9. MTOR signaling pathway is involved in autophagy regulated by *MARCH2*

图 9. MTOR 信号通路参与 *MARCH2* 调控的自噬

3.3. *MARCH2* 调控的自噬对卵巢癌细胞生长的影响

3.3.1. 体外实验: Cas9-*MARCH2* 细胞的增殖情况

我们针对 *MARCH2* 基因第二外显子设计的 CRISPR/Cas9 干扰靶序列为 TCCAAGGTCGTGGAGGCTACGGG, 通过载体构建、质粒纯化、转染、流式分选、单克隆培养、测序、分析、鉴定得到了敲除 *MARCH2* 基因的 HO-8910 细胞系。然后, 我们检测了 Cas9-*MARCH2*HO-8910 细胞系的活力, 进行了 MTS 细胞增殖实验, 将对照组细胞(野生型细胞)和 Cas9-*MARCH2*HO-8910 细胞铺在 96 孔板(每孔 3000 个细胞, 做 5 个复孔), 血清饥饿 18 h, 然后加入 10% FCS 24 h, 48 h, 96 h, 144 h。检测结果显示, 与对照组相比, Cas9-*MARCH2*HO-8910 细胞的活力减低(图 10)。

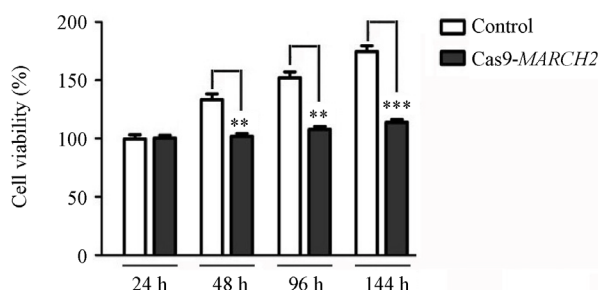


Figure 10. Viability of Cas9-MARCH2 HO-8910 cells were detected by MTS cell proliferation assay

图 10. MTS 细胞增殖实验检测 Cas9-MARCH2 HO-8910 细胞的活力(**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

3.3.2. 体内实验：动物移植瘤的生长情况

为了证实 *MARCH2* 在体内的效应，我们进行了 BALB/c 裸鼠体内卵巢癌移植瘤的实验。将野生型 HO-8910 细胞或 Cas9-MARCH2 HO-8910 细胞注射入 BALB/c 裸鼠右侧腋窝皮下。接种第 20 天后，处死小鼠，剥离出肿瘤、拍照。如图 11(a)，Cas9-MARCH2 组比对照组的肿瘤体积小，表明沉默 *MARCH2* 降低 HO-8910 细胞的肿瘤形成能力(图 11(a))。Western blot 结果显示，与对照组相比，Cas9-MARCH2 组的肿瘤内源性 SQSTM1 的水平减低，LC3B-II 的水平升高(图 11(b))，表明发生了自噬。提示在体内 HO-8910 细胞中沉默 *MARCH2* 诱导的自噬有抗肿瘤的作用。



Figure 11. Loss of *MARCH2* inhibits the tumorigenicity of ovary cancer cells *in vivo*

图 11. 敲除 *MARCH2* 抑制卵巢癌移植瘤生长

3.4. 临床卵巢癌标本中 *MARCH2* 蛋白表达的检测

接下来，我们检测了原发性卵巢癌组织和相邻的非肿瘤组织中 *MARCH2* 的表达情况。在非肿瘤组织中，*MARCH2* 呈现阴性表达(图 12(a))。相反的，在大多数卵巢癌组织中，*MARCH2* 呈现中度的表达(图 12(b))。这些结果进一步提示 *MARCH2* 的高表达可能促进卵巢癌的发生发展。

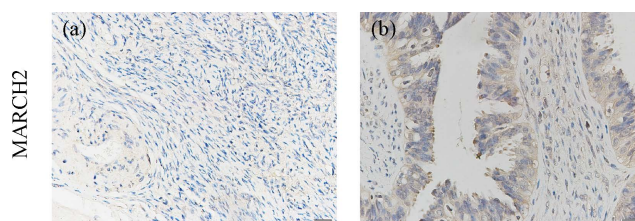


Figure 12. Upregulation of *MARCH2* expression in human ovarian cancer

图 12. *MARCH2* 在人卵巢癌组织中表达上调(SP, $\times 200$)

4. 讨论

本研究中,我们对 *MARCH2* 在卵巢癌发展中的功能和作用机制进行了体内、外的检测。沉默 *MARCH2* 抑制卵巢癌 HO-8910 细胞的活力,并且抑制移植瘤生长。进一步研究表明,这些效应与沉默 *MARCH2* 细胞中的自噬活化密切相关。而且, *MARCH2* 在人卵巢癌组织呈中、高表达,而在非肿瘤组织中呈阴性表达,提示 *MARCH2* 可能促进卵巢癌的发生发展。此外,过表达 *MARCH2* 还伴有减低的自噬(LC3B 表达的降低、升高的 SQSTM1 表达),减低的 MTOR 信号。这首次证明了在卵巢癌中 *MARCH2*、MTOR 和自噬之间的相关性,表明 MARCH 的灭活可能成为卵巢癌治疗的新靶点。

众所周知,自噬在肿瘤生物学中有促进和拮抗双重效应。自噬最初被认为可以抑制肿瘤的起始,这种肿瘤抑制作用的间接证据是自噬失活引起癌基因和肿瘤抑制基因的改变如 AKT 的扩增、PI3K 突变和 PTEN 的缺失[14]。这意味着激活的自噬可以阻断细胞的癌基因转化。自噬作为肿瘤抑制因子的更多直接证据是来自核心自噬分子如 ATG5、ATG7 和 BECN1 的遗传学研究,研究显示自噬的缺陷能够增加肿瘤的发生[15][16]。从机制的角度看,自噬的抑制引起 ROS 的积累、DNA 损伤增多、线粒体缺陷,这些都参与了肿瘤发生[17]。自噬失活引起 SQSTM1 增多参与肿瘤发生[16]。相反,自噬可以通过 SQSTM1 减少抑制肿瘤发生[17]。SQSTM1 的过表达参与了肾癌的发生[18]。SQSTM1 缺陷抑制肿瘤发生[19],可能因为升高了氧应激,也可能由于 SQSTM1 是多种癌基因通路的信号接合器,包括 MTOR、NRF2 和 NF- κ B [20]。我们对敲除 *MARCH2* 的生物学活性研究也提供了新的证据,细胞中减少 SQSTM1 的水平,能够诱导细胞自噬从而抑制肿瘤的生长。

基金项目

本研究由国家自然科学基金项目(81702776);山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0569)资助。

参考文献

- [1] He, C. and Klionsky, D.J. (2009) Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, **43**, 67-93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- [2] Levine, B., Mizushima, N. and Virgin, H.W. (2011) Autophagy in Immunity and Inflammation. *Nature*, **469**, 323-335. <https://doi.org/10.1038/nature09782>
- [3] Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. and Klionsky, D.J. (2008) Autophagy Fights Disease through Cellular Self-Digestion. *Nature*, **451**, 1069-1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
- [4] Dunlop, E.A. and Tee, A.R. (2014) mTOR and Autophagy: A Dynamic Relationship Governed by Nutrients and Energy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **36**, 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.006>
- [5] Heras-Sandoval, D., Perez-Rojas, J.M., Hernandez-Damian, J. and Pedraza-Chaverri, J. (2014) The Role of PI3K/AKT/mTOR Pathway in the Modulation of Autophagy and the Clearance of Protein Aggregates in Neurodegeneration. *Cellular Signalling*, **26**, 2694-2701. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.019>
- [6] Barteel, E., Mansouri, M., Hovey, N.B., Gouveia, K. and Fruh, K. (2004) Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I Byhuman Ubiquitin Ligases Related To Viral Immune Evasion Proteins. *Journal of Virology*, **78**, 1109-1120. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.019>
- [7] Boutell, C., Sadis, S. and Everett, R.D. (2002) Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein ICP0 and Its Isolated RING Finger Domain Act as Ubiquitin E3 Ligases *In Vitro*. *Journal of Virology*, **76**, 841-850. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.2.841-850.2002>
- [8] Nakamura, N., Fukuda, H., Kato, A. and Hirose, S. (2005) MARCH-Iiisyntaxin-6-Binding Protein Involved in Endosomal Trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, **16**, 1696-1710. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-03-0216>
- [9] Cao, Z., Huett, A., Kuballa, P., Giallourakis, C. and Xavier, R.J. (2008) DLG1 Is an Anchor for the E3 Ligase *MARCH2* at Sites of Cell-Cell Contact. *Cellular Signalling*, **20**, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.08.019>
- [10] Han, S.O., Xiao, K., Kim, J., Wu, J.H., Wisler, J.W., Nakamura, N., *et al.* (2012) *MARCH2* Promotes Endocytosis and Lysosomal Sorting of Carvedilol-Bound Beta(2)-Adrenergic Receptors. *The Journal of Cell Biology*, **199**, 817-830. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208192>

-
- [11] Cheng, J. and Guggino, W. (2013) Ubiquitination and Degradation of CFTR by the E3 Ubiquitin Ligase *MARCH2* through Its Association with Adaptor Proteins CAL and STX6. *PLoS ONE*, **8**, e68001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068001>
- [12] Xia, D., Qu, L., Li, G., Hongdu, B., Xu, C., Lin, X., *et al.* (2016) *MARCH2* Regulates Autophagy by Promoting CFTR Ubiquitination and Degradation and PIK3CA-AKT-MTOR Signaling. *Autophagy*, **12**, 1614-1630. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1192752>
- [13] Kugimiya, N., Nishimoto, A., Hosoyama, T., Ueno, K., Enoki, T., Li, T.S., *et al.* (2015) The c-MYC-ABCB5axis Plays a Pivotal Role in 5-Fluorouracil Resistance in Human Colon Cancer Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **19**, 1569-1581. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12531>
- [14] Kimmelman, A.C. (2011) The Dynamic Nature of Autophagy in Cancer. *Genes & Development*, **25**, 1999-2010. <https://doi.org/10.1101/gad.17558811>
- [15] Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., *et al.* (2011) Autophagy-Deficient Mice Develop Multiple Liver Tumors. *Genes & Development*, **25**, 795-800. <https://doi.org/10.1101/gad.2016211>
- [16] Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., *et al.* (2011) Persistent Activation of Nrf2 through p62 in Hepatocellular Carcinoma Cells. *The Journal of Cell Biology*, **193**, 275-284. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102031>
- [17] White, E. (2015) The Role for Autophagy in Cancer. *Journal of Clinical Investigation*, **125**, 42-46. <https://doi.org/10.1172/JCI73941>
- [18] Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., *et al.* (2009) Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell*, **137**, 1062-1075.
- [19] Li, L., Shen, C., Nakamura, E., *et al.* (2013) *SQSTM1* Is a Pathogenic Target of 5q Copy Number Gains in Kidney Cancer. *Cancer Cell*, **24**, 738-750. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.025>
- [20] Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., *et al.* (2008) The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF-kappaB Mediator in Tumorigenesis. *Cancer Cell*, **13**, 343-354. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.02.001>