

技术与方法

利用CRISPR/Cas9技术构建VPS34基因
敲除的A549/293T细胞系刘玉兰¹ 李娅慧¹ 张宜娜² 刘斐¹ 胡伯里^{1*} 周继勇^{1,2}(¹南京农业大学动物医学院, 南京 210095; ²浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要 该研究利用CRISPR/Cas9策略构建敲除VPS34基因的A549/293T细胞系, 并初步将其用于自噬功能研究。应用在线工具设计了针对VPS34基因的3条sgRNA, 并克隆至pX459载体。将重组质粒转染A549/293T细胞, 嘌呤霉素初步筛选, 通过PCR后测序和Western blot技术检测发现, sgRNA-1的敲除效果最好。将转染sgRNA-1的两种细胞单克隆化, PCR测序发现, 存在碱基缺失, Western blot结果显示, 对应的单克隆也未检测到VPS34蛋白, 可见成功获得了VPS34敲除的A549/293T细胞系。由于VPS34参与自噬起始, 实验结果显示, VPS34敲除后, LC3-I向LC3-II转化显著被抑制, 自噬底物P62大量累积。结果表明, 该方法成功获得稳定敲除VPS34基因的A549/293T细胞系, 且细胞中的自噬被显著抑制。同时, 敲除VPS34能够降低人肺癌A549细胞的生长速率。该实验利用CRISPR/Cas9系统首次获得稳定敲除VPS34基因的哺乳动物细胞A549/293T细胞系, 为后续自噬功能研究提供有力工具。

关键词 CRISPR/Cas9系统; VPS34; 基因敲除; 单克隆细胞; 自噬

Construction of VPS34-Knockout A549/293T Cell Line by CRISPR/Cas9 System

Liu Yulan¹, Li Yahui¹, Zhang Yina², Liu Fei¹, Hu Boli^{1*}, Zhou Jiyong^{1,2}(¹College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;²College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The aim of this study is to generate VPS34 gene knockout A549/293T cell lines by CRISPR/Cas9 system and preliminarily used them in autophagy research. Three VPS34-targeting sgRNAs were designed by online software and then cloned into pX459 vector. The recombinant vectors were transfected into A549/293T cells and screened by puromycin. The results of PCR sequencing and Western blot showed that sgRNA-1 had the best knockout effect. Object to subclone the two kinds of cells which were transfected with sgRNA-1, the deletion of bases were found after PCR sequencing. At the same time, the VPS34 protein expression was not detected in the corresponding monoclonal cells by Western blot. Finally, the VPS34 gene deletions in A549 cells and 293T cells were successfully obtained. As VPS34 plays an important role in the initiation of autophagy, in VPS34 knockout A549/293T cells, we found that the transformation of LC3-I to LC3-II was significantly inhibited, and the P62 was accumulated in large quantities. The results showed that the autophagy in VPS34 deleted cell lines were significantly inhibited. At the same time, we found that VPS34 gene knockout could reduce the growth rate of A549

收稿日期: 2018-04-09 接受日期: 2018-06-20

国家自然科学基金重点项目(批准号: 31630077)资助的课题

*通讯作者。Tel: 025-84396466-8036, E-mail: bolihu@njau.edu.cn

Received: April 9, 2018

Accepted: June 20, 2018

This work was supported by the Key Project of National Natural Science Foundation of China (Grant No.31630077)

*Corresponding author. Tel: +86-25-84396466-8036, E-mail: bolihu@njau.edu.cn

网络出版时间: 2018-09-10 15:29:39

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180910.1529.002.html>

cell. Our results showed that *VPS34* in A549/293T cells was successfully deleted using CRISPR/Cas9 technology, which provide a powerful tool for autophagy studies in the future.

Keywords CRISPR/Cas9; *VPS34*; gene knockout; monoclonal cell; autophagy

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9基因敲除策略是现今最便利的一种基因编辑技术。该技术利用外源表达Cas9蛋白与人工设计的单向导RNA(single guide RNA, sgRNA)形成蛋白核酸复合物,在sgRNA介导下与目的基因特异性靶点结合,从而对目的基因进行特异性剪切^[1]。

细胞自噬(autophagy)是真核生物中进化保守的对细胞内物质进行周转的重要过程。该过程中一些损坏的蛋白或细胞器被双层膜结构的自噬小泡包裹后,送入溶酶体(动物)或液泡(酵母和植物)中进行降解并得以循环利用^[2-3]。自噬在肿瘤形成中扮演着重要的角色,影响癌症的发生、发展及其治疗^[4-6]。自噬还可以维持新老干细胞的新陈代谢功能^[7]。*VPS34*(vacuolar protein sorting 34)作为III型PI3K(phosphoinositide 3-kinase)的催化亚基,能特异性磷酸化磷脂酰肌醇生成磷脂酰肌醇-3-磷酸盐[PI(3)P]^[8]。*VPS34*基因缺失能够引起细胞巨自噬的中断^[9]。*VPS34*去乙酰化能够增强其与底物PI的互作,促进*VPS34*-Beclin1核心复合物的形成,增强自噬的起始^[10]。

作为自噬过程中的重要元件,*VPS34*在哺乳动物自噬中的分子机制仍然比较模糊。人肺腺癌上皮细胞系(A549)和人胚胎肾细胞系(293T)作为信号通路研究常用的工具细胞,目前还没有*VPS34*基因稳定敲除的细胞系。因此,本研究利用CRISPR/Cas9技术构建了*VPS34*基因敲除的A549和293T细胞系,这为自噬相关信号通路机制的研究提供工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌种和质粒 本实验所用A549细胞、293T细胞、Stbl3感受态细胞、pX459载体由本实验室保存。

1.1.2 材料及试剂 质粒提取试剂盒购自TIANGEN公司。*Bbs* I酶购自NEB公司。2×taq plus master mix、T4连接酶、Exfect转染试剂购自诺唯赞生物科技有限公司。GeneRuler 100 bp Plus DNA

Ladder购自Thermo公司。DMEM购自HYCLONE公司。JETPRIME转染试剂购自Polyplus公司。CCK-8购自上海碧云天生物技术有限公司。*VPS34*抗体和LC3抗体购自CST公司。P62抗体购自Sigma公司。GAPDH购自杭州贤至生物科技有限公司。HRP羊抗兔二抗购自KPL公司。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA的设计和寡核苷酸链的合成 根据<http://asia.ensembl.org/index.html>数据库获得*VPS34*基因序列,利用在线设计网站(<http://crispr.mit.edu>)分析得出具体sgRNA得分后,选择得分较高的第1个外显子中的两个sgRNA(sgRNA-1、sgRNA-2)和第15个外显子中的一个sgRNA(sgRNA-3)共三组作为备选序列。在其正义链模板的5'端添加CACC,反义链模板的3'端添加AAAC,形成与*Bbs* I酶的黏性末端互补的末端,设计相对应的敲除鉴定引物,引物信息如表1。

1.2.2 敲除载体构建 使用*Bbs* I限制性内切酶线性化质粒pX459,并按照凝胶回收试剂盒说明书进行切胶回收。Oligo退火形成双链DNA:将合成的Oligo稀释成浓度为100 μmol/L,各取5 μL的正反链Oligo溶液,退火程序为95 °C 5 min,室温10 min,冰浴5 min。连接体系组分为:4 μL(~100 ng)线性化pX459质粒,2 μL双链sgRNA(oligo),1 μL 10×T4 DNA连接酶缓冲液,1 μL T4 DNA连接酶,补水至10 μL;16 °C连接过夜。连接产物转化于Stbl3感受态细胞中,之后涂布于氨苄抗性固体平板上,37 °C培养过夜。挑取单菌落扩大培养后作为模板进行菌液PCR。核酸胶验证后,选取阳性克隆送南京擎科生物科技有限公司测序。

1.2.3 敲除载体验证 将A549细胞和293T细胞分别接种于24孔板,第2天待细胞长至80%融合度时,将3条重组质粒*VPS34*-sgRNA分别转染A549细胞和293T细胞,转染过程严格按照说明书进行。其中,A549细胞用JETPRIME转染试剂转染,并补充为含2%血清的DMEM培养基。4 h后换取新鲜含2%血清的DMEM培养基。转染24 h后添加嘌呤霉素,使其终浓度为2 μg/mL。在该浓度嘌呤霉素作用下,未

转染的细胞将会被杀死, 之后每天按照该浓度进行换液培养, 进行为期3天的细胞筛选。293T细胞用Exfect转染试剂转染, 并补充为含2%血清的DMEM培养基。8 h后换取新鲜含2%血清的DMEM培养基。转染24 h后添加嘌呤霉素, 使其终浓度为4 $\mu\text{g/mL}$ 。在该浓度嘌呤霉素作用下, 未转染的细胞将会被杀死, 之后每天按照该浓度进行换液培养, 进行为期3天的细胞筛选。分别取各自存活下来的部分细胞用于基因组检测, 检测引物如表1。另一部分细胞用Western blot检测VPS34蛋白表达水平。选出效果最好的sgRNA重组质粒用于稳定敲除细胞株筛选。

1.2.4 稳定敲除细胞的筛选 将敲除效果最好的质粒分别转染A549细胞和293T细胞, 并经相应浓度的嘌呤霉素筛选。此时, 存活的细胞即为已成功转入敲除效果最好的*VPS34*-sgRNA质粒的细胞。用胰酶消化细胞并进行无限稀释, 接种至96孔板进行培养, 培养基中嘌呤霉素的浓度可下调至原来浓度的一半。待细胞长成单克隆细胞群落, 取部分细胞用

于基因组的检测, 将有切割修复效果的单克隆细胞扩大培养。收集部分单克隆细胞和正常细胞, 提取细胞总蛋白进行Western blot, 检测VPS34蛋白表达情况。将有切割修复效果及VPS34蛋白不表达的单克隆细胞最终转入培养瓶中做稳定传代培养。

1.2.5 sgRNA脱靶位点检测 利用在线网站(<https://benchling.com/>)预测*VPS34*的sgRNA脱靶位点, 并针对预测的脱靶位点设计引物。引物信息如表2。抽取细胞基因组DNA, 进行PCR检测, 送至南京擎科生物科技有限公司测序。

1.2.6 *VPS34*基因敲除细胞系中自噬水平检测 收集*VPS34*基因敲除细胞系及其对照细胞, 经强裂解液裂解后, 加入适量4 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 热变性10 min。4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min离心10 min, 取等量上清经SDS-PAGE分离样品, 湿转法转至PVDF膜, 5%脱脂奶常温封闭1 h, 一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 荧光二抗常温孵育1 h后, 用Amersham Imager 600化学发光仪进行显色, 记录结果并进行分析。

表1 引物寡核苷酸序列

Table 1 The oligo sequences

向导RNA sgRNA	寡核苷酸序列 Oligo nucleotide sequence
sgRNA-1 primer	F: 5'-CAC CGC TAC ATC TAT AGT TGT GAC C-3' R: 5'-AAA CGG TCA CAA CTA TAG ATG TAG C-3'
sgRNA-2 primer	F: 5'-CAC CGT GTA AGA GAA CAC TCG GGA C-3' R: 5'-AAA CGT CCC GAG TGT TCT CTT ACA C-3'
sgRNA-3 primer	F: 5'-CAC CGA GCC TGC AAA AAC TCA ACA C-3' R: 5'-AAA CGT GTT GAG TTT TTG CAG GCT C-3'
Detection-1	F: 5'-GTA ACC AGA TTA GCC GTT TCC CGT-3' R: 5'-CCA GGT CAC AAC TAT AGA TGT AG-3'
Detection-2	F: 5'-GGA ATG TAA CCA GAT TAG CCG T-3' R: 5'-GTC CCG AGT GTT CTC TTA CA-3'
Detection-3	F: 5'-TGC TCG CAA ATG ATT TGG CCT GG-3' R: 5'-AGT TGG GTT GGT GTA ATG AG-3'

表2 脱靶位点寡核苷酸序列

Table 2 Off-target site oligo sequences

脱靶位点名称 Off-target site name	引物序列 Primer sequences
1#off-target site	F: 5'-ATC TAT GCA TTT CCC TGG TAA CC-3' R: 5'-CCC TGT TTC TTT CTT GGT TTA TGT G-3'
2#off-target site	F: 5'-AAC TAG TCC TTT TGT TTC TCA TTG G-3' R: 5'-GGG AAT GTT CTG TGT GCT CCT GCT A-3'
3#off-target site	F: 5'-TGG CTG GAT GTG AGA TGG TAT GG-3' R: 5'-ATT CTT CAC CAA CTG TAG CCA C-3'

1.2.7 CCK-8法检测细胞增殖 单克隆细胞和正常细胞分别以 2×10^4 /mL接种于96孔板(100 μ L/孔), 并设置空白对照, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养。待细胞达到90%融合度, 每孔加入10 μ L CCK-8溶液, 再在培养箱中培养2 h后, 在酶标仪下检测450 nm的吸光度(D)值。

1.3 统计学处理

实验数据用GraphPad Prism 6.0软件通过One-Way ANOVA进行统计学分析并作图, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *VPS34*-sgRNA载体的构建

用*Bbs* I酶切pX459质粒, 回收的片段与退火后的寡核苷酸双链经连接、转化, 挑取单克隆送至南京擎科生物科技有限公司测序, 测序结果完全正确。pX459质粒信息如图1A。sgRNA插入位置和序列信息如图1B。sgRNA靶点以及敲除鉴定引物如表1。重组载体分别命名为: *VPS34*-sgRNA-1、*VPS34*-sgRNA-2、*VPS34*-sgRNA-3。

2.2 *VPS34*-sgRNA质粒转染A549/293T细胞的验证

将重组质粒分别瞬时转染A549/293T细胞, 嘌呤霉素筛选, 细胞基因组的PCR检测以及测序(图2A和图2C)。序列比对结果显示, sgRNA靶位点处存在

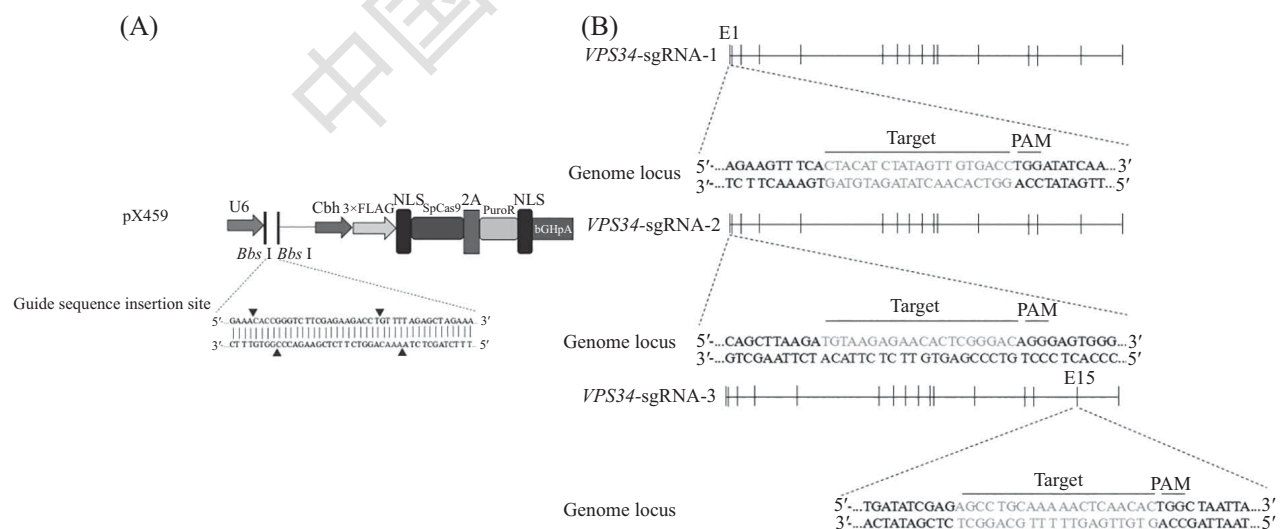
杂峰。Western blot结果显示, *VPS34*蛋白表达量下降(图2B)。以上结果说明, 重组质粒有敲除效果, 其中质粒*VPS34*-sgRNA-1效果最好, 并将其用于后续单克隆细胞筛选。

2.3 稳定敲除*VPS34*基因的A549/293T细胞系筛选

VPS34-sgRNA-1质粒分别转染A549和293T细胞, 嘌呤霉素筛选, 细胞单克隆化。通过细胞基因组检测和Western blot技术筛选敲除*VPS34*的细胞系。检测结果发现, A549细胞和293T细胞阳性克隆比率分别为22.5%、39.5%。挑选敲除效果最好的单克隆细胞测序, 序列比对结果显示, *VPS34*基因敲除的A549细胞在sgRNA靶标序列处发生5个碱基突变, 2个碱基缺失; *VPS34*基因敲除的293T细胞在sgRNA靶标序列处发生6个碱基突变, 2个碱基缺失。Western blot结果也验证了这两株单克隆*VPS34*蛋白均不表达, 并将这两种单克隆分别命名为A549-KO-*VPS34*、293T-KO-*VPS34*(图3)。

2.4 sgRNA脱靶位点检测

针对sgRNA-1预测3处潜在脱靶位点。(1) *LGALS14*基因(位于19号染色体, 正链39704347, 脱靶预测0.5分)上的脱靶位点为: AAA CAT CTA TGG TTG TGA CA(1#); (2) *MOGAT1*基因(位于2号染色体, 负链222689295, 脱靶预测0.6分)上的脱靶位点为: CCA AAT ATA TAG TTG TGA CT(2#); (3) *RNF213*



A: pX459质粒结构; B: Exon1/15-sgRNA的靶向识别位置及其周围的DNA序列。

A: structure of plasmid pX459; B: the genomic sequences around the Exon1/15-sgRNA-targeting sites.

图1 构建靶向*VPS34*的pX459质粒

Fig.1 Construction of *VPS34*-targeting pX459 plasmid

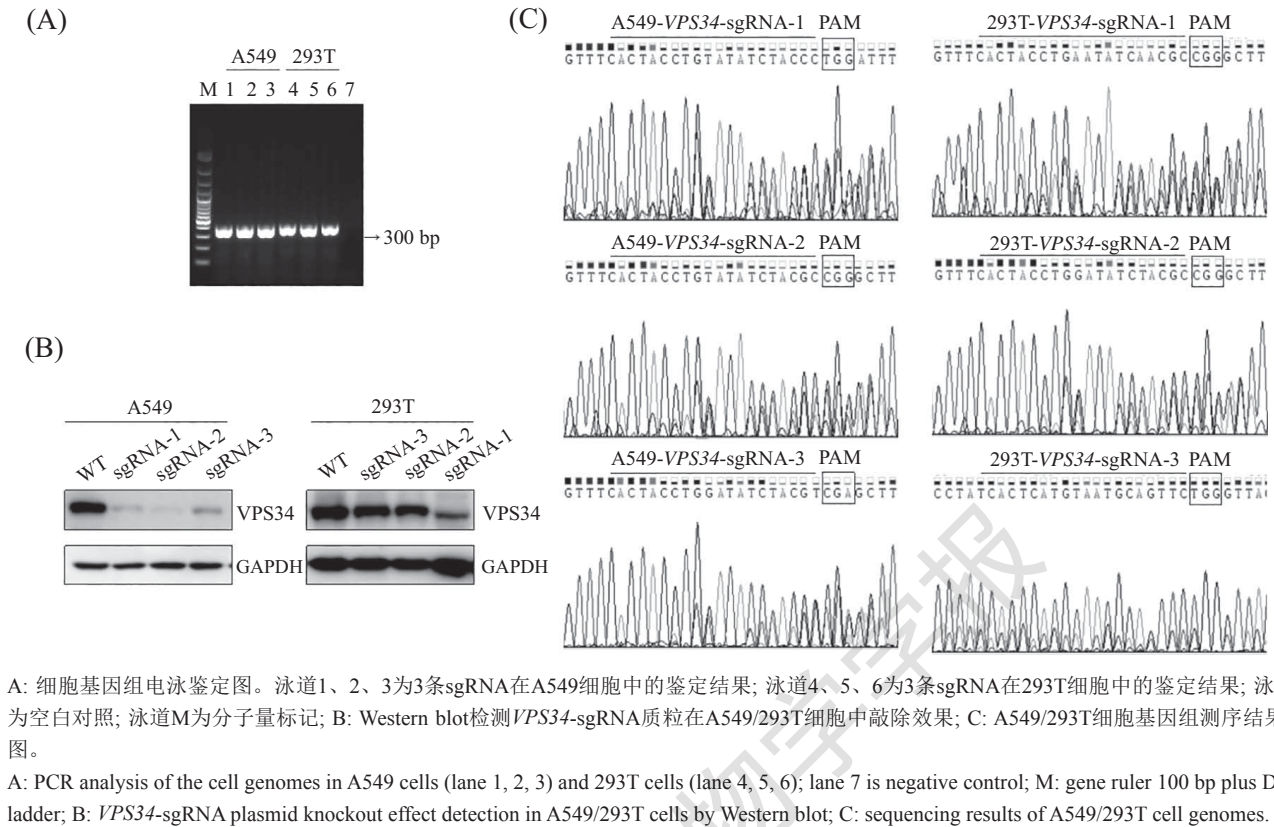


图2 检测*VPS34*-sgRNAs在A549和293T细胞中的敲除效果

Fig.2 Test the knockout efficiency of *VPS34*-sgRNAs in A549 and 293T cells

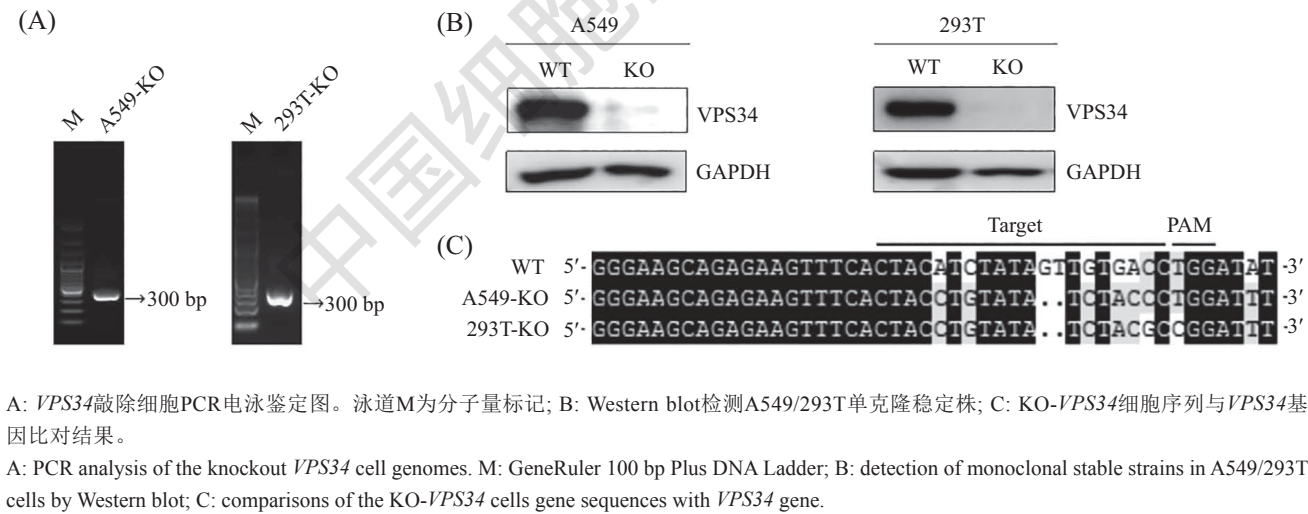


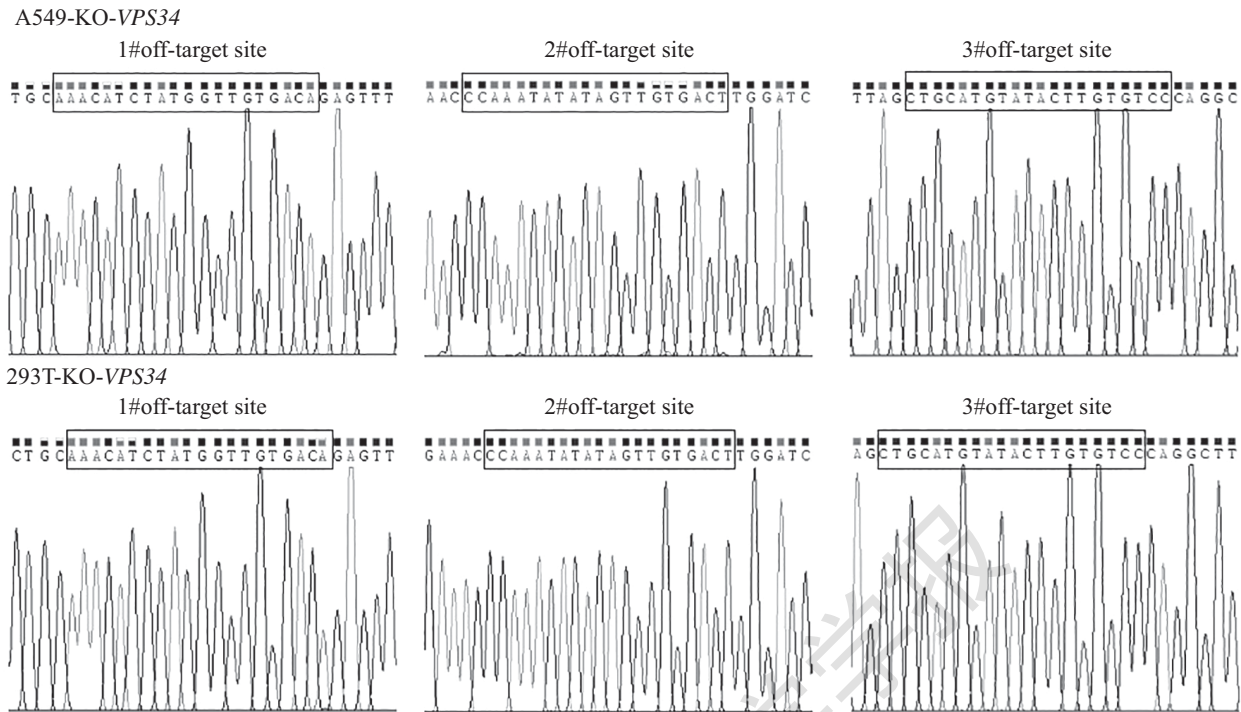
图3 单克隆细胞系

Fig.3 Monoclonal cell lines

基因(位于17号染色体, 负链80363519, 脱靶预测0.1分)上的脱靶位点为: CTG CAT GTA TAC TTG TGT CC(3#)。对应引物如表2。分别抽取相应*VPS34*基因敲除细胞的基因组DNA, PCR产物测序。序列比对结果显示, 3处潜在脱靶位点处均为单峰, 排除脱靶(图4)。

2.5 Western blot检测稳定敲除*VPS34*基因的A549/293T细胞系对自噬的影响

采用 Western blot分析 A549-KO-*VPS34*、293T-KO-*VPS34*细胞样品LC3-I、LC3-II和P62蛋白的表达情况。结果显示, 与对照相比, 敲除*VPS34*基因的单克隆细胞中P62大量累积, LC3-I型向LC3-II

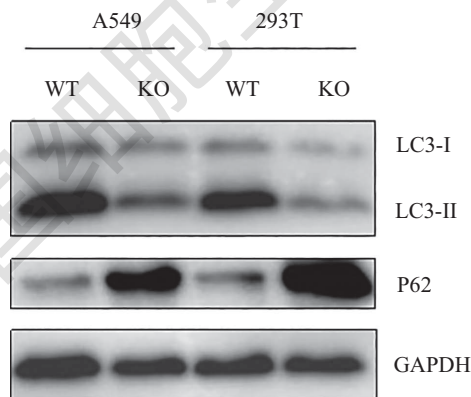


sgRNA潜在脱靶位点PCR产物测序, 单峰排除脱靶。

Sequencing PCR product of the potential sgRNA off-target site, and the sole peak indicates the possibility of off-target is excluded.

图4 sgRNA脱靶效应检测

Fig.4 Detect the off-target effects of sgRNA



WT: 对照组; KO: *VPS34*基因敲除组。

WT: control group; KO: *VPS34* gene knockout group.

图5 敲除*VPS34*基因对细胞系中内源性LC3-I、LC3-II和P62的影响

Fig.5 The effect of knockout-*VPS34* gene on the levels of LC3-I, LC3-II and P62

转化显著减少, 说明*VPS34*敲除后能抑制细胞自噬的发生(图5)。

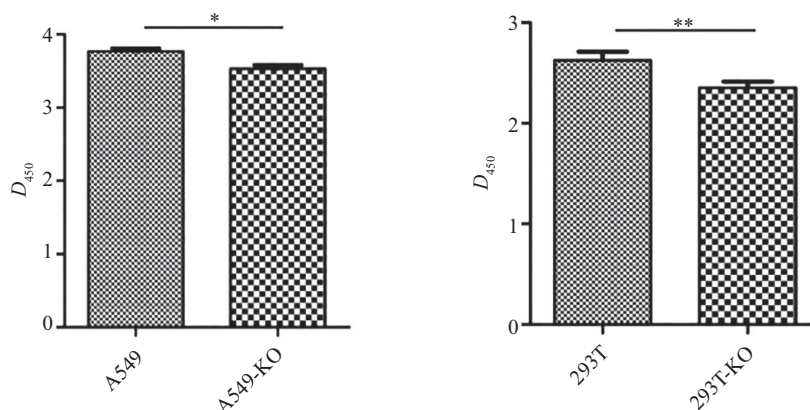
2.6 CCK-8法检测细胞增殖

我们采用CCK-8方法对*VPS34*基因敲除后细胞的增殖活力进行了检测, 然后对数据进行统计学分析。结果发现, 与对照组相比, A549-KO-

VPS34 ($P < 0.05$)细胞和293T-KO-*VPS34* ($P < 0.01$)细胞的增殖活力显著降低。结果说明, *VPS34*基因敲除后能抑制细胞增殖活力(图6)。

3 讨论

*VPS34*蛋白序列在不同生物中具有高度的保



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 CCK-8法细胞增殖活力检测

Fig.6 Detection of cell proliferation activity by CCK-8

守性, 参与调控细胞多种重要的生理过程。到目前为止, *VPS34*在哺乳动物细胞中的功能已经被广泛研究。在哺乳动物中, *VPS34*参与两种复合物的形成: 复合物I和复合物II。复合物I(由*VPS34*、*p150*、*Beclin1*和*Atg14L*构成)激活自噬; 复合物II(由*VPS34*、*p150*、*Beclin1*和*UVRAG/Vps38*组成)调节晚期核内体的运输^[11]。*VPS34*在内吞作用以及TOR激活过程中也发挥着重要的作用^[12-13]。

CRISPR序列本来是细菌抵御病毒入侵的防御机制, 经过科学家的改造, 已经成为基因编辑的又一有力武器。本实验中, 我们利用CRISPR/Cas9系统完成对A549/293T细胞*VPS34*基因的靶向性敲除。获得稳定敲除*VPS34*基因的A549和293T细胞系后, 预测潜在脱靶位点, 抽取细胞基因组DNA, 进行PCR产物测序。结果显示, sgRNA潜在脱靶位点处均为单峰, 且序列没有被修改, 因而可以排除脱靶效应。通过Western blot技术检测*VPS34*基因敲除细胞系中自噬水平的变化。实验结果显示, 自噬底物P62能够大量累积, LC3-I型向LC3-II型的转化被显著抑制, 说明*VPS34*基因敲除能够抑制细胞自噬的发生, 从而验证了*VPS34*在细胞自噬中的重要作用。

293T细胞被广泛用于逆转录病毒生产、基因表达和蛋白生产, 也可以作为普通的哺乳细胞用于筛选稳定表达的细胞系。基于这些优点, 本实验在293T细胞中敲除*VPS34*基因, 有助于自噬相关信号通路的细胞功能研究。

1998年, Foster等^[14]发现, A549细胞可用II型肺上皮细胞模型作为药物代谢的体外模型。A549细胞的分子结构以及感染后细胞因子的分泌更接近

活体感染试验, 可以成为替代模拟人呼吸道感染的良好模型, 弥补流感病毒研究过程中缺乏人体真实模型的缺点。A549细胞后来被广泛应用于哮喘、过敏和呼吸道感染的细胞模型。自噬途径被认为是宿主防御能力的组成部分, 越来越多的证据表明, 自噬机制已经被某些病毒利用, 其中就包括流感病毒^[15]。因此, 本研究构建的*VPS34*基因敲除的A549细胞系, 为研究自噬在流感病毒感染细胞中的作用提供工具。由于A549细胞来源于人的肺泡癌细胞, 本文运用CCK-8法, 检测到*VPS34*基因敲除后A549细胞增殖活力受到抑制。因此, *VPS34*基因的敲除可能对癌症细胞的增殖有一定的抑制作用, 今后可能成为很好的抑制肿瘤生长的潜在药物靶标, 这为抗肿瘤药物的研发提供一定的理论依据。Western blot检测结果发现, *VPS34*基因敲除细胞的自噬水平降低。因此, 我们猜测, *VPS34*基因敲除后对A549细胞生长的抑制作用可能是通过抑制细胞自噬来发挥的, 但仍需进一步的研究探索。综上所述, 本文构建的*VPS34*基因敲除细胞系除了为自噬通路研究提供工具外, 还可为研究自噬在流感病毒感染细胞中的作用提供工具。

参考文献 (References)

- 1 Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 2013; 10(10): 957-63.
- 2 Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; 290(5497): 1717-21.
- 3 Mizushima N. Autophagy: process and function. *Gene Dev* 2007; 21(22): 2861-73.
- 4 Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *Semin Immunopathol* 2010; 32(4): 383-96.

- 5 Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *New Engl J Med* 2013; 368(7): 651-62.
- 6 Qian HR, Yang Y. Functional role of autophagy in gastric cancer. *Oncotarget* 2016; 7(14): 17641-51.
- 7 Ho TT, Warr MR, Adelman ER, Lansinger OM, Flach J, Verovskaya EV, *et al.* Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* 2017; 543(7644): 205-10.
- 8 Volinia S, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Macdougall LK, Stein R, Zvelebil MJ, *et al.* A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J* 1995; 14(14): 3339-48.
- 9 Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2001; 152(3): 519-30.
- 10 Su H, Yang F, Wang Q, Shen Q, Huang J, Peng C. VPS34 acetylation controls its lipid kinase activity and the initiation of canonical and non-canonical autophagy. *Mol Cell* 2017; 67(6): 907-921.e7.
- 11 Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 2008; 19(12): 5360-72.
- 12 Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci* 2006; 119(2): 259-70.
- 13 Tabata K. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 2009; 11(6): 385-96.
- 14 Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res* 1998; 243(2): 359-66.
- 15 Dreux M, Chisari FV. Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle* 2010; 9(7): 1295.