

Endoplazmik retikulum-aracılı protein yıkım yolağında görev yapan p97/VCP ve Ufd1-Npl4 adlı proteinlerin NF-κB yolağına etkisinin prostat kanser hücre hattında incelenmesi

Investigating the effect of p97/VCP and Ufd1-Npl4 proteins functioning in the endoplasmic reticulum-associated degradation on the NF-κB pathway

Petek Ballar Kırmızıbayrak¹ Burcu Erbaykent Tepedelen²

¹Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bursa, Türkiye

Öz

Amaç: Bu çalışmada, endoplazmik retikulum-aracılı yıkım yolağındaki retrotranslokasyon basamağının anahtar proteini olan p97/VCP ve etkileşim partnerleri olan Ufd1 ve Npl4 proteinlerinin NF-κB yolağı üzerine etkileri prostat kanser hücre hattında incelendi.

Gereç ve Yöntem: p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 ifadeleri RNA interferans RNAi (RNA interferans) teknolojisi ile LNCaP hücrelerinde susturuldu ve NF-κB aktivitesi ikili lusiferaz yöntemi ile NF-κB yolağı proteinlerinin ifadesi ise immünoablottlama ile değerlendirildi.

Bulgular: p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 ifadelerinin susturulması LNCaP hücrelerinde NF-κB aktivitesini anlamlı olarak azaltmış ve IκBα protein seviyesini arttırırken fosforile NF-κB ve fosforile IκBα seviyelerini azaltmıştır.

Sonuç: Retrotranslokasyon kompleks üyelerinin susturulması ile LNCaP hücrelerinde NF-κB aktivitesinin azalmasının NF-κB inhibitörü olan IκBα seviyesinin artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bulgularımız p97/VCP ve etkileşim partnerleri Ufd1-Npl4 proteinlerinin prostat kanserinde NF-κB yolağının düzenlenmesinde önemli bir etken olabileceğini önermektedir.

Anahtar Sözcükler: Endoplazmik retikulum ilişkili yıkım yolağı, retrotranslokasyon, p97/VCP, NF-κB, prostat kanseri.

Abstract

Aim: In this study, the effects of p97/VCP and its interacting partners Ufd1 and Npl4 proteins, which function at the retrotranslocation step of endoplasmic reticulum-associated degradation were investigated on the NF-κB pathway in the prostate cancer cell line.

Materials and Methods: The expressions of p97/VCP, Ufd1 and Npl4 were silenced in LNCaP cells using RNAi (RNA interference) technology. NF-κB activity was evaluated by dual luciferase assay system and the expression of NF-κB pathway proteins were investigated using immunoblotting.

Results: Silencing of expression of p97/VCP, Ufd1 and Npl4 significantly diminished NF-κB activity and increased the level of IκBα protein while decreased phosphorylated NF-κB and phosphorylated IκBα levels in LNCaP cells.

Conclusion: The decrease NF-κB activity upon silencing the expressions of retrotranslocation complex members in LNCaP cells might be associated with the increased level of NF-κB inhibitor IκBα. Our data suggests that p97/VCP and its interacting partners might be important factors on the regulation of NF-κB pathway in the prostate cancer.

Keywords: Endoplasmic reticulum-associated degradation, retrotranslocation, p97/VCP, NF-κB, prostate cancer.

Yazışma Adresi: Petek Ballar Kırmızıbayrak

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı,
İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 30.05.2017 Kabul Tarihi: 03.07.2017

Giriş

Endoplazmik retikulum (ER), sekresyonel veya endositik yolağa girecek olan proteinlerin sentez edildiği ve olgunlaştığı yerdir (1). ER'nin ana görevlerinden bir tanesi yeni sentezlenen polipeptid yapıların doğal konformasyonlarına katlanarak ulaşmasını sağlamak ve gerekliyse oligomerik yapıya dönüşmelerine yardımcı olmaktır (2). Ancak uygun katlanma süreci hatasız değildir ve yeni sentezlenen proteinlerin yaklaşık %30'unun yanlış katlandığı tahmin edilmektedir (3). Bu miktar hipoksi, protein agregatları, genetik mutasyon ve oksidatif stres gibi etkenlerle daha da artmaktadır (4). Bu tarz yanlış katlanmış proteinler ER'de kalmakta ve ER-aracılı yıkım yolağı (*ER-associated degradation*, ERAD) ile yıkıma uğramaktadır. ERAD'ın düzenli çalışması sayesinde sadece düzgün katlanmış ve oligomerize olmuş proteinler fonksiyon yapacağı yere ulaşabilirler. ERAD mekanizması istenmeyen bu proteinlerin yıkımı yanı sıra, normal katlanmış bazı hücrel proteinlerin düzeylerini regüle ederek hücre homeostazında da görev yapar. Bu proteinlere kolesterol metabolizmasındaki anahtar enzim olan HMG-KoA redüktaz ve sodyum klorür kanal proteini olan kistik fibröz transmembran iletim regülatörü (CFTR) örnek verilebilir. Dolayısıyla ERAD yolağındaki bozuklukların kistik fibrozis, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve kanser gibi hastalıkların patofizyolojisinde yer alması şartırcı değildir (2).

Retrotranslokasyon, ERAD'ın en önemli basamaklarından biri olup bu basamakta yıkıma hedeflenen proteinler ER membranından sitoplazmada bulunan proteazoma aktarılır. Retrotranslokasyonun anahtar proteini p97/VCP adlı bir ATPaz'dır. Ökaryot hücrelerde en bol bulunan proteinlerden biri olan p97/VCP proteini, ERAD dışında transkripsiyonel kontrol, homotipik membran füzyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi, otofaji, endozomal ayrıştırma, hücre siklüs düzenlenmesi ve protein yıkımının düzenlenmesi gibi değişik hücrel süreçlerde de görev yapmaktadır (5,6). p97/VCP'nin bu fonksiyonel çeşitliliği etkileşime girdiği Ufd1-Npl4, p47, SVIP, UBXD7 gibi 40'dan fazla adaptör protein varlığı ile açıklanmaktadır. Bu etkileşimler p97/VCP ve adaptör proteinde bulunan spesifik protein domainlerine bağlı olarak gerçekleşmektedir.

p97/VCP'nin ERAD yolağındaki temel partnerleri Ufd1-Npl4 dimer kompleksidir. Bu kompleksin, ERAD substratları dışında HIF1 α , Cdt1 ve CD4 gibi çeşitli proteinlerin yıkımını da regüle ettiği rapor edilmiştir (7-9). Son yıllarda p97/VCP tarafından regüle edilen yollar arasında NF- κ B yolağının da bulunduğu düşünülmektedir. Heterodimerik transkripsiyon faktörlerinden biri olan NF- κ B; inflamasyon, hücre bölünmesi ve

apoptozu kontrol eden yüzlerce genden oluşan gen ağlarını kontrol etmektedir. Uyarılmanın olmadığı durumlarda, bu transkripsiyon faktörleri, inhibitor I κ B ailesi üyelerine bağlı olarak sitoplazmada inaktif halde tutulmaktadır. TNF α gibi sitokinler, enfeksiyon yapıcı ajanlar ve hücrel stres koşulları ile bu sistem uyanılmakta ve I κ B molekülleri fosforillendikten sonra poliubikitine olup proteazom tarafından yıkılmaktadır. Böylelikle serbest kalan NF- κ B dimerleri nükleusa relokale olarak inflamatuvar yanıt, proliferasyon, apoptoza karşı koruma gibi işlevlere dahil olan çeşitli hedef genlerin spesifik promotör ve *enhansir* bölgelerine bağlanıp transkripsiyonlarını aktiflemektedir (10,11). p97/VCP'nin NF- κ B inhibitörü olan I κ B α 'nın kompleksten ayrılmasında ve proteazomal yıkımda önemli rolü olduğu düşünülmektedir (6). Dolayısıyla p97/VCP'nin artan düzeylerinin I κ B α seviyesinin azalmasına ve NF- κ B aktivitesinin artmasına neden olduğu önerilmektedir.

Yeni yayınlanan bir çalışmamızda ERAD'ın androjene bağımlı regülasyonunu ve prostat kanser tümörigenezindeki rolü rapor edilmiştir (12). Bu makalemizden yola çıkarak Huntington ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, kistik fibröz, çeşitli kanser tipleri ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların patolojisi ile ilişkilendirilmiş ERAD'ın anahtar proteinlerinden olan p97/VCP'nin ve onun ERAD ilişkili partnerleri olan Ufd1-Npl4 dimerinin ifadesinin susturulmasının NF- κ B yolağına etkisi, prostat kanser hücre hattı olan LNCAP hücrelerinde ilk defa incelenmiştir. Sonuçlarımız hem p97/VCP hem de etkileşim partnerlerinden Ufd1-Npl4 dimerinin susturulması ile I κ B α protein seviyesinde artışın ve NF- κ B aktivitesinde azalışın olduğunu göstermektedir.

Gereç ve Yöntem

Hücre kültürü ve siRNA ile transfeksiyon

Bu çalışmada *American Type Culture Collection* (ATCC)'den temin edilmiş olan erken pasaj numarasına sahip (pasaj no \leq 14) LNCaP (insan prostat adenokarsinoma hücre hattı) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler %10 FBS içeren RPMI1640 besiyerinde konvansiyonel hücre kültürü koşullarında büyütülmüştür.

Silencer® *Negative Control* siRNA #1, p97/VCP (anti-sense dizi: AUAACAAUCACAUGUGCCctc), Ufd1 (anti-sense dizi: GUUAAGUCGGCUGAGUUGGtc), Npl4 (anti-sense dizi: UAAGUACCCAAUUGCUGGtt) oligonükleotidleri Ambion'dan temin edilmiştir. İmmünoblotlama çalışmalarında altı kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekilen hücreler, ekimden 24 saat sonra, 60 nM oligonükleotid dizisi ile toplam 72 saat süreyle transfekte edilmiştir. Transfeksiyon işlemi

Lipofectamin 2000 reaktifi (Invitrogen) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

İmmünoyoblotlama

İmmünoyoblotlama çalışmaları daha önce rapor edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (5). Kısaca LNCaP hücreleri deneysel uygulamalar sonrası proteazom inhibitör kokteyli içeren RIPA tampon çözeltisi (50 mM Tris-HCl pH 7.5 içinde 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, %0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS) ile lizatlanmıştır. Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları BCA Protein Assay kiti (PIERCE, Rockford, IL, USA) ile tayin edildikten sonra eşit konsantrasyonda protein içeren örnekler SDS-PAGE uygulaması için jellere yüklenmiştir. Örnekler, elektroforezi takiben jelden PVDF membrana (Millipore, Bedford, MA, USA) transfer edilmiştir. İmmünoyoblotlama anti-VCP, anti-Ufd1, anti-Npl4, anti-NFκB, anti-p-NFκB, anti-IκBα ve anti-p-IκBα (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA) ve yükleme kontrolü olarak anti-aktin (Sigma Aldrich, USA) antikoları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçların görüntülenmesi için ECL substrat kiti (BioRAD, USA) üretici talimatına uygun olarak kullanılmıştır. Kemilüminesan ışık oluşumu Fusion-FX7 görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, France) ile incelenmiştir.

NF-κB aktivitesinin tayini

NF-κB aktivitesinin tayini için *Signal NF-κB Reporter Assay* kiti (SABiosciences) üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak uygulanmıştır. Kısaca, LNCaP hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına her kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ertesi gün 2 nM konsantrasyonda *Silencer® Negative Control* veya ERAD gen siRNA oligonükleotidleri ile birlikte 100 ng *Signal Raportör* veya *Signal Negatif Kontrolü*, Lipofectamin 2000 (Invitrogen) kullanılarak transfekte edilmiştir. Hücre besiyeri 24 saat sonra değiştirilmiştir. Transfeksiyonlar altı tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve hücreler transfeksiyondan 72 saat sonra toplanmıştır. Lusiferaz aktivitesi ölçümü için "*Dual-Luciferase Reporter Assay*" kiti (Promega) ve lüminometre fonksiyonu olan multiplaka okuyucu (Varioskan, Thermo) kullanılmıştır. Elde edilen değerler Renilla lusiferazına normalize edilmiştir.

İstatistiksel analiz

Veriler "ortalama değer ± standart sapma" olarak sunulmuştur. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS programında yapılmıştır. Sayısal verilerin dağılımının normale yakın olup olmadığı *Shapiro-Wilk* testi ile varyansların homojenliği ise *Levene* testi ile araştırıldı. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farklılıklar, Tek Yönlü Varyans Analiz (One Way ANOVA) *post hoc Bonferroni* testi kullanılarak

değerlendirilmiştir. Anlamlılık sınırı 0.05 olarak alınmış ve anlamlı çıkan örneklerde p değerleri sunulmuştur.

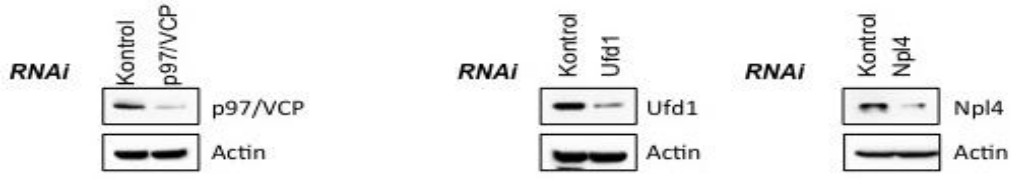
Bulgular

Androjene-duyarlı prostat kanser hücre hattı olan LNCaP hücrelerinde p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 proteinlerinin rolünü incelemek üzere *RNA interference* (RNAi) teknolojisi kullanarak ilgili proteinleri şifreleyen genlerin ifadeleri susturulmuştur. Şekil-1'de sunulan immünoyoblot verilerine göre ilgilene proteinlerin seviyeleri başarılı bir şekilde azalmıştır. Bir sonraki aşamada, p97/VCP, Ufd1 veya Npl4 seviyesi susturulmuş LNCaP prostat kanser hücrelerinde NF-κB aktivitesine etkisinin değerlendirilmesi için dual lusiferaz aktivite analizi uygulanmıştır. Aldığımız sonuçlara göre hem p97/VCP hem de ERAD etkileşim partnerleri olan Ufd1 ve Npl4'un ifadelerinin susturulması ile "relatif lusiferaz aktivitesi" anlamlı bir şekilde azalmıştır (*p=0.001, **p=0.006, ***p=0.018) (Şekil-2). Etkinin spesifikliğini ve raportör aktivitenin bazal değerini gözlemlemek için negatif kontrol olarak herhangi bir transkripsiyonel yanıt elementi içermeyen-indüklenmeyen raportör konstraktı ve sürekli Renilla lusiferaz ifade eden konstrakt karışımı kullanılmıştır. Şekil-2'de görüldüğü üzere incelenen ERAD genlerinin susturulması, negatif kontrol örneklerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

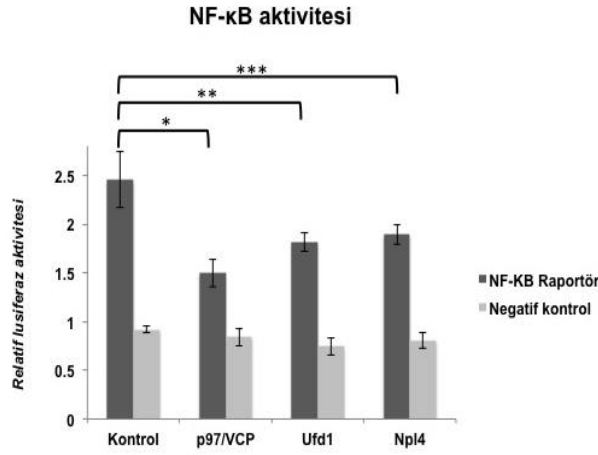
Son olarak ERAD retrotranslokasyon kompleks üyelerinin susturulmasının IκBα ile NF-κB protein seviyelerinin yanı sıra bunların fosforile formları olan p-IκBα ve p-NFκB seviyelerine etkisi, SDS-PAGE'i takiben uygulanan immünoyoblotlama ile incelenmiştir (Şekil-3). İncelenen bu üç genin de ifadesinin susturulması ile IκBα seviyesi artmış iken, p-IκBα ve p-NFκB seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir.

Tartışma

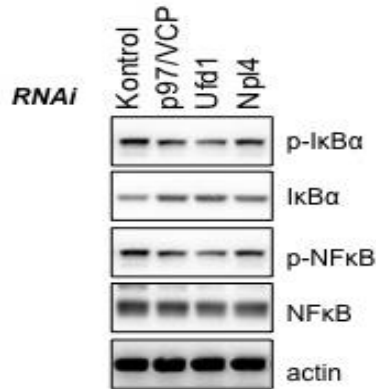
Hücre içi protein yıkım yollarından bir tanesi ubiquitin-aracılı proteazomal yıkımdır. ER-aracılı yıkım yolağı (ER-associated degradation, ERAD) ise ER'den sekrete olan yanlış katlanmış, oligomerize olamamış proteinler ile HMG-KoA redüktaz gibi bazı normal proteinlerin proteazom aracılı yıkımından sorumludur. ERAD; hedef proteinin seçimi, ubiquitinasyon, retrotranslokasyon ve proteazomal yıkım gibi birden fazla basamaktan oluşmaktadır. Retrotranslokasyonda görev yapan temel protein bir ATPaz olan p97/VCP olup etkileşim partnerlerinin çeşitliliği sayesinde hücrede birden fazla fonksiyonu bulunmaktadır. Bu partnerlerden bir tanesi Ufd1-Npl4 dimeri olup p97/VCP-Ufd1-Npl4 kompleksi temel olarak ERAD'da görev yapmaktadır. Bu kompleks CD3δ gibi ERAD substratlarının yıkımından sorumlu olmakla beraber HIF1α gibi bazı ERAD substratı olmayan proteinlerin yıkımı ile de ilişkilendirilmiştir (9).



Şekil-1. LNCaP hücre hattında p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 ifadelerinin RNAi ile susturulması. LNCaP hücreleri altı kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten 24 saat sonra p97/VCP, Ufd1 ve Npl4'a karşı siRNA oligonükleotid molekülleri ile 60 nM konsantrasyonda olacak şekilde transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler lizatlanıp SDS-PAGE'i takiben immünoiblotlamaya tabi tutuldu. p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 proteinlerinin seviyesi bu proteinlere karşı antikolar kullanılarak tayin edildi. Aktin yüklemeye kontrolü olarak değerlendirildi.



Şekil-2. Retrotranslokasyon kompleks üyelerinin susturul-ması LNCaP hücrelerinde NF-κB aktivitesini azaltır. p97/VCP, Ufd1 ve Npl4'a ifadelerini susturmak için siRNA oligonükleotidleri NF-κB rapörtör veya negatif kontrol konstraktı ile birlikte transfekte edildi. Lusiferaz aktivitesinin tayini "Gereç ve Yöntemler" bölümünde açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Deney, altı kere tekrar edilmiştir ve veriler "ortalama değer ± standart sapma" olarak sunulmuştur (*p=0.001, **p=0.006, ***p=0.018).



Şekil-3. LNCaP hücrelerinde p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 ifadelerinin susturulması ve immünoiblotlama Şekil-1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. NFκB, p-NFκB, IκBα ve p-IκBα proteinlerinin seviyesi bu proteinlere karşı antikolar kullanılarak tayin edildi. Aktin yüklemeye kontrolü olarak değerlendirildi.

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar özellikle p97/VCP'nin NF-κB yolağını regüle ettiğini önermektedir. 2013 yılında ise p97/VCP susturulmuş U2OS osteosarkoma hücrelerinde NF-κB aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (13). Benzer şekilde sıçan neonatal kardiyomyositlerde p97/VCP'nin adenovirus teknolojisi ile aşırı ifade sonucunda NF-κB'nin DNA bağlanma kabiliyetinin dolayısıyla NF-κB aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (14). 2014 yılında 293HEK ve U2OS hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise tümör nekrozis faktör alfa (TNF-α) veya interlökin 1B (IL-1β) uygulaması sonrası IκBα yıkımının regülasyonunda p97/VCP-Ufd1-Npl4 kompleksinin rol oynadığı belirlenmiştir (15). p97/VCP'nin NF-κB aktivitesinde yaptığı değişikliğin mekanizmasını inceleyen makalelerin bir tanesinde p97/VCP'nin IκBα yıkımını epitelyal hücrelerde uyardığı belirtilmiştir (16). p97/VCP-Ufd1-Npl4 kompleksinin alternatif NF-κB yolağını pozitif olarak regüle ettiği de farklı bir mekanizma önerisi olarak rapor edilmiştir. Bu makalede, NF-κB yolağının major inhibitörü olan p100'ün p52'ye yıkımının uyarıldığı önerilmiştir (17).

Yakın zamanda ERAD'ın androjen-duyarlı prostat kanser hücrelerinde androjen ile regüle olduğunu ve bu regülasyonun prostat kanser tümörigenezinde rol

oynadığını rapor ettik (12). Bu çalışmada ise ERAD retrotranslokasyon kompleks üyeleri p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 adlı proteinlerin prostat kanser hücrelerinde NF-κB aktivitesi üzerine etkisi ve bunun mekanizması incelenmiştir. Bulduğumuz sonuçlara göre ilgililenen üç proteinin ifadelerinin susturulması ile NF-κB aktivitesi anlamlı bir şekilde artmıştır. NF-κB yolağının önemli üyeleri olan NF-κB, p-NFκB, IκBα ve p-IκBα seviyelerini incelediğimizde ise IκBα'nin seviyesinin arttığını ancak p-IκBα ve p-NFκB seviyelerinin azaldığını gözlemledik. Dolayısıyla ERAD retrotranslokasyon kompleks üyesi proteinlerinin NF-κB yolağını LNCAP prostat kanser hücrelerinde regüle ettiğini önermekteyiz. Bulgularımız p97/VCP ve etkileşim partnerleri Ufd1-Npl4 proteinlerinin prostat kanserinde NF-κB yolağının düzenlenmesinde önemli bir etken olabileceğini düşündürmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, 114S062 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir. Projeye bazı cihazların kullanımı ile destek veren Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'na (FABAL) ve katkılarından dolayı Dr. Yalçın Erzurumlu'ya teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Ahner A, Brodsky JL. Checkpoints in ER-associated degradation: Excuse me, which way to the proteasome? Trends Cell Biol 2004;14(9):474-8.
2. Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: The long road to destruction. Nat Cell Biol 2005;7(8):766-72.
3. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. Nat Struct Mol Biol 2009;16(6):574-81.
4. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature 2003;426(6968):895-9.
5. Erzurumlu Y, Kose FA, Gozen O, Gozuacik D, Toth EA, Ballar P. A unique IBMPFD-related P97/VCP mutation with differential binding pattern and subcellular localization. Int J Biochem Cell Biol 2013;45(4):773-82.
6. Fessart D, Marza E, Taouji S, Delom F, Chevet E. P97/CDC-48: Proteostasis control in tumor cell biology. Cancer Lett 2013;337(1):26-34.
7. Magadán JG, Pérez-Victoria FJ, Sougrat R, Ye Y, Strelbel K, Bonifacino JS. Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps. PLoS Pathog 2010;6(4):e1000869.
8. Kahn M, Sugawara H, McGowan P, et al. CD4+ T cell clones specific for the human p97 melanoma-associated antigen can eradicate pulmonary metastases from a murine tumor expressing the p97 antigen. J Immunol 1991;146(9):3235-41.
9. Alexandru G, Graumann J, Smith GT, Kolawa NJ, Fang R, Deshaies RJ. UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1a- turnover. Cell 2008;134(5):804-16.
10. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappa B signaling. Immunol Rev 2006;210(1):171-86.
11. Israel A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2(3): a000158.
12. Erzurumlu Y, Ballar P. Androgen mediated regulation of endoplasmic reticulum-associated degradation and its effects on prostate cancer. Sci Rep 2017;16(7):40719.
13. Asai T, Tomita Y, Nakatsuka S, et al. VCP (p97) regulates NFkappaB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line. Jpn J Cancer Res 2002;93(3):296-304.
14. Lizano P, Rashed E, Kang H, et al. The valosin-containing protein promotes cardiac survival through the inducible isoform of nitric oxide synthase. Cardiovasc Res 2013;99(4):685-93.
15. Li JM, Wu H, Zhang W, Blackburn MR, Jin J. The p97-UFD1L-NPL4 protein complex mediates cytokine-induced IκBα proteolysis. Mol Cell Biol 2014;34(3):335-47.
16. Schweitzer K, Pralow A, Naumann M. p97/VCP promotes Cullin-RING-ubiquitin-ligase/proteasome-dependent degradation of IκBα and the preceding liberation of RelA from ubiquitinated IκBα. J Cell Mol Med 2016;20(1):58-70.
17. Zhang Z, Wang Y, Li C, et al. The transitional endoplasmic reticulum ATPase p97 regulates the alternative nuclear factor NF-κB signaling via partial degradation of the NF-κB subunit p100. J Biol Chem 2015;290(32):19558-68.