

小鼠泛素结合酶 UBE2W 的抗体制备及组织表达谱分析

张莹莹, 朱恒奇, 赵莉霞, 周晓巍, 黄培堂

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

摘要: 泛素结合酶(E2)是蛋白泛素化修饰所需的第二个连接酶, 在泛素转移和底物特异性识别过程中发挥着重要作用。UBE2W 是一种新发现的 E2 酶, 其果蝇属同源蛋白可能在光转导或视网膜变性过程中发挥作用, 鼠和人同源蛋白功能未见报道。生物信息学分析 UBE2W 鼠源氨基酸序列, 发现 UBE2W 具有典型的 UBC 结构域并在多种物种高度保守。通过构建 UBE2W 原核表达质粒, 在大肠杆菌中表达并纯化了 GST-UBE2W 融合蛋白。以此纯化蛋白作为抗原免疫新西兰白兔制备抗 UBE2W 多抗血清, 并利用制备的 UBE2W 抗原柱亲和纯化 UBE2W 多抗。为了检测纯化抗体特异性, 在真核细胞中瞬时表达了 myc-UBE2W 融合蛋白, 分别用 myc 单抗和 UBE2W 多抗进行 Western blotting 分析, 结果表明获得了特异性的 UBE2W 抗体。利用此特异性抗体在小鼠脑、心脏、肾脏、肝脏、肺、肌肉、脾脏和睾丸等组织中均检测到了 UBE2W 的表达, 且在小鼠睾丸中成年期表达最高。

关键词: 泛素结合酶, UBE2W, 抗体, 组织表达谱

Generation of Mouse UBE2W Antibody and Analysis of UBE2W Expression in Mouse Tissues

Yingying Zhang, Hengqi Zhu, Lixia Zhao, Xiaowei Zhou, and Peitang Huang

Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Abstract: Ubiquitin conjugating enzyme functions as the second enzyme required for protein ubiquitination and plays an important role in ubiquitin transferring and substrate specific recognition. UBE2W, a newly described member of E2 family, was formerly reported probably involving in phototransduction or retinal degeneration in *Drosophila*. In this study, we report that murine UBE2W harbors a typical UBC domain and is highly conserved in different vertebrate homologues. GST-tagged UBE2W was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified with GST affinity chromatography. Using this antigen, we generated and further separated rabbit polyclonal antibody of UBE2W, of which the activity and specificity were confirmed by immunoblotting of transiently expressed myc-UBE2W fusion protein. Wide expression of UBE2W was found in brain, muscle, heart, lung, liver, spleen, kidney and testis of mouse with the generated antibody, indicating the functional importance of this novel protein. Furthermore, the UBE2W highly expression was confined to the adult testis and was developmental stage-specific.

Keywords: ubiquitin conjugating enzyme, UBE2W, antibody, tissue expression profile

蛋白泛素化是真核细胞内广泛存在的一种蛋白翻译后修饰方式, 其在多种生物途径中发挥重要作用

, 如基因表达调控、细胞周期调控、DNA损伤修复及细胞凋亡等^[1-4]。蛋白泛素化需要一系列泛素相

Received: August 15, 2007; **Accepted:** September 18, 2007

Supported by: the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30470379).

Corresponding author: Xiaowei Zhou, Peitang Huang. Tel: +86-10-66948832; E-mail: amms832@126.com

国家自然科学基金项目(No. 30470379) 资助。

关酶的参与^[5,6]。首先,在消耗ATP情况下,泛素激活酶(E1 酶)半胱氨酸活性位点与泛素C端甘氨酸(Gly)形成高能硫酯键而活化泛素;然后通过转酯作用将活化的泛素转移至泛素结合酶(E2 酶),并与之形成第二个高能硫酯键;最后,在E2 酶作用下,催化泛素C端的甘氨酸(Gly)与底物蛋白的赖氨酸(Lys) ϵ -氨基基团之间形成异肽键而将泛素转移至底物蛋白。有些E2 酶可以通过其末端结构直接识别底物蛋白,但大多数E2 酶还需要泛素连接酶(E3 酶)的帮助才能将泛素分子转移给底物蛋白。E3 酶可以特异性识别底物蛋白和特定E2 酶,从而直接或间接催化泛素从E2 酶向底物蛋白的转移^[7]。

泛素结合酶是蛋白泛素化修饰所需的第二个连接酶,在各物种中均有发现并高度保守。它们都有一个约150个氨基酸组成的UBC结构域和一保守的活性半胱氨酸,在泛素-E2 酶硫酯键形成中起关键作用^[8]。根据结构的不同,E2 酶一般分作四类^[9]:I类E2 酶仅含有~150aa的核心UBC结构域;II类E2 酶除了含有一个核心UBC结构域外,还具有一个C-末端的延伸结构;III类E2 酶则仅含有一个N末端延伸;IV类E2 酶则同时具有N端和C端延伸结构。这些延伸结构介导了E2 酶的亚细胞定位或(和)特定底物识别^[10,11]。

UBE2W是我们实验室最近鉴定出的一个能够与范可尼贫血蛋白FANCL相互作用的E2 酶,目前仅有果蝇属同源基因 $cg7220$ 于果蝇复眼感光细胞中富集的报道,提示可能在光转导或视网膜变性过程中发挥作用^[12,13]。为进一步研究其功能,本研究对其氨基酸序列进行了初步的生物信息学分析,以推测可能的生物学功能。在此基础上,构建原核表达载体、制备并纯化UBE2W多抗,并检测了UBE2W在小鼠组织中的表达谱。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌DH5 α 、BL21(DE3)及质粒pGEX-6p-1由本室保存;质粒pCMV-myc/ube2w由卢柏松博士构建。

1.1.2 细胞系和实验动物

293FT细胞由本室保存;雌性新西兰白兔购自

军事医学科学院实验动物中心。

1.1.3 工具酶、试剂和抗体

Taq plus DNA聚合酶购自上海生工;限制性内切酶、T4 DNA连接酶购自NEB公司;细胞转染试剂LipofectamineTM 2000 购自Invitrogen公司,GST亲和纯化预装柱GSTrapTM FF、2-D Quant Kit、HRP标记的GST抗体、PVDF膜和ECL显色试剂盒购自Amersham公司,弗氏完全佐剂和不完全佐剂购自SIGMA,抗体亲和纯化试剂盒AminoLink[®] Plus Immobilization Kit 购自PIERCE公司;抗Myc鼠单克隆抗体购自TIANGEN公司,抗 β -actin鼠单克隆抗体、HRP标记的羊抗鼠IgG和羊抗兔IgG购自Santa Cruz公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 UBE2W 氨基酸序列和结构域分析

利用NCBI数据库上BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)软件对UBE2W氨基酸序列进行搜索,得到UBE2W在各物种中的同源蛋白序列,利用蛋白质序列分析软件DNAMAN v5.2.2 对同源序列进行多重序列比对。利用NCBI数据库上CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CDD/>)软件和PDB数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/>)分别对UBE2W蛋白的二级结构和高级结构进行分析,RasMol v2.7.3软件读取蛋白三维结构分子数据文件。

1.2.2 ube2w 基因的扩增

以表1中所列序列为上、下游引物,以质粒pCMV-myc/ube2w为模板,退火温度55 $^{\circ}$ C,常规PCR反应25个循环,扩增出ube2w基因全长。上游引物中加入BamH I位点,下游引物加入Not I位点。

表1 PCR 扩增所用的引物及其序列
Table 1 Primers used for amplification of ube2w

Primers	Sequences
ube2w-BamH IF	5'-CGGGATCCATGGCGTCAATGCAGAAACGACT-3
ube2w-Not IR	5'-TTGCGGCCGCTCAACAAGTGTCATCATGATACCACC-3

1.2.3 表达载体的构建

用BamH I和Not I双酶切PCR产物和pGEX-6p-1载体,琼脂糖凝胶电泳纯化、回收ube2w基因和线性化载体,T4 DNA连接酶16 $^{\circ}$ C连接过夜。连接产物转化大肠杆菌DH5 α ,经克隆筛选,获得插入ube2w片段的pGEX-6P-1/ube2w重组子。挑取单克

隆进行酶切鉴定并测序。

1.2.4 UBE2W 在 BL21(DE3) 中的表达

将测序正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 37°C 培养过夜。挑选转化子, 分别于 25°C 和 37°C 条件下培养细菌至 $OD_{600}=0.8$, 再分别转移至 20°C 和 37°C 条件下, 1 mmol/L IPTG 诱导表达 14 h。离心收集菌体, GST 抗体进行 Western Blotting 检测融合蛋白的表达。以转化了 pGEX-6P-1 空载体的 BL21(DE3) 作为对照。对 25°C 培养、20°C 诱导表达的细菌进行超声破碎, 分别以 3000 g、6000 g 和 12000 g 离心裂解产物 15 min, 收集沉淀和上清, GST 抗体进行 Western blotting 检测融合蛋白以何种形式表达。

1.2.5 表达产物的纯化

收集菌体并重悬于 80 mL PBS 中, 置于冰上超声破碎, 12000 g 离心 15 min 收集上清。在 ÄKTA™ Purifier 蛋白纯化系统上, 将上清以 0.8 mL/min 的速率通过 GST 亲和纯化柱 GStrap™ FF, 用 GST Elution buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, pH 8.0) 进行连续梯度洗脱 GST 融合蛋白。依据系统中 UV₂₈₀ 检测蛋白洗脱曲线收集纯化蛋白, SDS-PAGE 和 Western Blotting 进行检测。纯化蛋白经 Hiprep™ 26/10 Desalting 柱除去谷胱甘肽后, 2-D Quant Kit 测定蛋白浓度。

1.2.6 兔多抗血清的制备和纯化

0.2 mg 纯化蛋白与弗氏完全佐剂混合后, 进行皮下免疫, 以后每隔 3 周, 用 0.1 mg 抗原与弗氏不完全佐剂乳液进行加强免疫, 共进行 4 次, 于每次加强免疫前一周小量抽取兔血进行 ELISA 检测抗体效价。免疫结束后 1 周内, 每天从耳缘静脉取血 10~20 mL, 直至抗体效价下降, 心脏一次完全取血。所有血液立即于 4°C 5000 g 离心 10 min 收获血清。按照 PIERCE 公司抗体纯化试剂盒说明, 将血清与样品缓冲液 (0.025 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2) 等体积混合, 缓缓通过偶联有纯化 GST-UBE2W 融合蛋白的抗原亲和柱, 样品缓冲液洗涤亲和柱后, 加入 8 mL 洗脱缓冲液 (0.1 mol/L Glycine-HCl, pH 3.0) 洗脱抗体。每管收集 1 mL, SDS-PAGE 检测。

1.2.7 UBE2W 多抗特异性检测

在 24 孔细胞培养板中, 用 Lipofectamine 2000 转染真核表达质粒 pCMV-myc/ube2w 0.8 μ g 至 293FT 细胞, 瞬时表达融合蛋白 Myc-UBE2W。50 μ L

1×SDS 上样缓冲液裂解细胞后, 取裂解液 8 μ L 上样, 分别用纯化的 UBE2W 抗体 (1:500) 和 Myc 标签单抗 (1:2000) 进行 Western blotting 检测。以转染了空载体和未转染质粒的细胞为阴性对照, 以 β -actin 为上样量内参照。

1.2.8 UBE2W 在小鼠各组织中的表达谱

脱臼法处死成年雄性昆明小鼠, 取小鼠脑、肾、肝、肺、脾、睾丸 (不同年龄)、心、肌肉等组织, 在预冷的 PBS (pH 7.4) 中剥去血管和筋膜并剪碎组织块, 按 1:1 (g/mL) 比例加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上匀浆 30~40 min。4°C 15000 g 离心 30 min, 吸取上清, 分别用 UBE2W 多抗 (1:125) 和 β -actin (1:2000) 单抗进行 Western blotting 检测。

2 结果

2.1 UBE2W 具有一个典型的 UBC 结构域

BLAST 结果显示, UBE2W 在人、类人猿、猕猴、小鼠、原鸡、非洲蟾蜍、蜜蜂和冈比亚按蚊等种属均存在同源氨基酸序列, 且具有较高的序列一致性, 尤其在人、类人猿、猕猴和小鼠等哺乳动物中相似性高达 90% 以上。CDD 数据库和 PDB 数据库搜索结果, 小鼠源 UBE2W 蛋白中包含着一个典型 UBC 结构域, 其人同源蛋白具有 UBC 典型三维结构, 并在 UBC 结构中存在 1 个保守的活性半胱氨酸 (图 1), 这一般被认为在 E2 酶结合和转移泛素活性中发挥作用。

2.2 表达纯化 UBE2W 抗原

经常规 PCR 扩增, 获得全长约 450 bp 的小鼠 ube2w cDNA 片段 (图 2), 将其插入 pGEX-6p-1 载体, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经不同温度 (25°C 和 37°C) 培养和不同温度 (20°C 和 37°C) 诱导后, GST 和 GST 融合蛋白在 25°C 条件下培养的细菌中获得明显表达 (图 3A)。将 25°C 培养、20°C 诱导表达的细菌进行超声破碎, 经不同转速离心分离细菌裂解悬液各组分, 结果发现目标蛋白在上清和沉淀中均存在 (图 3B)。此结果表明在 25°C 培养、20°C 诱导条件下, UBE2W 在 BL21(DE3) 中获得可溶性表达。

按照优化后表达条件, 大量培养、表达 UBE2W 融合蛋白, 利用 GST 亲和纯化柱 GStrap™ FF 对其进行纯化, 经 10 mmol/L 还原性谷胱甘肽梯度浓度

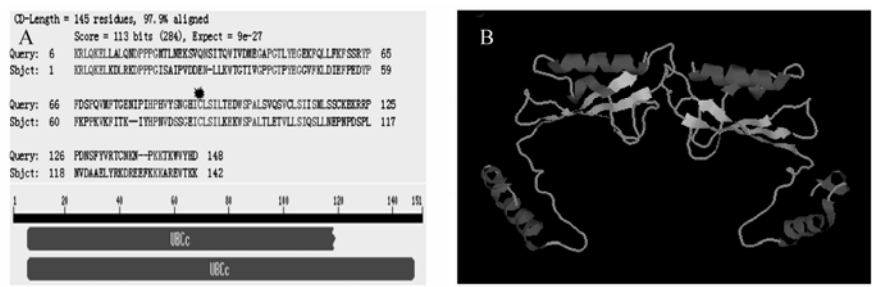


图 1 生物信息学分析 UBE2W 二级结构(A)和高级结构(B)

Fig. 1 Structure of UBE2W

A: UBE2W contains a typical UBC domain and a conserved active cysteine (asterisk) showed in CDD database; B: structural ribbon of UBE2W (the human homologous protein of CG7220) in the RasMol software shows that UBE2W harbors a typical UBC domain

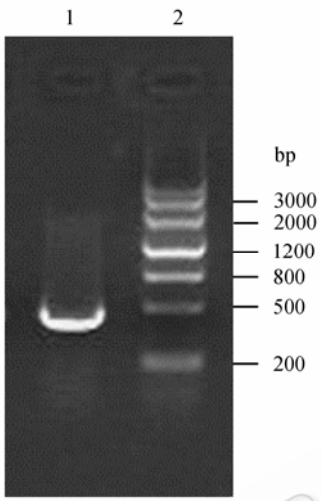


图 2 PCR 扩增 *ube2w* 基因片段

Fig. 2 Amplification of *ube2w* from pCMV-myc/*ube2w*

1: PCR products of *ube2w*; 2: DNA marker

洗脱，获得了纯度较高的UBE2W蛋白，浓度测定为

2.5 mg/mL。SDS-PAGE 和 Western blotting 检测部分样品结果见图 4。

2.3 制备 UBE2W 特异性多抗

抗 UBE2W 多抗血清经抗原亲和柱纯化、SDS-PAGE 分析后，可以清晰看到抗体重链、轻链(图 5)。为检测纯化后 UBE2W 多抗的特异性，分别利用商业化 myc 标签单抗和纯化多抗进行 Western blotting 对在真核细胞中表达的 UBE2W 蛋白进行检测。结果显示，同 myc 标签抗体一样，利用此纯化多抗同样可以在 myc-UBE2W 蛋白预期大小(约 19 kD)处检测到特异条带(图 6)。此结果表明我们获得了特异性较好的 UBE2W 多抗。

2.4 UBE2W 在小鼠组织中广泛表达

利用纯化后的抗 UBE2W 抗体，通过 Western Blotting 方法分析 UBE2W 在小鼠各组织中的表达。结果显示在小鼠各组织中均检测到了与预期大小一

	Cultured in 25℃				Cultured in 37℃			
6P-1	+	-	+	-	+	-	+	-
6P-1/UBCm	-	+	-	+	-	+	-	+
Induced at 20℃	+	+	-	-	+	+	-	-
Induced at 37℃	-	-	+	+	-	-	+	+

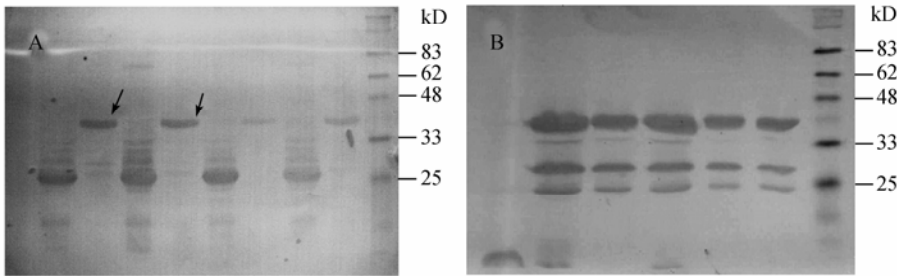


图 3 GST-UBE2W 融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

Fig. 3 GST-UBE2W fusion protein expressed in *E. coli* BL21 (DE3)

A: conditions for expression of GST-UBE2W in BL21 (DE3); M: protein marker; the arrowhead indicates the expressed fusion protein
 B: the formation of GST-UBE2W expressed in BL21 (DE3); 1: BL21; 2: BL21/GST-UBCm; 3: 3000 g precipitation; 4: 6000 g precipitation; 5: 12 000 g precipitation; 6: supernatant; M: protein marker

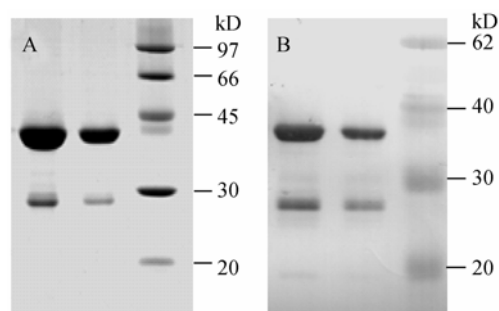


图 4 GST 亲和纯化 UBE2W 融合蛋白

Fig. 4 UBE2W fusion protein purified by GSTrap affinity chromatography

A: SDS-PAGE of purified GST-tagged UBE2W protein; B: Western blotting analysis of purified protein

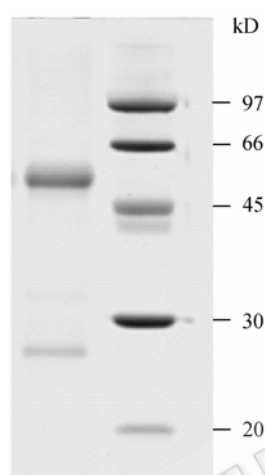


图 5 SDS-PAGE 分析纯化的 UBE2W 抗体

Fig. 5 UBE2W antibody purified by affinity chromatography

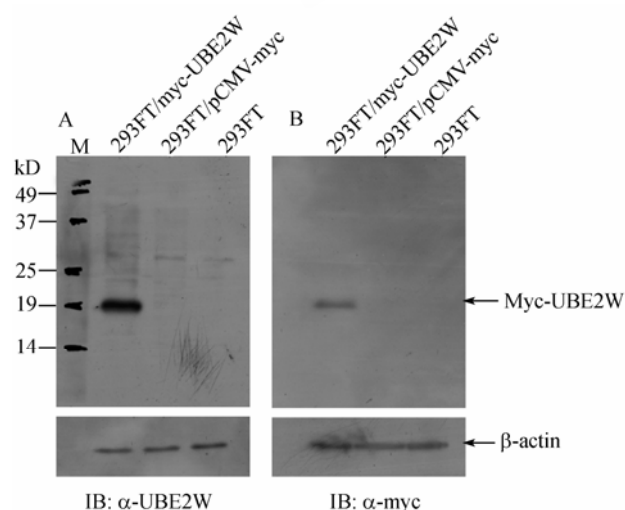


图 6 UBE2W 抗体检测细胞瞬时表达的 UBE2W 蛋白

Fig. 6 High-specificity of UBE2W polyclonal antibody
Myc-UBE2W transiently expressed in 293FT cells was analyzed by immunoblotting with UBE2W antibody (A) and Myc antibody (B); M: protein marker

致的目标条带(图 7), 表明 UBE2W 在小鼠组织中是广泛表达的, 且除睾丸组织外, 在各组织表达量均极低。进一步检测 UBE2W 在小鼠不同发育时期睾丸中的表达, 发现 UBE2W 在睾丸组织中的表达随着年龄的增长而增加(图 8)。

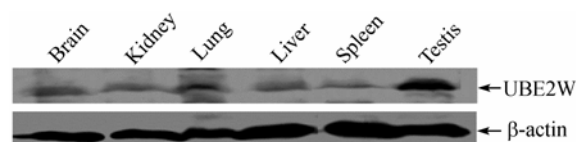


图 7 UBE2W 在小鼠组织中广泛表达

Fig. 7 Extensive expression of UBE2W in mouse tissues

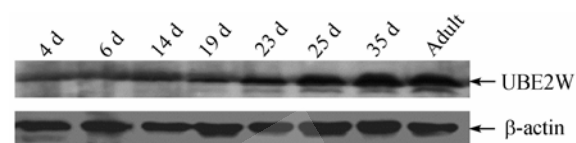


图 8 UBE2W 在小鼠睾丸不同发育时期的表达

Fig. 8 Developmental stage-specificity of UBE2W expression in mouse testis

3 讨论

在蛋白质功能研究中, 抗体是最直接、有效的传统工具。特异性抗体常常用于蛋白质的亚细胞定位分析、抗原在组织或细胞中的表达谱分析以及发现和鉴定与抗原蛋白相互作用的蛋白质等诸多方面^[14]。为了研究UBE2W的功能, 我们利用大肠杆菌表达的鼠源UBE2W融合蛋白免疫新西兰白兔制备多抗血清, 考虑到融合蛋白中GST标签可能在免疫动物过程中对抗体生成造成影响, 我们曾构建了带His标签的UBE2W表达载体, 但在各种诱导表达条件下, 目的蛋白均未获得有效表达。我们曾进行酶切GST标签, 但切除标签后, UBE2W蛋白极易发生沉淀。因此, 我们采用GST-UBE2W融合蛋白直接进行免疫新西兰白兔, 然后利用纯化的GST-UBE2W蛋白制备抗原亲和柱, 以通过抗原亲和纯化制备出高特异性抗体。从对UBE2W抗体的Western blotting特异性检测结果看, UBE2W抗体基本可以同商品化myc标签抗体一样用于UBE2W的Western blotting检测。

生物信息学分析发现, UBE2W在各物种中的同源序列具有较高的序列一致性(>85%), 表明UBE2W在进化上具有高度的保守性。在本研究中,

我们利用制备的特异性抗体,通过Western blotting分析,发现UBE2W在小鼠组织中是广泛表达的,且在睾丸组织中的表达量明显高于其它组织(图7),进一步对不同年龄的小鼠睾丸组织分析发现UBE2W在睾丸组织中的表达随着年龄的增长而增加,成年期表达量增至最高(图8)。已有文献报道,果蝇属同源基因 $cg7220$ 在果蝇复眼感光细胞中富集^[12,13]。这些提示UBE2W可能在参与普遍生命过程的同时也参与某些组织特异的功能发生过程,如生殖细胞发育和光转导或视网膜变性等。生物信息学分析还发现,UBE2W包含一个高度保守的UBC结构域,且无任何末端延伸,提示UBE2W可能是一个I型E2酶。*S. cerevisiae* UBC4/5是I类E2酶的典型代表,并在许多短命蛋白或异常蛋白的泛素依赖性降解中起重要作用^[15],因此UBE2W具有I类泛素结合酶结构提示其可能也在泛素依赖的蛋白降解过程中起作用。*Ube2w*所定位的人8号染色体q21.1区域常常存在基因高度扩增并导致癌症的发生,在*ube2w*基因上下不到15 Mb的范围内存在着TPD家族成员TPD52和PC-1、E3酶WWP1和转录延伸因子B TCEB1等癌基因^[16-18],这些基因的扩增均已证明在癌症的发生发展中起着重要作用。

本研究制备了UBE2W特异性多抗,并检测了UBE2W在小鼠组织中的表达,为研究鼠源和人源UBE2W蛋白的功能及其可能参与的疾病奠定了基础。

致谢 美国Wake Forest University Health Sciences卢柏松博士为本研究提供原始质粒和技术指导,在此表示感谢。

REFERENCES

- [1] Smalle J, Vierstra RD. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**: 555-590.
- [2] Sun LJ, Chen ZJ. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Cell Biology*, 2004, **16**: 119-126.
- [3] Pickart CM. Ubiquitin in chains. *TIBS*, 2000, **25**: 544-548.
- [4] Cheng FK, Cory H, Toyoko T, Karl H, *et al.* Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes and Development*, 2004, **18**: 184-195.
- [5] Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*, 2006, **31**: 137-155.
- [6] Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A, *et al.* The ubiquitin-proteasome. *Nat Med*, 2000, **6**(10): 73-84.
- [7] Robinson PA, Ardley HC. Ubiquitin-protein ligases. *Cell Sci*, 2004, **117**: 5191-5194.
- [8] Cook WJ, Jeffrey LC, Sullivan ML, *et al.* Three dimensional structure of an ubiquitin conjugating enzyme (E2). *J Biol Chem*, 1992, **267**: 15116-15121.
- [9] Cook WJ, Jeffrey LC, Xu Y, *et al.* Tertiary structures of class I ubiquitin-conjugating enzymes are highly conserved: crystal structure of yeast Ubc4. *J Biol Chem*, 1993, **32**: 13809-13817.
- [10] Kolman CJ, Toth J, Gonda DK. Identification of a portable determinant of cell cycle function within the carboxyl-terminal domain of the yeast CDC34 (UBC3) ubiquitin conjugating (E2) enzyme. *EMBO J*, 1992, **11**: 3081-3090.
- [11] Silver ET, Gwozd TJ, Ptak C, *et al.* A chimeric ubiquitin conjugating enzyme that combines the cell cycle properties of CDC34 (UBC3) and the DNA repair properties of RAD6 (UBC2): implications for the structure, function, and evolution of the E2s. *EMBO J*, 1992, **11**: 3091-3098.
- [12] Yang ZY, Edenberg HJ, Davis RL. Isolation of mRNA from specific tissues of *Drosophila* by mRNA tagging. *Nucl Acids Res*, 2005, **33**: e148.
- [13] Xu H, Lee SJ, Suzuki, *et al.* A lysosomal tetraspanin associated with retinal degeneration identified via a genome-wide screen. *EMBO J*, 2004, **23**: 811-822.
- [14] Ed Harlow, David J. Antibodies, A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998, pp. 282-318.
- [15] Seufert W, Jentsch S. Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J*, 1990, **9**: 543-550.
- [16] Wang RX, Xu JC, Outi Saramäki, *et al.* PrLZ, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer. *Cancer Res*, 2004, **64**: 1589-1594.
- [17] Porkka K, Saramäki O, Tanner M, *et al.* Amplification and overexpression of elongin C gene discovered in prostate cancer by cDNA microarrays. *Lab Invest*, 2002, **82**(5): 629-637.
- [18] Chen C, Sun X, Guo P, *et al.* Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene*, 2007, **26**: 2386-2394.