

## VISSZATEKINTÉS AZ ELMÚLT 50 ÉV KIEMELKEDŐ CIKKEIRE

Haracska, L. and Udvardy, A. (1995)  
Cloning and sequencing a non-ATPase subunit  
of the regulatory complex of the *Drosophila* 26S  
protease. *Eur. J. Biochem.*, 231: 720–725.

### A 26S PROTEASZÓMA POLIUBIKVITIN RECEPTOR ALEGYSÉGÉNEK KALANDOS AZONOSÍTÁSA

**Haracska Lajos<sup>1</sup>, Lipinszki Zoltán<sup>2</sup> és Udvardy Andor<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>MTA SZBK, Genetikai Intézet, <sup>2</sup>MTA SZBK, Biokémiai Intézet

#### Összefoglaló

A szabályozott intracelluláris proteolízis a sejt számára aktuálisan sürgős vagy káros fehérjék eltávolítását végzi. A proteolízis irreverzibilis változásokat hoz létre a sejtben, ami a folyamat szigorú szabályozottságát teszi szükségessé. Két független folyamat biztosítja a proteolízis szigorú szelektivitását. Az ubikvitinációs enzim kaskád feladata a bontásra szánt fehérjékben található „degradációs szignálok” felismerése és egy specifikus poszttranszlációs módosítással, a poliubikvitinációval a fehérjék bontásra történő kijelölése. A 26S proteaszóma, az intracelluláris fehérje bontást végző multiprotein enzim komplexum felismeri képes a poliubikvitin láncot, mint bontási szignált, megköti és egy többlépcsős folyamat végeredményeként lebontja a kijelölt fehérjét. A 26S proteaszóma első, és talán legfontosabb feladata a poliubikvitin lánc felismerése és megkötése, így rendelkeznie kell egy olyan alegységgel, amely poliubikvitin receptorként funkcionál. Ennek az alegységnek az azonosítása egy sok éves, kalandos történet. Kezdeti gyors sikernek számított, hogy *in vitro* kötési teszttel magasabbrendű eukariótákban, majd élesztőben is azonosítottak egy alegységet, amely kielégítette egy poliubikvitin receptorral szemben felállított kritériumokat. Problémát jelentett azonban, hogy az élesztő ortológ deléciója nem eredményezett letalitást és a poliubikvitinált fehérjék *in vivo* felhalmozódását – amit a poliubikvitin receptor deléciójától elvártak. Ezek alapján rögtön elvetették még azokat a pozitív eredményeket is, melyeket más eukarió-

ta ortológok tanulmányozásával nyertek és a továbbiakban 6 év kemény munkája kellett annak bizonyítására, hogy a korábban azonosított 26S proteaszóma alegység valamennyi eukariótában poliubikvitin receptorként funkcionál. *Drosophila melanogaster*ben végzett *in vivo* és *in vitro* munkáink ehhez a bizonyítási folyamathoz szolgáltatott új eredményeket.

### **Poliubikvitinált fehérjék szabályozott lebontása**

A sejtek homeosztázisát több különböző, de egymással kölcsönható szabályozó rendszer biztosítja. A legrégebben, és talán legrészletesebben tanulmányozott rendszer a gén-expresszió transzkripcionális szintű szabályozása volt. A fehérjék intracelluláris irányított lebontásának felismerése a múlt század utolsó évtizedében nagymértékben tágította, és újabb szintre, a fehérjék szintjére terjesztette ki ismereteinket a homeosztázis fenntartásáért, és flexibilitásának biztosításáért felelős szabályozási rendszerek sorában. A proteolitikus szabályozás jelentőségét, a biológiai rendszerekben megismert számos reverzibilis regulációs mechanizmussal ellentétesen, irreverzibilis volta határozza meg. A fehérje lebontását követően a folyamatok iránya egyértelműen, visszafordíthatatlanul meghatározottá válik. Számos példa bizonyítja ennek jelentőségét a sejtciklus szabályozásában. A fehérjék lebontását kísérő változások irreverzibilitása természetesen azt igényli, hogy a bontási folyamat rendkívül szigorúan szabályozott legyen, kizárólag csak azokat a fehérjéket érintse, melyek eltávolítása a sejt pillanatnyi homeosztázisa szempontjából elengedhetetlen. E szigorú specificitási feltétel biztosítása érdekében a bontandó fehérje kiválasztását, illetve magát a proteolízis folyamatát két különböző, független rendszer végzi. Az ubikvitinációs enzim kaszkád feladata a bontásra szánt fehérjékben található „degradációs szignálok” felismerése, és ezen fehérjék bontásra történő kijelölése egy specifikus poszttranszlációs módosítással. E módosítás során a bontandó fehérje egy lizin aminosav oldalcsoportjához az enzim kaszkád poliubikvitin láncot szintetizál, amely felismerési jelként szolgál a fehérje bontást végző speciális proteolitikus komplex, a csaknem 50 alegységből felépülő 2,4 MDa nagyságú 26S proteaszóma számára. A szabályozott intracelluláris prote-

olízis specificitását tehát a 26S proteaszóma azon képessége biztosítja, hogy szelektíven csak a poliubikvitinált fehérjéket bontja, tehát egyik – talán legfontosabb – szerepe a poliubikvitinált fehérjék felismerése, megkötése és proteolitikus processzálása.

### **A 26S proteaszóma poliubikvitin receptorának azonosítása**

Az 1990-es évek elején nagyon éles verseny alakult ki több vezető amerikai és európai laboratórium között a 26S proteaszóma szerkezetének, és poliubikvitinált fehérje-felismerő mechanizmusának megismerése terén. Három publikációnkkal kapcsolódtunk be ennek a kérdésnek a megközelítésébe. Sikerült homogenitásig tisztítani a 26S proteaszómát ecetmuslicából (*Drosophila melanogaster*), meghatározni pontos alegységösszetételét, igazolni poliubikvitinált fehérje-bontó képességét és kimutatni két alkompexumának ATP-függő *in vitro* összeszerelődését [1]. Ezt követően klónoztuk és molekulárisan jellemeztük egyik alegységét [2], melyről később bizonyítottuk, hogy a 26S proteaszóma poliubikvitin receptora, a komplexumnak azon alegysége, mely szelektíven képes felismerni és megkötni a poliubikvitinált fehérjéket, és e kötés affinitása a poliubikvitin láncot alkotó ubikvitin egységek számával arányosan nő [3]. Deléciós térképezéssel behatároltuk az alegység azon szakaszait is, melyek a poliubiquitin lánc felismerésében és kötésében részt vesznek.

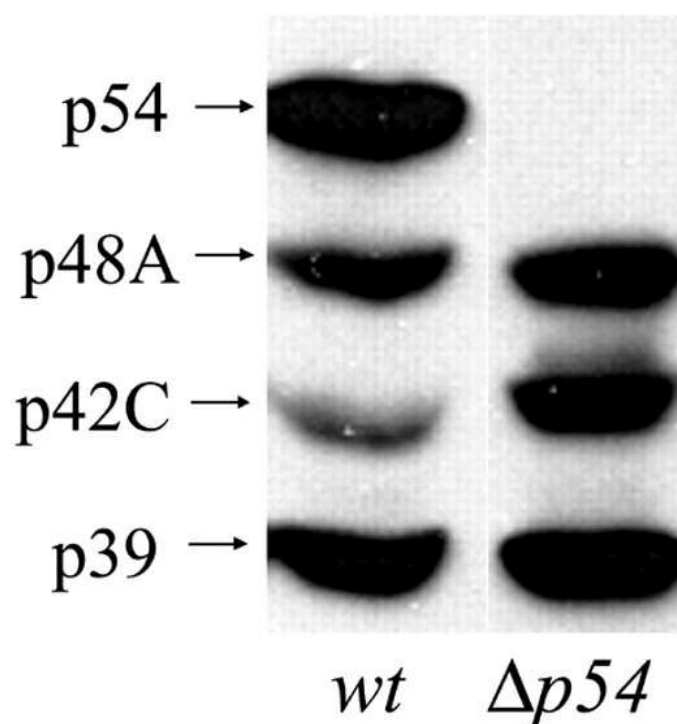
A 26S proteaszóma poliubikvitin receptor alegységét *in vitro* kötési teszttel több eukarióta fajban azonosították (S5a/Rpn10/p54 a humán/élesztő/*Drosophila* ortológok). Ezek az alegységek magas fokú szekvencia homológiát mutattak [4], ennek ellenére fiziológiás szerepüket kérdésessé tette az a megfigyelés, hogy élesztőben az Rpn10-t kódoló gén deletálása nem letális és nem eredményezi a poliubikvitinált fehérjék felhalmozódását [5]. A megfigyelésből a Harvard Egyetem kutatói arra a következtetésre jutottak, hogy vagy a poliubikvitin lánc kötésének kimutatására alkalmazott *in vitro* kötési tesztek aspecifikus kötést detektáltak, vagy pedig léteznek más, nagyobb affinitású poliubikvitin receptorok, melyek *in vivo* képesek komplementálni ennek a fehérjének a funk-

cióját. Az extraproteasómális ubiquitin receptorok felfedezése feloldani látszott ezt a problémát. Ezek a fehérjék (Rad23, Dsk2 és Ddi1) hordoznak egy UBA domént, mely a poliubikvitin lánc szelektív felismeréséért és megkötéséért felelős, valamint egy UBL domént, mely a 26S proteaszómához kötődve lehetővé teszi a szállított poliubikvitinált fehérje proteaszómális betáplálását és lebontását. Rad23 $\Delta$  és Dsk2 $\Delta$  deléciós élesztő mutánsokban a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felszaporodását észlelték [6], melyet annak megerősítéseként tekintettek, hogy nem az Rpn10 alegység, hanem ezek az extraproteaszómális fehérjék működnek poliubikvitin receptorként. A Harvard Egyetem egy laboratóriumából közölt eredmény évekre felfüggesztette a 26S proteaszóma ezen alegységének funkcionális vizsgálatát. Ha lassan is, de gyűltek az adatok, melyek a Harvard kutatóinak tekintélyét lebontva, kizárólag a tudományos tények alapján lehetővé tette a proteaszóma ubiquitin receptor alegységének azonosítását és működésének tisztázását: a Rad23 $\Delta$  élesztő mutáns sejtekhez viszonyítva a Rad23 $\Delta$ Rpn10 $\Delta$  kettős mutáns élesztő sokkal súlyosabb pleiotróp fenotípusa azt sugallta, hogy az Rpn10 fehérje részt vesz a Rad23 által prezentált poliubikvitinált fehérjék proteaszómális processzáálásában [7]. Végül az élesztő 26S proteaszóma proteolitikus funkciójának tisztított komponensekből történő *briliáns in vitro* rekonstrukciójával Verma és mtsai egyértelműen bizonyították, hogy az Rpn10 alegység valóban poliubikvitin receptorként működik élesztőben [8].

### **Poliubikvitin receptor funkciót alátámasztó *Drosophila* genetikai bizonyítékok**

Az élesztő Rpn10 deléciós mutáns fenotípusának hibás értelmezése azért meglepő, mert az Rpn10 és magasabb eukarióta ortológjainak szekvenciája korábban már ismert volt. A szekvencia adatokból nyilvánvaló volt, hogy bár az Rpn10 magas fokú szekvencia homológiát mutat a magasabb eukarióta ortológokkal, az alegység azonban lényegesen rövidebb, a C-terminálisáról hiányzik egy jelentősen hosszú, magasabbrendű eukariótákban nagymértékben konzerválódott szakasz.

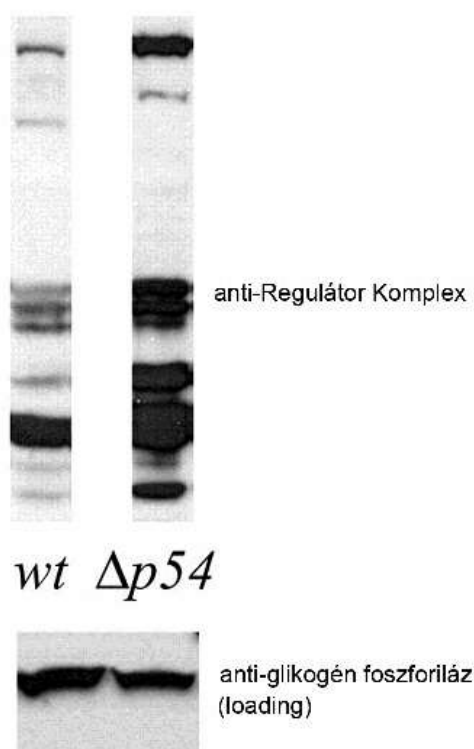
Ezeknek a szekvencia adatoknak ismeretében további vizsgálatainkban feltételeztük, hogy az élesztő deléciós mutáns nem nyújthat teljes információt az S5a vagy a p54 tényleges funkciójáról. Annak bizonyítására, hogy a *Drosophila* p54 alegység valóban a 26S proteaszóma poliubikvitin receptora, konstruáltunk egy p54 $\Delta$  deléciós mutánst (1. ábra).



**1. ábra. A 26S proteaszóma regulátor komplexum p54 alegységének detektálása vad típusú és p54 $\Delta$  deléciós *Drosophila* törzsekben.** Vad típusú (wt) ill. p54 $\Delta$  *Drosophila* lárvákból készített teljes fehérje kivonatot 8%-os SDS-PAGE-en szeparáltuk, majd 4 különböző regulátor komplex specifikus monoklonális ellenanyaggal immunoblotos technikával vizsgáltuk.

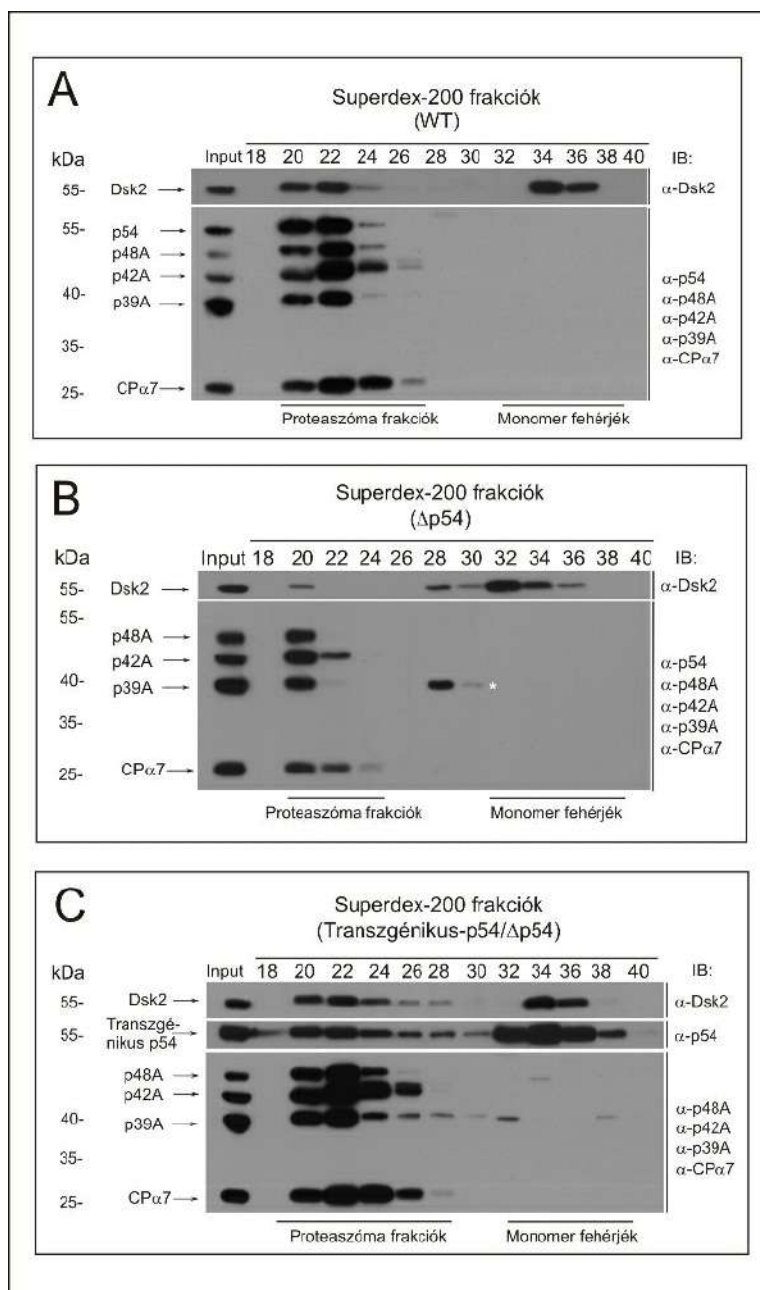
Várakozásunknak megfelelően a deléciós mutáns azt a fenotípust mutatta, amit egy esszenciális poliubikvitin receptor deléciós mutánstól elvárhatunk: a deléció mitótikus hibákat, fejlődési rendellenességeket és korai báb letalitást, valamint a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felszaporodását eredményezte [9]. Vizsgálataink, Verma és mtsai egy évvel később élesztőben végzett *in vitro* kísérleteivel együtt nyugvó pontra juttatták a 26S proteaszóma poliubikvitin receptor azonosításának kalandos útját. A tudomány legnagyobb ereje, hogy a tekintély erejével szemben is önkorrekcióna képes.

A deléció váratlan és érdekes következménye volt a csaknem 50 proteaszómális alegység koordinált, extrém fokú túltermelődése (2. ábra).



**2. ábra. A 26S proteaszóma nagyfokú túltermelődést mutat p54Δ deléziós *Drosophila* törzsben.** Egyetlen 20 órás vad típusú (wt), illetve p54Δ deléziós báb teljes fehérje extraktumában a 26S proteaszóma katalitikus és regulátor komplexum alegységeinek immunoblotos detektálása. Alsó panel: glikogén foszforiláz (bemérési kontroll).

A túltermelődött alegységek összeszerelődtek egy defektív 26S proteaszóma partikulummá, amelyből csak a p54 alegység hiányzott. A túltermelődés koordináltságát az bizonyította, hogy szabad proteaszómális alegységet a deléziós mutánsban kimutatni nem lehetett, valamennyi alegység fehérje 26S proteaszóma partikulummá összeszerelt állapotban volt jelen a deléziós mutánsban. Ez a koordináltság azért is érdekes, mert az alegységeket kódoló gének a *Drosophila* genom legkülönbözőbb pontjain helyezkednek el. A jelenség pontos mechanizmusa mindmáig ismeretlen.



**3. ábra. A Dsk2 csak a p54 jelenlétében kötődik a proteaszómához. A)** Gélszűrési-kromatográfiával (Superdex 200) igazoltuk, hogy a vad típusú (WT) bábokban a Dsk2 egy része a proteaszómához kötődik (fr. 20-24), míg a többi extraproteaszómálisan halmozódik fel (fr. 34-36). **B)** Δp54-es állatokban a Dsk2 csak nyomokban mutatható ki a proteaszómában. **C)** A transzgénikus p54, amely beépül a Δp54-es proteaszómába a Dsk2 újbóli proteaszómális kötődését hozza létre. IB – immunoblot a következő ellenanyagokkal: anti-Dsk2, anti-p54, anti-p48A, anti-p42A és anti-p39A (a 19S regulátor komplexum alegységei), anti-CPα7 (a 20S katalitikus mag alfa alegysége).

A p54 alegység esszenciális poliubikvitin receptor funkciójának igazolása után részletesen vizsgáltuk az extraproteaszómális ubiquitin receptorok kölcsönhatásait a 26S proteaszómával, ezen belül is a p54 alegységgel, és ezeknek a

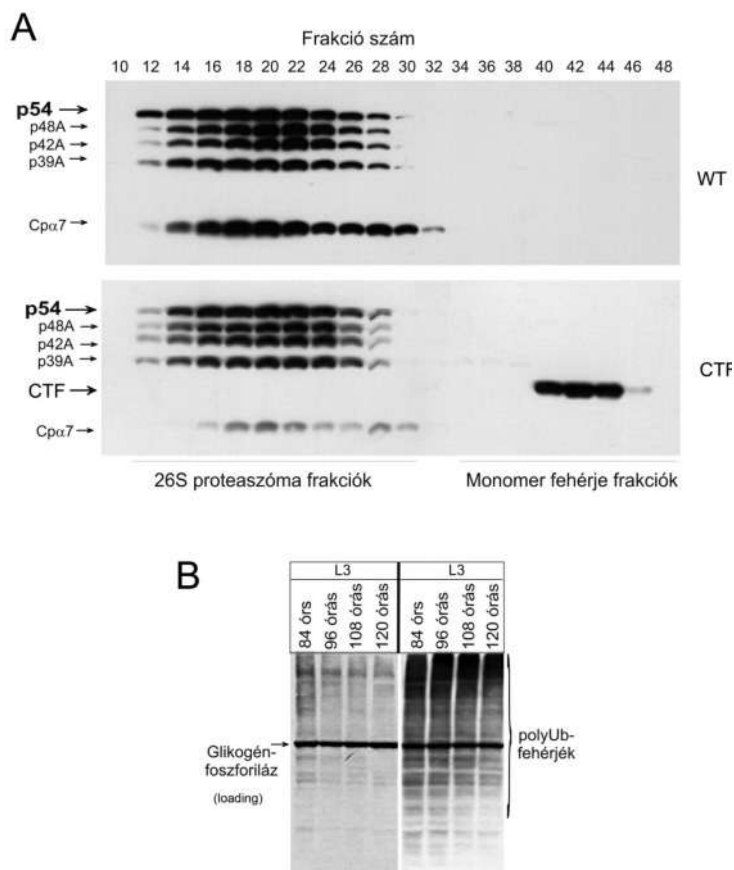
kölcsönhatásoknak szabályozását. Ha ecetmuslicában RNAi technikával a Dsk2 poliubikvitin receptor szintjét csökkentettük vagy transzgénikus állatokban túltermeléssel növeltük a poliubiquitinált fehérjék felhalmozódását figyeltük meg és az állatok bábstádiumban elpusztultak, ami a Dsk2 esszenciális szerepét bizonyítja [10]. Tehát szemben az élesztő sejtekkel, magasabb eukariótákban a poliubiquitin receptorok nem képesek komplementálni egymás funkcióit, valamennyi poliubikvitin receptor specifikus szubsztrát garnitúrával rendelkezik, melyek proteaszómális processzálásáért kizárólagosan felelősek. *In vitro* fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérletekben kimutattuk, hogy a proteaszómális p54 alegység fizikai kölcsönhatásba lép a Dsk2 UBL doménjével, amit később transzgénikus állatokkal végzett kísérletekkel *in vivo* is igazoltunk. A várakozásnak megfelelően a Dsk2 és a 26S proteaszóma kölcsönhatása p54 $\Delta$  deléciós mutáns törzsben nem mutatható ki. Ha a p54 $\Delta$  háttéren transzgénikus p54-et termeltettünk, a transzgénikus fehérje beépült a proteaszómába, és ezzel együtt az endogén Dsk2 ismét képes volt kölcsönhatást kialakítani a 26S proteaszómával (3. ábra) [10]. Ennek ismeretében kijelenthetjük, hogy a *Drosophila* Dsk2 a p54-en alegységen keresztül kapcsolódik a proteaszómához, a p54 alegységen keresztül tudja az általa szállított poliubiquitinált fehérjét a proteaszómának proteolitikus lebontásra átadni. Ez a mechanizmus szöges ellentétben áll az élesztőben megfigyeltekkel, ahol a Dsk2 és az Rpn10 versengenek egy közös proteaszómális kötőhelyért [11].

### **A poliubikvitin receptor szabályozása**

Az élesztő és a magasabb eukarióta sejtek poliubiquitinált fehérjeproccesszálási mechanizmusában kimutatott alapvető különbségek további vizsgálatánál abból a megfigyelésből indultunk ki, hogy proteaszómális poliubikvitin receptorjaik (p54 ortológok) között a lényeges különbség e fehérjék C-terminális részében van. Ezért célszerűnek látszott megvizsgálni a p54 alegység C-terminális felének kölcsönhatásait az extraproteaszómális poliubikvitin receptorokkal, valamint e kölcsönhatások szabályozási mechanizmusait.



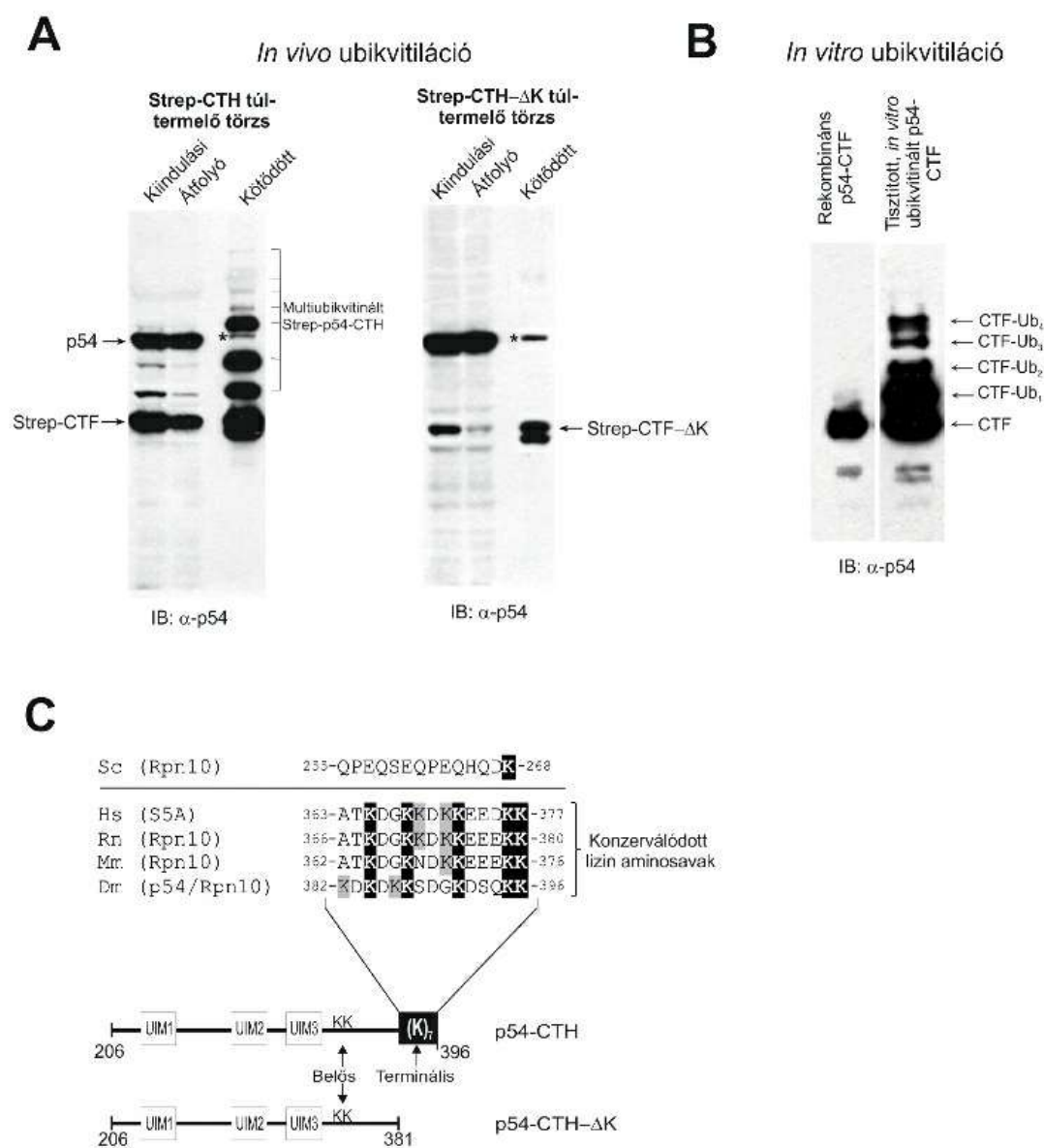
A p54 fehérje N-terminális felében lévő vWA domén felelős az alegységnek a 26S proteaszómához történő kapcsolódásáért, ezért olyan transzgénikus *Drosophila* törzset konstruáltunk, amelyben a p54 C-Terminális Felét (CTF) lehet túltermeltetni.



**4. ábra. A transzgénikusan túltermeltetett p54-CTF fehérje nem kötődik a proteaszómához és a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felhalmozódását idézi elő. A)** Vad típusú (WT) és CTF transzgénikus lárvák teljes fehérje extraktumát Superose 6 FPLC oszlopon frakcionáltuk. A 26S proteaszóma alegységeit immunoblotos technikával detektáltuk. **B)** Poliubikvitilált fehérjék felhalmozódását a CTF transzgénikus lárvákban anti-ubikvitin ellenanyaggal detektáltuk.

Várakozásunknak megfelelően ez a fehérje nem kapcsolódott a 26S proteaszómához, extraproteaszómálisan halmozódott fel, a poliubikvitinált fehérjék nagyfokú felszaporodását eredményezte, és az állatok lárvastádium végi pusztulását okozta (4. ábra). Affinitás-kromatográfiával tisztított transz-génikus CTF tömegspektrometriai elemzése kimutatta, hogy a CTF *in vivo* ubikvitilálódik, amit *in vitro* is sikerült reprodukálnunk [12]. A CTF-ben található egy, a magasabbrendű eukariótákban konzerválódott, terminálisan elhelyezkedő lizin csoport (5. ábra). Ha ezeket a lizineket eltávolítottuk és az így csonkolt fehérje

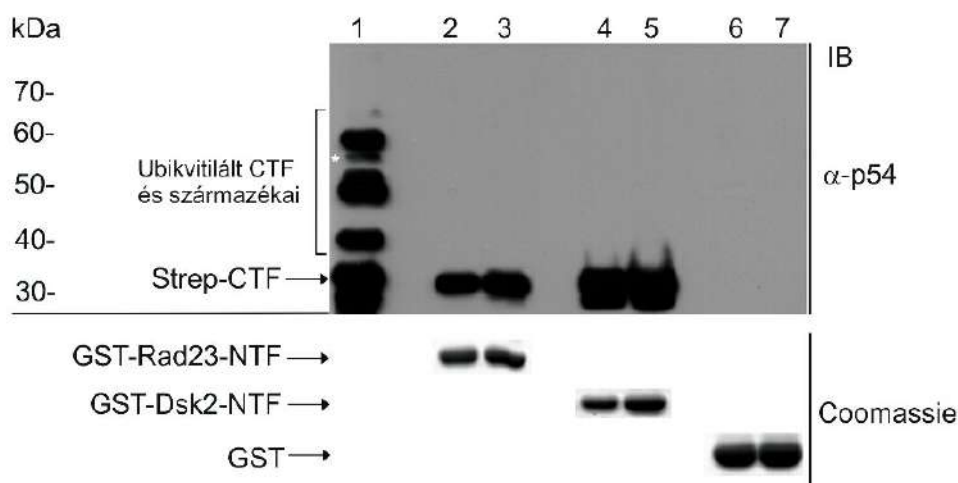
expressziójára készítettünk transzgénikus *Drosophilát* (CTF-ΔK), a transzgénikus fehérjében ubikvitilációt nem lehetett kimutatni, tehát az ubikvitiláció a terminális lizin oldalcsoportokon alakul ki.



**5. ábra. Transzgénikus CTF *in vivo* multiubikvitinált, *in vitro* multiubikvitinálható. A)** Strep-oszlopon tisztított p54-CTH fehérjén a módosítás a C-terminális lizin oldalcsoportokon alakul ki, ami a CTF-ΔK fehérjén nem alakul ki. **B)** Rekombináns p54-CTF-et *Drosophila* embrió extraktumban inkubálva a CTF poszttranszlációs módosítása *in vitro* is kialakul. **C)** A multiubikvitináció a p54 terminális, magasabbrendű eukariótákban konzerválódott lizin oldalcsoportjain alakul ki.

Bizonyítottuk, hogy a p54 C-terminális lizinjein multiubikvitiláció (több lizin oldalcsoport egyidejű monoubikvitinációja) történik, és ez a módosítás – szem-

ben a poliubikvitinációval - nem degradációs jel; az ubiquitilált CTF féléletideje ugyanis több mint 2 nap. Fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérleteink azt igazolták, hogy az ubikvitilált CTF nem képes kapcsolódni a Dsk2 UBL doménjéhez, a módosítás gátolja a két fehérje közti interakciót, tehát ez a poszt-szintetikus módosítás regulációs szerepű (6. ábra). A módosítás nemcsak a p54 fehérje CTF-ben alakul ki, teljes hosszúságú p54-et termelő transzgénikus törzsekben hasonlóan kimutatható, s itt is a terminális lizinek multiubikvitilációja következik be, viszont a módosított formák soha nem épülnek be a proteaszómában, kizárólag extraproteaszómálisan halmozódnak fel (7. ábra).

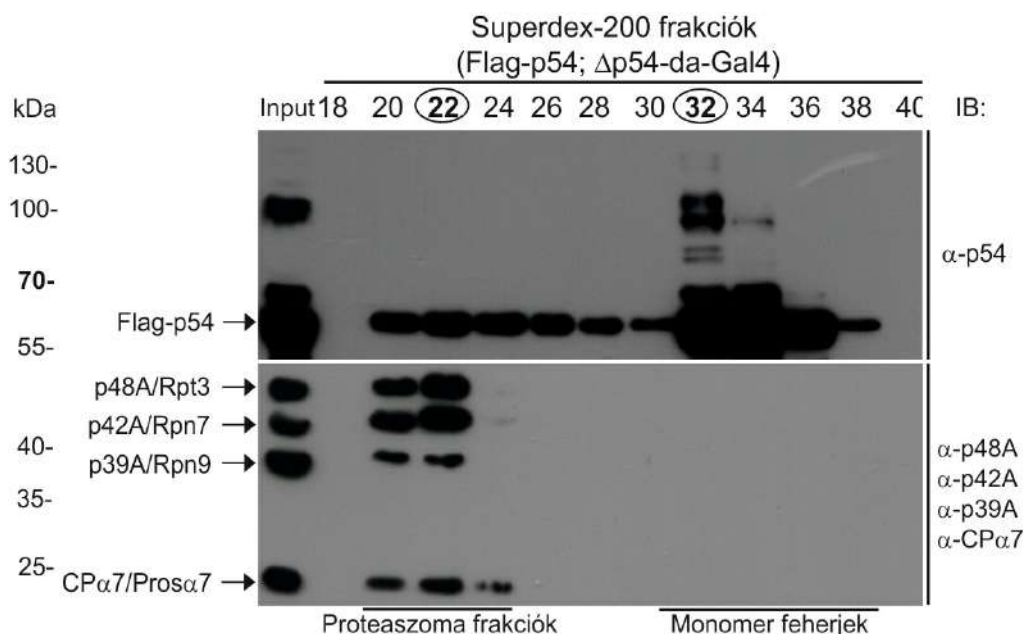


**6. ábra. A CTF multiubikvitilálása felfüggeszti a Rad23 és Dsk2 extraproteaszó-mális poliubikvitin receptorok CTF-lel történő kölcsönhatását.** Tisztított Strep-CTF és multiubikvitinált származékait affinitás oszlopokhoz kötött GST-Rad23, illetve GST-Dsk2 fehérjékkel (azok N-terminális felével (NTF)) inkubáltuk. Az affinitás oszlophoz kötődő CTF származékokat eluáltuk és immunoblot technikával azonosítottuk. Csak a módosítatlan CTF kötődött a Rad23, illetve Dsk2 fehérjékhez.

Ez a megfigyelés is a multiubikvitiláció szabályozó szerepét bizonyítja. Ezeknek a csak magasabb eukariótákban megtalálható terminális, konzerválódott lizin oldalcsoporthoz fontos vitális szerepük van. Vizsgálataink szerint a *Drosophila* p54 $\Delta$  deléciós törzs letális fenotípusát tökéletesen menekíteni lehet, ha transzgénikus p54 fehérjét fejeztetünk ki a mutáns háttéren.

A transzgénikus p54 fehérje beépül a 26S proteaszómába és komplementálja a poliubikvitinált fehérjék felhalmozódását és a letális fenotípust. Olyan transzgénikus p54 fehérje, amelyből a terminálisan elhelyezkedő, konzerválódott lizin

oldalcsoportokat tartalmazó utolsó 14 aminosavat eltávolítottuk, beépül ugyan a 26S proteaszómába, kölcsönhatásba lép a Dsk2-vel, de nem képes teljesen komplementálni az endogén p54 funkcióját [13].



**7. ábra. Transzgénikus p54 fehérje in vivo multiubikvitilálódik, de a poszttranszlatív módon módosított formái nem épülnek be a 26S proteaszómába.** p54 $\Delta$  deléziós mutánsban transzgénikus p54 fehérjét (Flag-p54) termeltettünk, a teljes lárvális fehérje extraktumot Superdex 200 FPLC oszlopon frakcionáltuk és a proteaszómába beépült, illetve extraproteaszómális p54 fehérjéket immunoblotos technikával azonosítottuk.

Emiatt az állatok elpusztulnak. Laboratóriumunkban jelenleg a terminális lizin oldalcsoportok ezen esszenciális funkciójának molekuláris elemzése folyik.

### Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA-PD115404), a Nemzetgazdasági Minisztérium (GINOP-2.3.2-15-2016-00001, GINOP-2.3.2-15-2016-00032 és GINOP-2.3.2-15-2016-00020), valamint az MTA támogatja (Bolyai János Kutatási Ösztöndíj).



**Haracska Lajos**, molekuláris biológus, az MTA SZBK Biokémiai Intézetében Udvardy Andor témavezetésével védte meg Ph.D. dolgozatát fehérje ubikvitiláció és szabályozott lebontás témakörben. Posztdokorként többek között az USA-ban a UTMB-n az ubikvitiláció DNS hibajavításban betöltött szerepét tanulmányozta. Jelenleg az SZBK Genetikai Intézetében vezetője a Mutagenesis és Karcinogenesis Kutatócsoportnak, amely az elmúlt években több új, a DNS hibatoleranciában szerepet játszó ubikvitin-ligáz és ubikvitin-kötő fehérje szerepét tárta fel.



**Lipinszki Zoltán** a Szegedi Tudományegyetemen szerzett biológus diplomát 2006-ban, majd az MTA SZBK Biokémiai intézetében Udvardy Andor csoportjában védte meg Ph.D. dolgozatát a poliubikvitin receptorok jellemzése és szabályozása témakörben 2009-ben. FEBS posztdoktori ösztöndíjjal 4 évet töltött a Cambridge-i Egyetemen, ahol David Glover témavezetésével a sejtosztódás szabályozásában résztvevő fehérje módosítások regulációs szerepét vizsgálta. 2015 óta tudományos főmunkatárs, az SZBK Biokémiai intézetében a Sejtciklus és Transzkripció Szabályozás Csoport vezetője. Kutatási témája a mitózis irányítását végző ubiquitilációs és foszforilációs folyamatok feltárása.



**Udvardy Andor** a Budapesti Orvostudományi Egyetemen 1962-ben orvosi diplomát, az Eötvös Lóránd Tudományegyetemen 1968-ban pedig matematikusi diplomát szerzett. 1971 óta az MTA SZBK kutatója. 1974-ben nyerte el a kandidátusi fokozatot, 1987-ben a tudományok doktora címet. 1989-től az EMBO tagja. Tanulmányúton járt Marburgban, Göttingenben és Princetonban. Kutatási területe a molekuláris biológia, különös tekintettel a génextresszió, a kromatin szerkezete és a fehérjebontás szabályozása.

## Irodalomjegyzék

- [1] Udvardy, A. (1993) Purification and characterization of a multiprotein component of the Drosophila 26 S (1500 kDa) proteolytic complex. *The Journal of Biological Chemistry*, **268 (12)**: 9055-62.
- [2] Haracska, L., Udvardy, A. (1995) Cloning and sequencing a non-ATPase subunit of the regulatory complex of the Drosophila 26S protease. *Eur J Biochem*, **231 (3)**: 720-5.
- [3] Haracska, L., Udvardy, A. (1997) Mapping the ubiquitin-binding domains in the p54 regulatory complex subunit of the Drosophila 26S protease. *FEBS Letters*, **412 (2)**: 331-6.
- [4] Ferrell, K., Deveraux, Q., van Nocker, S., Rechsteiner, M. (1996) Molecular cloning and expression of a multiubiquitin chain binding subunit of the human 26S protease. *FEBS Letters*, **381 (1-2)**: 143-8.

- [5] vanNocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H.Y., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., Vierstra, R.D. (1996) The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Molecular and Cellular Biology*, **16 (11)**: 6020-6028.
- [6] Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., Gordon, C. (2001) Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nature Cell Biology*, **3 (10)**: 939-43.
- [7] Lambertson, D., Chen, L., Madura, K. (1999) Pleiotropic defects caused by loss of the proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **153 (1)**: 69-79.
- [8] Verma, R., Oania, R., Graumann, J., Deshaies, R.J. (2004) Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*, **118 (1)**: 99-110.
- [9] Szlanka, T., Haracska, L., Kiss, I., Deak, P., Kurucz, E., Ando, I., Viragh, E., Udvardy, A. (2003) Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, **116 (Pt 6)**: 1023-33.
- [10] Lipinszki, Z., Pal, M., Nagy, O., Deak, P., Hunyadi-Gulyas, E., Udvardy, A. (2011) Overexpression of Dsk2/dUbq1n results in severe developmental defects and lethality in *Drosophila melanogaster* that can be rescued by overexpression of the p54/Rpn10/S5a proteasomal subunit. *The FEBS Journal*, **278 (24)**: 4833-44.
- [11] Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D.S., Ziv, I., Kim, W., Dakshinamurthy, A., Kleifeld, O., Gygi, S.P., Reis, N., Glickman, M.H. (2008) Extraproteasomal Rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein Dsk2 to proteasome. *Molecular Cell*, **32 (3)**: 415-25.
- [12] Lipinszki, Z., Kiss, P., Pal, M., Deak, P., Szabo, A., Hunyadi-Gulyas, E., Klement, E., Medzihradzsky, K.F., Udvardy, A. (2009) Developmental-stage-specific regulation of the polyubiquitin receptors in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, **122 (Pt 17)**: 3083-92.
- [13] Lipinszki, Z., Kovacs, L., Deak, P., Udvardy, A. (2012) Ubiquitylation of *Drosophila* p54/Rpn10/S5a regulates its interaction with the UBA-UBL polyubiquitin receptors. *Biochemistry*, **51 (12)**: 2461-70.