

УДК 576.38

ИЗМЕНЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ГИСТОНОВОГО КОДА ПРИ ИНИЦИИИ ПАРАПТОЗОПОДОБНОЙ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК HEp-2 ОКИСЛЕННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ДИСУЛЬФИРАМА

© 2024 г. М. Е. Соловьева^а, *, Ю. В. Шаталин^а, В. С. Акатов^а

^аИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: m_solovieva@iteb.ru

Поступила в редакцию 11.11.2023

После доработки 11.01.2024

Принята к публикации 24.01.2024

Дисульфирам (ДСФ) и его окисленные производные (ДСФокси) рассматриваются в качестве возможных противоопухолевых средств. Ранее нами было установлено, что ДСФокси инициируют параптозоподобную гибель опухолевых клеток, что представляет потенциальный интерес для лечения опухолей, устойчивых к инициации апоптоза. На основе биоинформатического анализа масс-спектрометрических данных убиквитинирования белков нами было сформулировано представление о важной роли нарушения ретроградного транспорта поврежденных белков из эндоплазматического ретикулума в цитозоль в механизме инициации параптозоподобной гибели клеток. В настоящей работе обнаружено, что ДСФокси в процессе инициации параптозоподобной гибели клеток аденокарциномы человека HEp-2 также усиливают убиквитинирование гистонов и ферментов гистонов. В частности, это относится к убиквитинированию гистона H2BC12, гистон-метилтрансфераз, отвечающих за транскрипцию и репарацию поврежденных участков ДНК, а также ацетилирующих и убиквитин-конъюгирующих белков. Биоинформатический анализ изменений убиквитинирования белков клеточного ядра с использованием базы данных STRING выявил в ходе этого процесса увеличение встречаемости убиквитинированных белков (функциональное обогащение) регуляции клеточного цикла, ответа клетки на повреждение ДНК и репарации ДНК, регулирование которых также зависит от гистонов. Это непосредственно указывает на повреждение ядра клетки и согласуется с данными конфокальной микроскопии. Полученные результаты свидетельствуют, что при инициации параптозоподобной гибели клеток посредством ДСФокси наряду с нарушением ретроградного транспорта и стрессом эндоплазматического ретикулума происходит также изменение регуляции гистонов, что указывает на плеiotропный характер механизма инициации этой гибели клеток.

Ключевые слова: гистоновый код, гистоны, убиквитинирование гистонов, метилирование гистонов, параптоз, дисульфирам

DOI: 10.31857/S0233475524030052, **EDN:** csfgqn

ВВЕДЕНИЕ

Среди белков клеточного ядра основную часть (по массе) составляют гистоны. Их роль в упаковке хроматина и регуляции связанных с ним процессов общеизвестна. Генетический код данных белков очень консервативен и различается у организмов разной таксономии всего лишь на несколько аминокислот (классический пример — горох и бык, последовательность для гистона H4 различается по двум аминокислотам). В последнее время большое внимание уделяется представлению о гистоновом коде, которое состоит в том,

что хроматин-ДНК-взаимодействия и вовлечение ДНК в различные внутриклеточные процессы управляются комбинациями посттрансляционных модификаций (ПТМ) гистонов, такими как деметилирование лизина и аргинина, деацетилирование и деубиквитинирование лизина, фосфорилирование серина, а также сумоилирование, поли-ADP-рибозилирование и другими [1–6]. Данные модификации гистонов меняют их заряд, гидрофобность, сродство к определенным молекулам, силу взаимодействия с ДНК, время существования и многие другие свойства, но не затрагивают генетическую информацию, зашифрованную в ДНК,

т.е. гистоновый код является эпигенетическим. Этот код позволяет узнающим белкам связываться с поверхностью гистонов и осуществлять регуляцию репликации, транскрипции, трансляции и репарации ДНК, организации и ремоделирования хроматина. Осуществление этой регуляции зависит от набора ПТМ модификаций и белков-регуляторов. Нарушения гистонowego кода выявлены при ряде заболеваний, включая аутизм, шизофрению и другие расстройства [1, 5–7]. Предполагается, что изменения гистонowego кода, дисбаланс между процессами его модификаций являются одним из этапов канцерогенеза [1, 2, 8].

Ранее мы обнаружили, что в процессе инициации параптозоподобной клеточной гибели (параптоза) окисленными производными дисульфирама (ДСФокси) происходит усиление убиквитинирования белков клетки [9]. В осуществляемой в настоящее время программе расширения области применения известных препаратов дитиокарбаматы (ДСФ и его производные) были выделены как перспективные лекарственные средства для нескольких направлений, например, психиатрии, противовоспалительной, противопаразитарной, противовирусной и противоопухолевой терапии [10–18]. Изучение неапоптотических видов программируемой клеточной гибели, стимулируемое приобретением лекарственной устойчивости к апоптоз-индуцирующим агентам, в настоящее время активно ведется, и в этой связи ДСФ также привлекает интерес [19]. Такие свойства ДСФ, как влияние на убиквитин-протеасомную систему (УПС) клетки – на убиквитинирование лигазы E3 и ингибирование 26S протеасомы [20–24] – позволяют уточнить механизмы этих процессов [25]. Мы установили тесную связь параптозоподобной гибели, индуцированной ДСФокси, с увеличением общего количества полиубиквитинированных белков и убиквитинированием многих регуляторов клеточных функций. В частности, было обнаружено убиквитинирование, ведущее к протеасомной деградации ряда белков, участвующих в работе УПС клетки. К числу этих белков относятся многие E3-убиквитинлигазы и деубиквитиназы, а также белки эндоплазматического ретикулума (ЭПР). На основании этих данных была сформулирована гипотеза о ключевой роли ингибирования процессов ретроградного транспорта поврежденных белков из ЭПР в цитозоль в инициации стресса ЭПР и параптоза. Однако наряду с выявленными нарушениями ЭПР мы также обнаружили указания на изменения клеточного ядра в процессе инициации гибели клеток. В связи с этим в данной работе была поставлена цель оценить изменения регуляции гистонowego кода при запуске

параптоза. Для этого мы исследовали изменение состава убиквитинированных (Ub) белков, регулирующих гистоновый код, и биологические процессы, протекающие с их участием, при запуске параптозоподобной гибели клеток НЕР-2 под действием оксипроизводных ДСФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы эмбриональная телячья сыворотка (Gibco, США), краситель Hoechst 33342 (Molecular Probes Inc., США), диэтилдитиокарбамат (DDC, MP Biomedicals, США). Все остальные реактивы были получены из фирмы Sigma (США).

Клетки аденокарциномы человека НЕР-2 (Российская коллекция клеточных культур, г. С.-Петербург) выращивали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2.2 г/л бикарбоната натрия, 80 мкг/мл гентамицина при 37°C. Для открепления клеток от поверхности флакона использовали 0.25% раствор трипсина.

Для анализа убиквитома клетки культивировали в культуральных флаконах T25 (SPL Life Science, Korea) в стандартных условиях (37 °C, pH 7.2–7.4, 5% CO₂), при плотности посева 60 тыс. клеток/см². Через сутки после посева клеток в ростовую среду добавляли исследуемые вещества: DDC (1 mM) и DDC в сочетании с витамином B_{12b} (1 mM и 25 мкМ соответственно). Образцы представляли собой белки необработанных клеток (контроль), клеток после 4-ч инкубации с 1 mM DDC (D4h) и клеток после 1-ч и 4-ч инкубации с DDC+B12 (DB1h, DB4h), подготовленные по протоколу, представленному в работе [26]. Для получения образцов было проведено три независимых эксперимента, каждый образец в каждом опыте содержал 1.5 млн клеток. Все белки соответствующих образцов, идентифицированные в этих трех опытах, объединяли в соответствующую пробу. Полученные при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения результаты анализа протеома и убиквитома клеток НЕР-2 в пробах контроль, D4h, DB1h и DB4h были депонированы [27].

Биоинформатический анализ Ub-белков клеток карциномы человека НЕР-2 выполняли по протоколу, представленному ранее [9]. Ub-белки были проанализированы и сгруппированы по ключевым словам базы UniProtKB (релиз 2023–01), описывающим основные биологические процессы/молекулярные функции/клеточные компоненты, относящиеся к гистонам и модифицирующим их белкам (Histone, Histone-lysine N-methyltransferase, Histone lysine demethylase, Histone de/acetylase,

Histone de/ubiquitination, Histone ADP-ribosylation, Histone Phosphorylation). Все группы Ub-белков были проверены по базе данных STRING версии 11.5 [28] на предмет взаимодействий с использованием идентификатора UniProt, коэффициент достоверности (confidence, отражает степень подкрепленности межбелковой связи имеющимися фактами) 0.4 (средний) и 0.7 — высокий.

Размер клеточных ядер оценивали про помощи конфокальной микроскопии. Клетки высевали в чашки Петри диаметром 35 мм, после описанной выше обработки исследуемыми веществами проводили прижизненное окрашивание красителем Hoechst 33342 (1 мкг/мл, 5 мин) и получали изображения при помощи конфокального микроскопа TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Затем их анализировали при помощи программы ImageJ для определения площади клеточных ядер. Обсчитывали не менее 30 клеток в каждом из трех независимых препаратов. Достоверность различий определяли при помощи теста Стьюдента, $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы установили, что при аэробном окислении диэтилдитиокарбамата (DDC, 1 мМ), катализируемом гидроксиклобаламином (витамин В12, 25 мкМ), в среде накапливаются окисленные производные ДСФ, сульфоны и сульфоксиды (ДСФокси). В клетках НЕР-2 под воздействием ДСФокси в течение 4 ч накапливаются полиубиквитинированные белки и индуцируется параптозоподобная клеточная гибель, что было описано нами ранее [9, 19, 29, 30]. Как известно, этот тип гибели определяется в первую очередь по морфологическому критерию — вакуолизации ЭПР вследствие несовершенного синтеза белка, а также по отсутствию признаков других типов программируемой клеточной гибели. При этом по отдельности эти вещества не вызывали цитотоксического эффекта [29, 30]: витамин В12 был нетоксичен вплоть до 2 мМ, а 1 мМ DDC вызывал слабый цитостатический эффект, т.е. число живых клеток относительно контроля уменьшалось до 60–70% за 48 ч, без увеличения количества погибших клеток. В настоящей работе был выполнен анализ убиквитома четырех проб: контроль — клетки, не подвергшиеся обработке; D4h — клетки после 4-ч инкубации с 1 мМ DDC, где не происходит стимуляция клеточной гибели; DB1h — клетки, где повреждающий эффект был полностью обратим при удалении из среды DDC и В12 после 1 ч инкубации с ними, и DB4h — клетки, в которых необратимые повреждения в течение 4 ч воздействия ДСФокси

приводят к гибели более 60% популяции в течение последующих 24 ч [9, 29, 30].

Мы установили, что в контрольных клетках, а также в клетках DB1h и D4h, в которых не происходило стимуляции гибели, ядра морфологически не различались. В клетках DB4h в процессе инициации параптозоподобной клеточной гибели оксипроизводными ДСФ происходят морфологические изменения ядра, а именно уменьшение размеров (до 50% от контрольного значения) и формы ядра, выявляемое при помощи окраски ядерным красителем (рис. 1а-1д).

Количество Ub-белков клеточного ядра в пробах показано на рис. 1е. Так, в контроле было обнаружено 109 белков, в пробе D4h — 105, в пробе DB1h — 85 Ub-белков клеточного ядра. Видно, что для пробы DB4h характерно увеличение этого параметра более чем в 1.5 раза по сравнению с остальными (173 белка).

Во всех анализируемых пробах большую часть убиквитинированных ядерных белков составляли регуляторы модификации гистонов (рис. 2, табл. 1). Наибольшее количество Ub-белков гистонного кода выявлено в пробе DB4h. Отметим, что в табл. 1 включены только ферменты гистонного кода, непосредственно регулирующие ПТМ гистонов как по отдельности, так и в составе комплексов. Так, в контроле и DB4h мы обнаружили белок REST, действие которого на гистоны опосредованно, поэтому в таблицу он не включен. Обнаруженный в контроле HCFC1, связывающий хроматин-модифицирующие ферментные комплексы, также не вошел в табл. 1. Анализируя убиквитинирование белков и ПТМ гистонов через убиквитинирование/ деубиквитинирование, следует отметить, что моноубиквитинирование гистонов играет важную роль в регуляции стабильности генома и транскрипции и не ведет к их деградации. Деубиквитинирование гистонов регулирует транскрипцию и необходимо для эффективного сплайсинга ряда экзонов. Специфическое деубиквитинирование Lys-14 и Lys-16 гистона H2A регулирует ответ на повреждение ДНК в местах двойных разрывов [31]. Динамическое регулирование моно- и полиубиквитинирования гистонов в зависимости от места также является частью гистонного кода репарации разрывов ДНК, однако полиубиквитинирование по K48 приводит к протеосомной деградации гистонов [5, 6, 32]. В контрольной группе мы обнаружили убиквитинированные коровые гистоны H3 и H4. Как сказано выше, этот вид ПТМ может являться регуляторным. При помощи базы

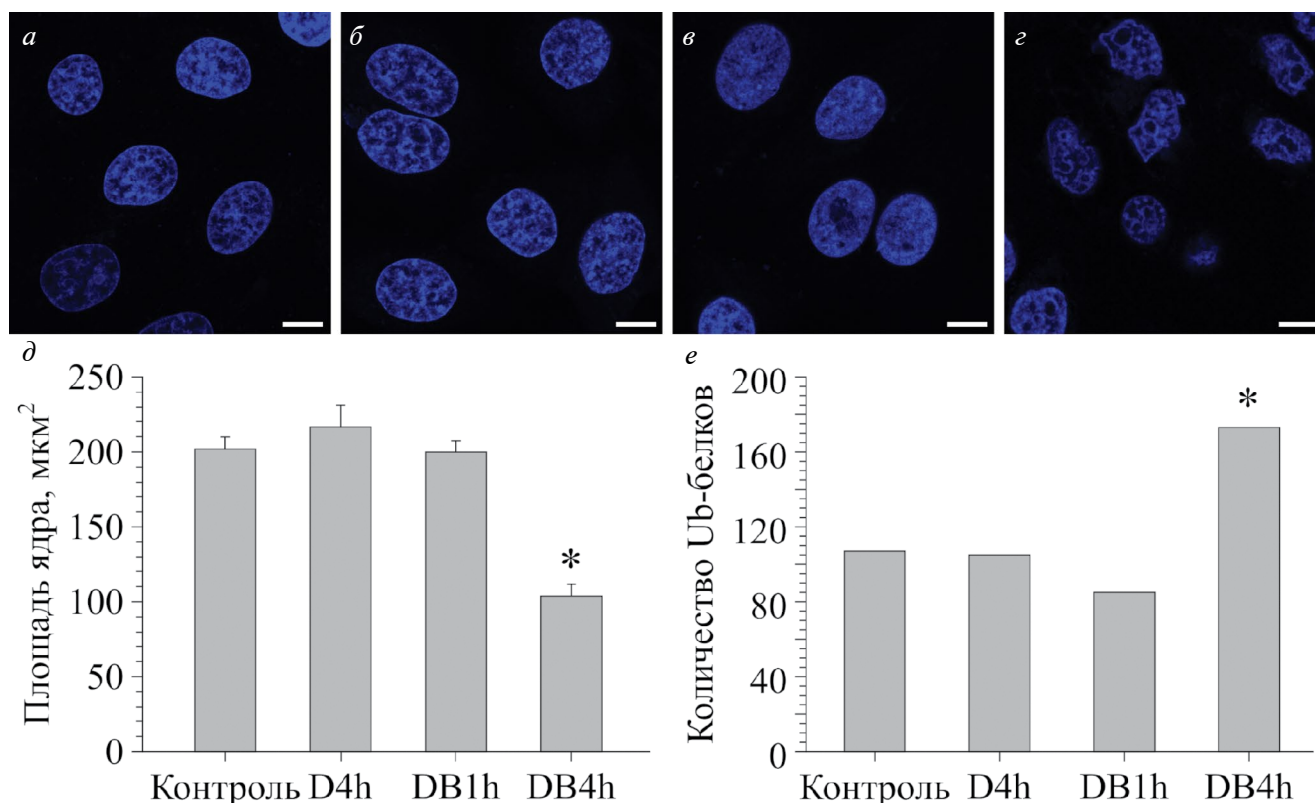


Рис. 1. Изменения формы (*a* — контроль, *б* — D4h, *в* — DB1h, *г* — DB4h), площади клеточного ядра (*д* — усредненные данные по трем экспериментам) и количества Ub-белков клеточного ядра (*е* — данные, суммированные по трем экспериментам). Линейка — 10 мкм.

данных STRING мы установили, что в контроле между выявленными Ub-белками и гистонами H3 и H4 имеется большое количество связей высокой достоверности (несвязанные белки вошли в группу на основании данных UniProt об их взаимодействии с гистонами). Модификация гистонов, как известно, необходима для регуляции клеточного цикла, ответа на стресс и репарации ДНК, и в контроле данные процессы, наряду с транскрипцией, трансляцией и т.д., также были обнаружены (рис. 2*д*). Из рис. 2 видно, что при нетоксичном действии DDC Ub-белки не образуют хорошо координированной сети, и для гистон-ассоциированных Ub-белков пробы D4h были характерны в основном связи со средней и низкой степенью достоверности (confidence 0.4 и ниже), при этом около 30% белков было не связано с основной группой. По сравнению с контролем, убиквитинирование регуляторов ответа клетки на повреждение ДНК и репарации ДНК в пробе D4h было несколько повышено, что может указывать на активацию этих процессов с целью восстановления полученных повреждений. Убиквитинированных гистонов в этой пробе не было найдено. Начальные нелетальные повреждения клетки оксипроизводными ДСФ

(проба DB1h) приводят к убиквитинированию гистона H4, с которым достоверные связи (confidence 0.7) образуют большинство найденных в пробе регуляторов кода. Это может указывать на его участие в регуляции транскрипции и стабильности генома на начальном этапе повреждающего действия оксипроизводных ДСФ, подобно тому как полиубиквитинирование H4 облегчало репарацию ДНК клеток после УФ-облучения [33]. В обеих пробах, связанных с инициацией параптоза (DB1h и DB4h), заметно увеличивалось убиквитинирование белков, связанных с регуляцией клеточного цикла. В пробе DB4h, согласно базе данных STRING, вместе с процессами модификации гистонов среди достоверно функционально обогащенных биологических процессов был ответ на стресс, клеточный ответ на повреждение ДНК и репарация ДНК. Как видно из рис. 2, инициация параптоза приводит к хорошо интегрированному ответу в пробе DB4h, где отмечено большое число связей с высокой достоверностью между Ub-белками, участвующими в регуляции гистонного кода. Большинство этих белков было связано с убиквитинированным гистонам H2BC12 (Histone H2B type 1-K), что может указывать

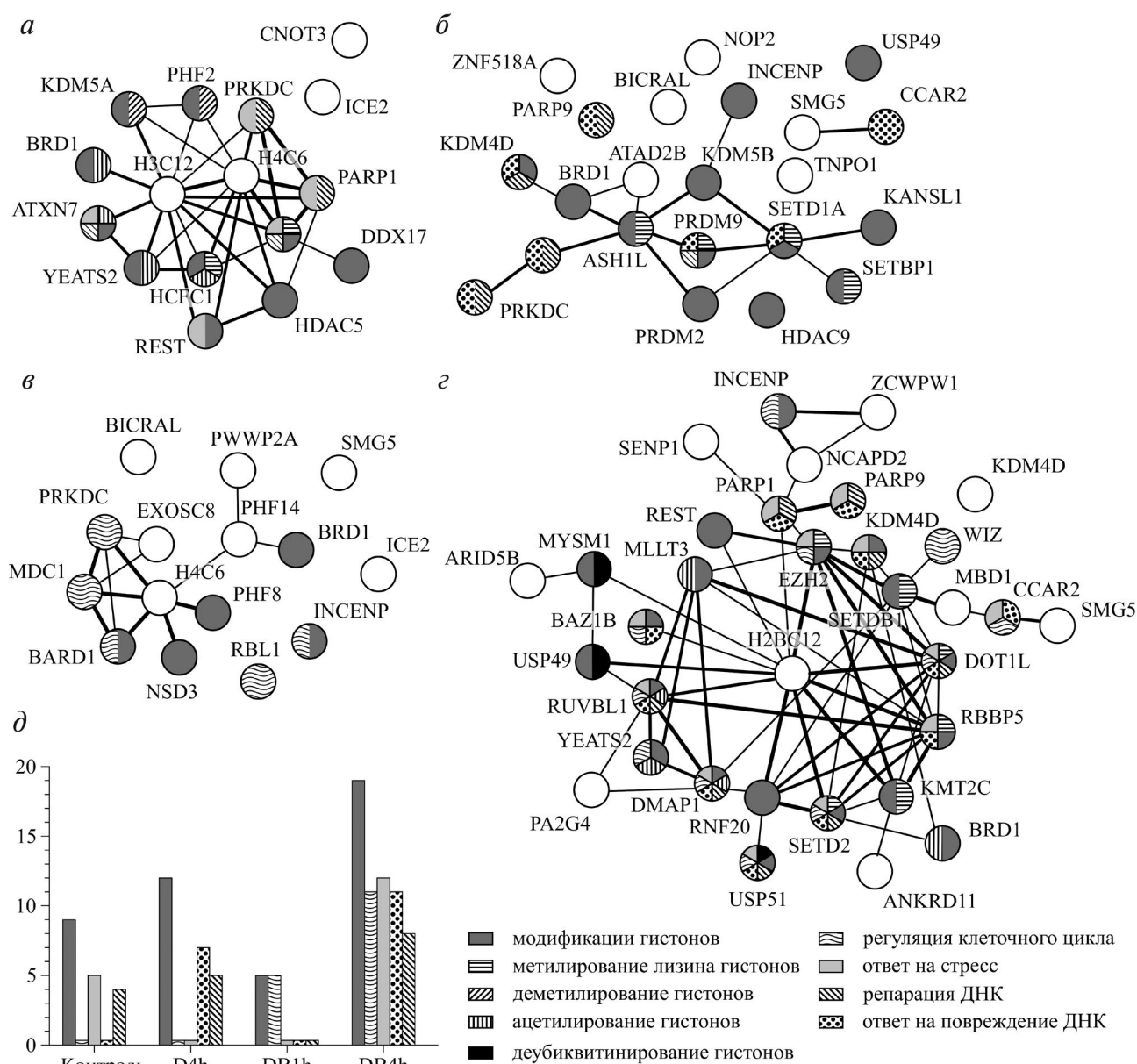


Рис. 2. Ub-белки, связанные с гистонами и регуляцией гистонного кода. *а* – Контроль, *б* – D4h, *в* – DB1h, *г* – DB4h, *д* – количество взаимодействующих с гистонами Ub-белков, участвующих в некоторых функционально обогащенных биологических процессах, в соответствии с базой STRING. Толщина линий указывает на степень достоверности, 0.4 – средняя, 0.7 – высокая, 0.9 – очень высокая. Все полученные группы были достоверно обогащены функциональными связями между белками по сравнению со случайным набором белков аналогичного размера (PPI enrichment p -value: 1.01×10^{-8} , 2.1×10^{-7} , 6.65×10^{-5} и 1.0×10^{-16} для контроля, D4h, DB1h и DB4h соответственно).

на его ключевую роль в регуляции гистонного кода при инициации параптоза. H2BC12 моноубиквитинируется при активации транскрипции; его деубиквитинирование гидролазой USP49 необходимо для эффективного сплайсинга ряда экзонов (данные UniProt). Однако, по данным литературы, H2BC12 характерен для старения фибробластов, вызванного персистирующими повреждениями ДНК, и может являться новым

биомаркером этого процесса [34]. Очень показательно, что H2BC12 в наших исследованиях был обнаружен при инициации параптоза. Возможно, убиквитинирование и другие модификации этого гистона является одним из маркеров параптозоподобной клеточной гибели, но этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Мы проанализировали обнаруженные нами в клетках Нер-2 белки, регулирующие гистонный

код через конъюгацию убиквитина (Ubl conjugation pathway). В контроле был обнаружен белок BRCA1, действующий как E3 лигаза, а в пробе DB1h — E3-убиквитин протеинлигаза BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1). В составе BRCA1-BARD1 комплекса они участвуют в моноубиквитинировании гистонов H2A, H2B, H3 и H4 и в ответе на повреждение ДНК [6]. BRCA1 самоубиквитинируется в процессе ПТМ, что не ведет к деградации. Убиквитинирование BARD1 лигазой RNF19A ведет к выходу из гетеродимера BRCA1-BARD1 и последующему перемещению из ядра в цитоплазму [35]. BARD1 процессируется, в частности, при апоптозе и в таком виде более чувствителен к расщеплению. Вероятно, убиквитинирование этого белка означает, что при параптозе его протеолиз также может происходить, т.к. ни гетеродимера, ни BRCA1 в пробе DB1h не было обнаружено. Отметим, что этот белок был окислен, что может указывать на его повреждение оксипроизводными ДСФ. Воздействие неокисленных дитиокарбаматов (1 mM DDC) не вызывало увеличения количества Ubl-конъюгирующих ферментов: в пробе D4h мы обнаружили лишь убиквитин-карбоксилтерминальную гидролазу USP49, участвующую в деубиквитинировании остатка Lys-120 гистона H2B, которое, по данным UniProt, необходимо для эффективного сплайсинга экзонов. Эта же гидролаза, а также гидролаза USP51, белки RNF20 и MYSM1 были найдены при инициации параптоза в пробе DB4h. RNF20, главная H2B-убиквитинирующая E3-убиквитин протеинлигаза BRE1A, играет ведущую роль в регуляции гистонов и экспрессии генов; она моноубиквитинирует гистон H2B по Lys-120, что является эпигенетической меткой для активации транскрипции и метилирования гистона H3 [6]. Деубиквитиназа MYSM1 удаляет убиквитин с гистона H2A, что является меткой для подавления транскрипции и отщепления гистона H1 от нуклеосомы. Убиквитин-карбоксилтерминальная гидролаза USP51 деубиквитинирует гистон H2A по Lys-14 и Lys-16, давая метку для восстановления поврежденной ДНК в местах двойных разрывов и регулируя ассоциацию/диссоциацию TP53BP1 и BRCA1. Убиквитинирование этих белков, согласно UniProt, не является их ПТМ. Возможно, в убиквитинированном состоянии они направлялись к протеасомам вследствие повреждения/неулучшения, так же, как и остальные модификаторы гистонов, о которых речь пойдет далее.

Для ферментов гистонов и убиквитинирование, по данным литературы, может являться не только их ПТМ, но и сигналом к протеолизу [8, 52]. Мы проанализировали состав важнейших

регуляторов гистонов (табл. 1) и роль убиквитинирования в их функционировании. Обнаруженные белки гистонов (де)метилование и (де)ацетилование. Как известно, влияние ПТМ гистонов на их функции зависит от типа и места расположения. Так, ацетилование лизина, повышающее отрицательный заряд молекулы гистона, облегчает доступ к ДНК и приводит к усилению транскрипции [1, 3, 8]. Метилирование по Lys-4 (H3K4), H3K36 и H3K79 в целом связано с активацией транскрипции [8], кроме того, метилированные H3K79 и H4K20 участвуют, как считается, в процессе репарации ДНК [1, 8]. Напротив, метилирование H3K9 или H3K27 гистона H3 ведет к более сильному взаимодействию с молекулой ДНК и, в частности, к более плотной упаковке гетерохроматина. Это приводит к подавлению экспрессии генов [1, 8, 53]; в то же время метилирование аргинина активирует этот процесс. Таким образом, конечный результат метилирования лизина, как и остальные ПТМ, зависит не только от изменения заряда молекулы, но и от наличия рядом других модификаций или белков-регуляторов, а также от самого местоположения данной ПТМ. Метилирование может происходить по одному, двум или трем остаткам лизина, что еще больше повышает вариативность гистонов. Отметим, что деметилирование лизина было открыто сравнительно недавно, что опровергло гипотезу о необратимости метилирования лизинов [54].

В контроле не было найдено убиквитинированных гистон-лизин-N-метилтрансфераз, но были обнаружены лизин-специфические деметилазы — RNF2, для которых роль убиквитинирования пока окончательно не ясна, и один из главных регуляторов гистонов KDM5A, специфически деметилирующий H3K4. Убиквитинирование этого фермента сопровождается его протеолизом [37]. В пробе D4h, где не происходит никаких морфологических изменений ядра (рис. 1б), но отмечается слабый цитостатический эффект [30], были обнаружены убиквитинированные гистон-лизин-N-метилтрансферазы: ASH1L, метилирующая H3K36 и H3K9 и ингибирующая NF-κB и MAPK сигнальные пути [55], PRDM9 с активностью в отношении H3K4, H3K36, H3K9 и H3K20, и SETD1A, который через метилирование H3K4 и H3K36 регулирует активность гистона H3, ремоделирование хроматина, транскрипцию и репарацию сайтов повреждения ДНК. Метилирование гистонов выполнял также белок SETBP1 (H3K4 и H3K36) и, по данным UniProt, которые не совпадают с данными STRING (рис. 2 д), — белок

Таблица 1. Убиквитинированные белки, связанные с регуляцией гистонов кода клеток HEp-2 в контроле, пробах DB1h, D4h и пробе DB4h (при инициации параптоза)

Проба	Идентификатор	Название белка, <i>ген</i>	Назначение убиквитинирования	Ссылки
Контроль	P38398	Белок восприимчивости к раку молочной железы 1 типа, <i>BRCA1</i>	ПТМ	UniProt
>>	Q9UQL6	Гистоновая деацетилаза 5, <i>HDAC5</i>	Протеолиз	[36, 37]
>>	O75151	Лизин-специфическая деметилаза PHF2, <i>PHF2</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	P29375	Лизин-специфическая деметилаза 5A, <i>KDM5A</i>	Протеолиз	[37]
>>	Q9ULM3	Белок 2, содержащий домен YEATS, <i>YEATS2</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	P78527	Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы, <i>PRKDC</i>	Протеолиз	[38]
>>	P09874	Поли(ADP-рибозо)полимераза 1, <i>PARP1</i>	Протеолиз, ПТМ	[39, 40]
>>	O15265	Атаксин-7, <i>ATXN7</i>	Протеолиз, ПТМ	[41], UniProt
D4h	Q70CQ1	Убиквитин-карбоксиконцевая гидролаза 49, <i>USP49</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q9NR48	Гистон-лизин-N-метилтрансфераза ASH1L, <i>ASH1L</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q9NQV7	Гистон-лизин-N-метилтрансфераза PRDM9, <i>PRDM9</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	O15047	Гистон-лизин-N-метилтрансфераза SETD1A, <i>SETD1A</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q9Y6X0	SET-связывающий белок, <i>SETBP1</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q13029	PR-домен белка цинковых пальцев 2, <i>PRDM2</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q6B0I6	Лизин-специфическая деметилаза 4D, <i>KDM4D</i>	Протеолиз	[42]
>>	Q9UGL1	Лизин-специфическая деметилаза 5B, <i>KDM5B</i>	Протеолиз	[43]
>>	Q9UKV0	Гистоновая деацетилаза 9, <i>HDAC9</i>	роль Ub неясна	[36]
>>	Q7Z3B3	Субъединица 1 регуляторного комплекса NSL KAT8, <i>KANSL1</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	P78527	Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы, <i>PRKDC</i>	Протеолиз	[38]
>>	Q8IXQ6	Белковая моно-ADP-рибозилтрансфераза PARP9, <i>PARP9</i>	Не ПТМ	UniProt
DB1h	Q99728	Белок 1 домена RING, связанный с BRCA1, <i>BARD1</i>	Протеолиз	[35]
>>	Q9BZ95	Гистон-лизин-N-метилтрансфераза NSD3, <i>NSD3</i>	Протеолиз	[44]
>>	Q9UPP1	Гистон-лизин-деметилаза PHF8, <i>PHF8</i>	Протеолиз	[45]
>>	O94880	PHD пальцевый белок 14, <i>PHF14</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	P28749	Ретинобластомоподобный белок 1, <i>RBL1</i>	Протеолиз, ПТМ	[46]
>>	Q96N64	Белок 2A, содержащий домен PWWP, <i>PWWP2A</i>	Не ПТМ	UniProt

>>	P78527	Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы, <i>PRKDC</i>	Протеолиз	[38]
DB4h	Q5VTR2	Е3 убиквитин-белковая лигаза BRE1A, <i>RNF20</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q5VVJ2	Деубиквитиназа MYSM1, <i>MYSM1</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q70CQ1	Убиквитин-карбоксиконцевая гидролаза 49, <i>USP49</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q70EK9	Убиквитин-карбоксиконцевая гидролаза 51, <i>USP51</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q8TEK3	Гистон-лизин-N-метилтрансфераза, специфичная к лизину 79 гистона H3, <i>DOT1L</i>	Протеолиз	[47]
>>	Q15910	Гистон-лизин-N-метилтрансфераза EZH2, <i>EZH2</i>	Протеолиз	[8]
>>	Q15047	Гистон-лизин-N-метилтрансфераза SETDB1, <i>SETDB1</i>	Регуляция активности, протеолиз	[48, 49]
>>	Q9BYW2	Гистон-лизин-N-метилтрансфераза SETD2, <i>SETD2</i>	Протеолиз	[8]
>>	Q8NEZ4	Гистон-лизин-N-метилтрансфераза 2C, <i>KMT2C</i>	Протеолиз	[50]
>>	Q15291	Ретинобластома-связывающий белок 5, <i>RBBP5</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q9H0M4	Белок 1 домена PWWP типа CW с цинковым пальцем, <i>ZCWPW1</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	P42568	Protein AF-9, <i>MLLT3</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q6B0I6	Лизин-специфическая деметилаза 4D, <i>KDM4D</i>	Протеолиз	[42]
>>	Q9NPF5	Белок 1, ассоциированный с ДНК-метилтрансферазой 1, <i>DMAPI</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q9ULM3	Белок 2, содержащий домен YEATS, <i>YEATS2</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q9Y265	RuvB-подобный 1, <i>RUVBL1</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q6UB99	Белок 11, содержащий домен повторов анкирина, <i>ANKRD11</i>	Протеолиз	[51]
>>	Q9UQ80	Белок 2G4, связанный с пролиферацией, <i>PA2G4</i>	Протеолиз	UniProt
>>	P09874	Поли(ADP-рибозо)полимераза 1, <i>PARP1</i>	ПТМ, Протеолиз	[39, 40]
>>	Q8IXQ6	Белковая моно-ADP-рибозилтрансфераза PARP9, <i>PARP9</i>	Не ПТМ	UniProt
>>	Q9UIG0	Тирозин-протеинкиназа BAZ1B, <i>BAZ1B</i>	Не ПТМ	UniProt

Примечание. Представлены суммированные данные трех независимых экспериментов.

PRDM2 (H3K9), не входящие в семейство гистон-лизин-N-метилтрансфераз. Роль убиквитинирования в регуляции работы этих ферментов не установлена, но UniProt не содержит указаний, что убиквитинирование является их ПТМ (табл. 1). KDM5B и KDM4D, лизин-специфические деметилазы 5B и 4D, регулируют деметилирование H3K4

и H3K9, тем самым играя главную роль в гистоновом коде, согласно UniProt. Их уровень в клетке регулируется убиквитинированием [42, 43].

В пробе DB1h обнаружены убиквитинированные гистон-лизин-N-метилтрансфераза NSD3, гистон-лизин-деметилаза PHF8, белки PHF14

и RBL1. NSD3 диметилирует гистон H3 и в зависимости от локализации или активирует (H3K4), или подавляет (H3K27) транскрипцию. PNF8 деметилирует H3K9, а также диметилирует H3K27 и монометилирует гистон H4, таким образом, в зависимости от местоположения лизинового остатка являясь активатором транскрипции или же репрессором, контролирующим G1-S переход клеточного цикла. RBL1 контролирует работу метилтрансфераз и триметилирование H4K20. Убиквитинирование этих белков ведет к их расщеплению [44–46]. Для PNF14, снижающего уровень триметилированного H3K4, убиквитинирование не является ПТМ, но данных о его роли в протеасомной деградации на настоящий момент нет.

В клетках с необратимыми повреждениями, ведущими к близкой параптозоподобной гибели (проба DB4h), обнаружено несколько представителей семейства гистон-лизин-N-метилтрансфераз: EZH2, SETDB1, SETD2, KMT2C, DOT1L, а также компонент метилтрансферазных комплексов RBBP5, стимулирующий метилирование H3K4 и регулирующий активность KMT2C и SETDB1. EZH2 и SETDB1 метилируют Lys-9 и Lys-27 гистона H3, подавляя транскрипцию. SETD2, KMT2C, DOT1L метилируют Lys-36, Lys-4 и Lys-70 гистона H3, являясь регуляторами ремоделирования хроматина, транскрипции и репарации ДНК. ZCWPW1, ридер двойного метилирования гистонов H3K4 и H3K36, также был найден при инициации параптоза; роль убиквитинирования этого фермента пока не установлена, но оно не относится к ПТМ. Отметим, что моноубиквитинирование SETDB1 является его ПТМ, необходимой для осуществления основной энзиматической функции [48]. Лизин-специфическая деметилаза 4D (KDM4D), деметилирующая H3K9, что означает активацию транскрипции, также относится к главным регуляторам гистонного кода. Установлено, что полиубиквитинирование большинства белков данной пробы, связанных с метилированием гистонов (SETD2, DOT1L, SETDB1, EZH2, KDM4D, KMT2C), приводит к их деградации [8, 42, 47, 49, 50].

Таким образом, метилирование гистонов, обнаруженное в клетках HEp-2, направлено как на стимуляцию, так и на подавление экспрессии генов, а убиквитинирование белков, участвующих в этом процессе, во многих случаях сопровождается последующим расщеплением протеасомой.

Среди регуляторов гистонного кода, убиквитинированных в клетках HEp-2, мы также обнаружили де- и ацетилирующие ферменты. В контроле это гистон-деацетилаза HDAC5, активная в отношении гистонов H2A, H2B, H3 и H4 и выполняющая роль

в регуляции транскрипции и регуляции клеточного цикла, и YEATS2, белок-ридер в составе комплекса, деацетилирующего гистоны H3 и H4. Результатом убиквитинирования HDAC5 является его протеолиз [36, 37], в отношении YEATS2 таких данных не опубликовано. Для найденного в контроле ATXN7, выполняющего функцию ацетилирования гистона H3, убиквитинирование может быть и ПТМ (согласно UniProt), и направлением на деградацию [41]. В пробе D4h также были обнаружены регуляторы де- и ацетилирования гистона H3: ацетилаза KANSL1, регулирующая транскрипцию через ацетилирование гистона H3, и деацетилаза HDAC9, активная в отношении коровых гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Как видно из табл. 1, роль убиквитинирования в судьбе этих и многих других белков группы D4h пока окончательно не установлена. Так, в работе [36] не смогли обнаружить деградацию HDAC9, хотя остальные изученные белки HDAC1–8 и 10 после убиквитинирования подвергались расщеплению. В пробе DB1h регуляцию транскрипции через ацетилирование гистонов осуществлял PWWP2A; убиквитинирование не является его ПТМ. В пробе DB4h мы также обнаружили убиквитинированный белок-ридер YEATS2 (см. выше). Деацетилирование выполнял и ANKRD11, чье убиквитинирование указывает на деградацию молекулы [51]. Ридер хроматина MLLT3, компоненты NuA4 гистон-ацетилтрансферазного комплекса RUVBL1 и DMAP1, связанный с пролиферацией белок PA2G4, найденные в этой пробе, также через ацетилирование гистонов участвуют в регуляции транскрипции. Их убиквитинирование не является ПТМ, а для PA2G4 прямо указывает на последующую деградацию (UniProt). В этой пробе были также обнаружены Ub-белки, служащие основой для ацетилтрансферазных и метилтрансферазных комплексов, и ингибиторы ферментов гистонного кода (не включены в табл. 1) – REST, CCAR2, WIZ, MBD1, ARID5B; для всех этих белков убиквитинирование не является ПТМ, а для REST является указанием на протеолиз. Белок REST был найден также в контроле, а CCAR2 – в пробе D4h. Отметим, что во всех пробах был обнаружен убиквитинированный BRD1 с функцией ридера гистонов (histone reader activity), являющийся основой для гистон-ацетилтрансферазных комплексов; убиквитинирование является его ПТМ (UniProt).

Помимо убиквитинирования, ацетилирования и метилирования, гистоны могут также подвергаться другим ковалентным модификациям – фосфорилироваться, сумоилироваться, кротонилироваться, биотинилироваться, бутирилироваться, N-формилироваться, деиминироваться

и поли-ADP-рибозилироваться [1, 2, 4]. Роль фосфорилирования гистонов (например, по серину-9 и -14) в гистоновом коде заключается как в активации транскрипции, так и в конденсации и фрагментации хроматина при апоптозе [1, 56]. PRKDC, фосфорилирующая гистон H2 в ответ на повреждение ДНК, была обнаружена в контроле, пробе D4h и DB1h. Убиквитинирование PRKDC ведет к протеасомной деградации [38]. Тирозин-протеинкиназа BAZ1B, обнаруженная при инициации параптоза (DB4h), является главным регулятором перестройки хроматина и участвует в ответе на повреждение ДНК путем фосфорилирования Туг-142 гистона H2AX. Ее убиквитинирование, согласно UniProt, не является ПТМ.

В восстановлении поврежденной ДНК клеток большую роль играет также такая ПТМ, как ADP-рибозилирование. Поли(ADP-рибозо)полимераза 1 (PARP1), инициатор репарации разрывов ДНК, была обнаружена в контроле и пробе DB4h. В последней также были найдены протеин-моно-ADP-рибозилтрансфераза PARP15, не связанная с гистоновым кодом, и PARP9, неактивная в свободном состоянии. PARP1-зависимый комплекс PARP9 с Е3 лигазой DTX3L (PARP9-DTX3L) быстро и специфически доставляется к местам повреждения ДНК, что необходимо для эффективного негомологичного соединения ее концов в местах двухцепочечных разрывов (NHEJ), а также связывается с убиквитином и препятствует убиквитинированию субстратов, в том числе и гистонов. Обнаружение PARP1 в убиквитинированном состоянии может указывать на последующую деградацию, а также в некоторых случаях является ПТМ [39, 40]. Для PARP9, не связанной с DTX3L, данные о роли убиквитинирования отсутствуют, однако в базе UniProt оно не относится к ПТМ. PARP9, не связанная с другими белками, была также обнаружена в пробе D4h.

Таким образом, при инициации параптозоподобной клеточной гибели (проба DB4h), наряду с повреждениями ЭПР и ретроградного транспорта [9] происходит увеличение убиквитинирования белков-регуляторов гистоновой кода, которое свидетельствует о наличии повреждений ДНК и ядра. Протеасомная деградация убиквитинированных белков – рутинная процедура удаления поврежденных или ставших ненужными белков клетки, а активация этого процесса является индикатором массового повреждения и указанием на возможную клеточную гибель, в случае действия ДСФокси – на инициацию параптоза. Среди убиквитинированных гистон-лизинметилтрансфераз, обнаруженных при инициации параптозоподобной гибели, большинство составляли активаторы

транскрипции. Однако, как указано выше, посредством полиубиквитинирования эти белки направляются на деградацию [8, 42, 47, 49, 50]. Деметилаза KDM4D, участвующая в регуляции транскрипции, также после убиквитинирования расщепляется протеасомами. Деградация может быть результатом убиквитинирования и остальных регуляторов метилирования, обнаруженных в этой пробе, так как убиквитинирование не является их ПТМ [8, 42, 47, 49, 50]. То есть при инициации параптозоподобной гибели происходит протеасомная деградация регуляторов метилирования гистонов, отвечающих за инициацию транскрипции и репарацию поврежденных участков ДНК. Для найденных в этой пробе гистон-ацетилирующих ферментов и фосфорилазы гистонов BAZ1B, активирующих транскрипцию и репарацию ДНК, роль убиквитинирования также состоит в подготовке к деградации (ANKRD11) или пока еще не установлена, но не связана с ферментативной активностью (компоненты NuA4, YEATS2, BAZ1B). В этой пробе в повышенном по сравнению с остальными белками количестве представлены и Ubl-конъюгирующие ферменты. Их роль в основном состоит в регуляции транскрипции и репарации повреждений ДНК. Обнаружение их в убиквитинированном состоянии не является однозначным указанием на последующую протеасомную деградацию вследствие повреждения молекулы, но этот вариант возможен. В частности, ранее мы установили, что деубиквитиназа UCHL5, участвующая в репарации ДНК и отвечающая за отщепление убиквитина перед протеасомной деградацией несобранных /поврежденных белков, была окислена и убиквитинирована при инициации параптоза посредством ДСФокси [9], что, по данным UniProt, не является ее ПТМ и может быть указанием на дальнейшую деградацию.

В остальных пробах было обнаружено слишком малое количество ферментов гистоновой кода, чтобы можно было делать выводы о характере идущих в них процессов, однако речь может идти о балансе процессов, характерном для обычной жизнедеятельности или нелетального повреждения.

Таким образом, повреждение ядра и нарушение регуляции гистоновой кода при инициации параптозоподобной гибели клеток НЕР-2 посредством ДСФокси происходит одновременно с развитием несовершенного белкового ответа, ингибированием ретроградного транспорта белков и стрессом ЭПР, обнаруженными нами ранее, что указывает на плейотропный характер механизма запуска этой гибели, наличие множественных внутриклеточных мишеней, повреждающихся при действии этих агентов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-01025-23-01 на 2023 г.). Исследование проводилось с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (<http://ckp-rf.ru/ckp/3037/>).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cohen I., Poręba E., Kamieniarz K., Schneider R. 2011. Histone modifiers in cancer: Friends or foes? *Genes Cancer*. **2** (6), 631–647. doi 10.1177/1947601911417176.
- Audia J.E., Campbell R.M. Histone modifications and cancer. 2016. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8** (4), a019521. doi 10.1101/cshperspect.a019521.
- Карпенко Д.В., Петинати Н.А., Дризе Н.И., Бигильдеев А.Е. Роль эпигенетических модификаций ДНК и гистонов в лечении онкогематологических заболеваний. 2021. *Гематол. и трансфузиол.* **66** (2), 263–279. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-2-263-279>
- Oss-Ronen L., Sarusi T., Cohen I. 2022. Histone mono-ubiquitination in transcriptional regulation and its mark on life: Emerging roles in tissue development and disease. *Cells*. **11** (15), 2404. <https://doi.org/10.3390/cells11152404>.
- Кудряева А.А., Липкин В.М., Белогуров А.А. 2020. Топологические особенности моноубиквитинирования гистона H2A. *Докл. РАН. Науки о жизни.* **493** (1), 367–372. doi 10.31857/S2686738920040125.
- Бачева А.В., Готманова Н.Н., Белогуров А.А., Кудряева А.А. 2021. Контроль генома через призму вариативности гистон-модифицирующих убиквитин-лигаз. *Успехи биол. химии.* **61**, 155–202. doi 10.1134/S0006297921140066.
- Shen E., Shulha H., Weng Z., Akbarian S. 2014. Regulation of histone H3K4 methylation in brain development and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **369** (1652). 20130514 doi 10.1098/rstb.2013.0514.
- Wang J., Qiu Z., Wu Y. 2018. Ubiquitin regulation: The histone modifying enzyme's story. *Cells*. **7** (9), 118. <https://doi.org/10.3390/cells7090118>
- Solovieva M., Shatalin Y., Odinkova I., Krestinina O., Baburina Y., Lomovskaya Y., Pankratov A., Pankratova N., Buneva O., Kopylov A., Medvedev A., Akatov V. 2022. Disulfiram oxy-derivatives suppress protein retrotranslocation across the ER membrane to the cytosol and initiate paraptosis-like cell death. *Membranes*. **12** (9), 845. <https://doi.org/10.3390/membranes12090845>.
- Shimazu S., Takahata K., Tamashiro A., Yoneda F., Iida Y., Saji H. 2003. Recovery of motor function and dopaminergic parameters in a mouse model of Parkinson's disease induced by co-administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and diethyldithiocarbamate. *J. Neural. Transm.* **110**, 871–883. doi 10.1007/s00702-003-0002-1.
- Yang C.-H., Fang I.-M., Lin C.-P., Yang C.-M., Chen M.-S. 2005. Effects of the NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate on experimentally induced autoimmune anterior uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 1339–1347. doi 10.1167/iovs.04-0640.
- Castillo-Villanueva A., Rufino-González Y., Méndez S.T., Torres-Arroyo A., Ponce-Macotela M., Martínez-Gordillo M.N., Reyes-Vivas H., Oria-Hernández J. 2017. Disulfiram as a novel inactivator of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase with anti-giardial potential. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **7** (3), 425–432. doi 10.1016/j.ijpddr.2017.11.003.
- Liegner K.B. 2019. Disulfiram (tetraethylthiuram disulfide) in the treatment of Lyme disease and babesiosis: report of experience in three cases. *Antibiotics*. **8** (2), 72. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020072>.
- Xing S., Bullen C.K., Shroff N.S., Shan L., Yang H.C., Manucci J.L., Bhat S., Zhang H., Margolick J.B., Quinn T.C., Margolis D.M., Siliciano J.D., Siliciano R.F. 2011. Disulfiram reactivates latent HIV-1 in a Bcl-2-transduced primary CD4+ T cell model without inducing global T cell activation. *J. Virol.* **85**, 6060–6064. <https://doi.org/10.1128/jvi.02033-10>.
- Liu T., Wang P., Cong M., Zhao X., Zhang D., Xu H., Liu L., Jia J., You H. 2018. Diethyldithiocarbamate, an anti-abuse drug, alleviates steatohepatitis and fibrosis in rodents through modulating lipid metabolism and oxidative stress. *Br.J. Pharmacol.* **175**, 4480–4495. doi 10.1111/bph.14503.
- Jakola A.S., Werlenius K., Mudaisi M., Hylin S., Kinhult S., Bartek J. Jr, Salvesen Ø., Carlsen S.M., Strandéus M., Lindskog M., Löfgren D., Rydenhag B., Carstam L., Gulati S., Solheim O., Bartek J., Solheim T. 2018. Disulfiram repurposing combined with nutritional copper supplement as add-on to chemotherapy in recurrent glioblastoma (DIRECT): Study protocol for a randomized controlled trial. *F1000Res.* **15**, 1797. doi 10.12688/f1000research.16786.
- Kita Y., Hamada A., Saito R., Teramoto Y., Tanaka R., Takano K., Nakayama K., Murakami K., Matsumoto K., Akamatsu S., Yamasaki T., Inoue T., Tabata Y., Okuno Y., Ogawa O., Kobayashi T. 2019. Systematic chemical screening identifies disulfiram as a repurposed drug that enhances sensitivity to cisplatin in bladder cancer: A summary of preclinical studies. *Br.J. Cancer.* **121**, 1027–1038. doi 10.1038/s41416-019-0609-0.
- Ekinci E., Rohondia S., Khan R., Dou Q.P. 2019. Repurposing disulfiram as an anti-cancer agent: Updated review on literature and patents. *Recent Pat. Anticancer*

- Drug Discov.* **14**, 113–132. doi 10.2174/1574892814666190514104035.
19. Solovieva M., Shatalin Y., Odinkova I., Krestinina O., Baburina Y., Mishukov A., Lomovskaya Y., Pavlik L., Mikheeva I., Holmuhamedov E., Akatov V. 2022. Disulfiram oxy-derivatives induce entosis or paraptosis-like death in breast cancer MCF-7 cells depending on the duration of treatment. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1866**, 130184. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130184>.
 20. Burger A., Amemiya Y., Kitching R., Seth A.K. 2006. Novel RING E3 ubiquitin ligases in breast cancer. *Neoplasia*. **8**, 689–695. <https://doi.org/10.1593/neo.06469>.
 21. Kona F.R., Buac D., Burger A.M. 2011. Disulfiram, and disulfiram derivatives as novel potential anticancer drugs targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. *Curr. Cancer Drug Targets*. **11**, 338–346. doi 10.2174/156800911794519798.
 22. Chen D., Cui Q.C., Yang H., Dou Q.P. 2006. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.* **66**, 10425–10433. doi 10.1158/0008-5472.CAN-06-2126.
 23. Huang H., Liao Y., Liu N., Hua X., Cai J., Yang C., Long H., Zhao C., Chen X., Lan X. et al. 2016. Two clinical drugs deubiquitinase inhibitor auranofin and aldehyde dehydrogenase inhibitor disulfiram trigger synergistic anti-tumor effects in vitro and in vivo. *Oncotarget*. **19**, 2796–2808. doi 10.18632/oncotarget.6425.
 24. Lövborg H., Oberg F., Rickardson L., Gullbo J., Nygren P., Larsson R. 2006. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor- κ B translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int. J. Cancer*. **118** (6), 1577–1580. doi 10.1002/ijc.21534.
 25. Kumari N., Jaynes P.W., Saei A., Iyengar P.V., Richard J.L.C., Eichhorn P.J.A. 2017. The roles of ubiquitin modifying enzymes in neoplastic disease. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. **1868**, 456–483. doi 10.1016/j.bbcan.2017.09.002.
 26. Buneeva O., Kopylov A., Kapitsa I., Ivanova E., Zgoda V., Medvedev A. 2018. The Effect of neurotoxin MPTP and neuroprotector isatin on the profile of ubiquitinated brain mitochondrial proteins. *Cells*. **7** (8), 91. <https://doi.org/10.3390/cells7080091>.
 27. Shatalin Y. 2022. Analysis of human carcinoma HEp-2 cell ubiquitome during the initiation of paraptosis-like death by disulfiram oxy-derivatives. *Mendeley Data*, V1. doi 10.17632/fjjtrfv5rv.1 <https://data.mendeley.com/datasets/fjjtrfv5rv/1>
 28. Szklarczyk D., Gable A.L., Nastou K.C., Lyon D., Kirsch R., Pyysalo S., Doncheva N.T., Legeay M., Fang T., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. 2021. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucl. Acids Res.* **49** (D1), D605–D612. doi 10.1093/nar/gkaa1074.
 29. Solovieva M.E., Shatalin Y.V., Solovyev V.V., Sazonov A.V., Kutysheko V.P., Akatov V.S. 2019. Hydroxycobalamin catalyzes the oxidation of diethyldithiocarbamate and increases its cytotoxicity independently of copper ions. *Redox Biol.* **20**, 28–37. doi 10.1016/j.redox.2018.09.016.
 30. Solovieva M., Shatalin Y., Fadeev R., Krestinina O., Baburina Y., Kruglov A., Kharechkina E., Kobayakova M., Rogachevsky V., Shishkova E., Akatov V.S. 2020. Vitamin B_{12b} enhances the cytotoxicity of diethyldithiocarbamate in a synergistic manner, inducing the paraptosis-like death of human larynx carcinoma cells. *Biomolecules*. **10** (1), 69. <https://doi.org/10.3390/biom10010069>.
 31. Wang Z., Zhang H., Liu J., Cheruiyot A., Lee J.H., Ordog T., Lou Z., You Z., Zhang Z. 2016. USP51 deubiquitylates H2AK13,15ub and regulates DNA damage response. *Genes Dev.* **30** (8), 946–959. doi 10.1101/gad.271841.115.
 32. Cao J., Yan Q. 2012. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front. Oncol.* **2**:26. doi 10.3389/fonc.2012.00026.
 33. Wang H., Zhai L., Xu J., Joo H.Y., Jackson S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Xiong Y., Zhang Y. 2006. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol. Cell*. **22**, 383–394. doi 10.1016/j.molcel.2006.03.035.
 34. Contrepois K., Mann C., Fenaille F. 2021. H2B type 1-K accumulates in senescent fibroblasts with persistent DNA damage along with methylated and phosphorylated forms of HMGAI. *Proteomes*. **9** (2), 30. doi 10.3390/proteomes9020030.
 35. Zhu Q., Huang J., Huang H., Li H., Yi P., Kloeber J.A., Yuan J., Chen Y., Deng M., Luo K., Gao M., Guo G., Tu X., Yin P., Zhang Y., Su J., Chen J., Lou Z. 2021. RNF19A-mediated ubiquitination of BARD1 prevents BRCA1/BARD1-dependent homologous recombination. *Nat. Commun.* **12**, 6653. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27048-3>.
 36. Xiong Y., Donovan K.A., Eleuteri N.A., Kirmani N., Yue H., Razov A., Krupnick N.M., Nowak R.P., Fischer E.S. 2021. Chemo-proteomics exploration of HDAC degradability by small molecule degraders. *Cell Chem. Biol.* **28** (10), 1514–1527. doi 10.1016/j.chembiol.2021.07.002.
 37. Li S., He J., Liao X., He Y., Chen R., Chen J., Hu S., Sun J. 2023. FBXO22 inhibits metastasis in triple-negative breast cancer through ubiquitin modification of KDM5A and regulation of H3K4me3 demethylation. *Cell Biol. Toxicol.* **39** (4), 1641–1655. doi 10.1007/s10565-022-09754-w.
 38. Ho S.R., Mahanic C.S., Lee Y.J., Lin W.C. 2014. RNF144A, an E3 ubiquitin ligase for DNA-PKcs, promotes apoptosis during DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111** (26), E2646–E2655. doi 10.1073/pnas.1323107111

39. Zhang N., Zhang Y., Qian H., Wu S., Cao L., Sun Y. 2020. Selective targeting of ubiquitination and degradation of PARP1 by E3 ubiquitin ligase WWP2 regulates isoproterenol-induced cardiac remodeling. *Cell Death Differ.* **27** (9), 2605–2619. doi 10.1038/s41418-020-0523-2.
40. Krastev D.B., Li S., Sun Y., Wicks A.J., Hoslett G., Weekes D., Badder L.M., Knight E.G., Marlow R., Parado M.C., Yu L., Talele T.T., Bartek J., Choudhary J.S., Pommier Y., Pettitt S.J., Tutt A.N.J., Ramadan K., Lord C.J. 2022. The ubiquitin-dependent ATPase p97 removes cytotoxic trapped PARP1 from chromatin. *Nat. Cell Biol.* **24**, 62–73. doi 10.1038/s41556-021-00807-6.
41. Barman P., Kaja A., Chakraborty P., Guha S., Roy A., Ferdoush J., Bhaumik S.R. 2023. A novel ubiquitin-proteasome system regulation of Sgf73/ataxin-7 that maintains the integrity of the coactivator SAGA in orchestrating transcription. *Genetics*. **224** (3), iyad071. doi 10.1093/genetics/iyad071.
42. Liu D., Zhao Z., She Y., Zhang L., Chen X., Ma L., Cui J. 2022. TRIM14 inhibits OPTN-mediated autophagic degradation of KDM4D to epigenetically regulate inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **119** (7), e2113454119. doi 10.1073/pnas.2113454119.
43. Liu Y., Zhou Y. 2022. Circ_0087960 stabilizes KDM5B by reducing SKP2 mediated ubiquitination degradation and promotes osteogenic differentiation in periodontal ligament stem cells. *Regen. Ther.* **19**, 122–130. doi 10.1016/j.reth.2022.01.003.
44. Xu C., Meng F., Park K.S., Storey A.J., Gong W., Tsai Y.H., Gibson E., Byrum S.D., Li D., Edmondson R.D., Mackintosh S.G., Vedadi M., Cai L., Tackett A.J., Kaniskan H.Ü., Jin J., Wang G.G. 2022. A NSD3-targeted PROTAC suppresses NSD3 and cMyc oncogenic nodes in cancer cells. *Cell Chem. Biol.* **29** (3), 386–397. doi 10.1016/j.chembiol.2021.08.004
45. Lim H.J., Dimova N.V., Tan M.K., Sigoillot F.D., King R.W., Shi Y. 2013. The G2/M regulator histone demethylase PHF8 is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex containing CDC20. *Mol. Cell Biol.* **33** (21), 4166–4180. doi 10.1128/MCB.00689–13.
46. Macdonald J.I., Dick F.A. 2012. Posttranslational modifications of the retinoblastoma tumor suppressor protein as determinants of function. *Genes Cancer*. **3** (11–12), 619–633. doi 10.1177/1947601912473305.
47. Liu C., Yang Q., Zhu Q., Lu X., Li M., Hou T., Li Z., Tang M., Li Y., Wang H., Yang Y., Wang H., Zhao Y., Wen H., Liu X., Mao Z., Zhu W.G. 2020. CBP mediated DOT1L acetylation confers DOT1L stability and promotes cancer metastasis. *Theranostics*. **10** (4), 1758–1776. doi 10.7150/thno.39013.
48. Ishimoto K., Kawamata N., Uchihara Y., Okubo M., Fujimoto R., Gotoh E., Kakinouchi K., Mizohata E., Hino N., Okada Y., Mochizuki Y., Tanaka T., Hamakubo T., Sakai J., Kodama T., Inoue T., Tachibana K., Doi T. 2016. Ubiquitination of lysine 867 of the human SETDB1 protein upregulates its histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase activity. *PLoS One*. **11** (10), e0165766. doi 10.1371/journal.pone.0165766.
49. Timms R.T., Tchasovnikarova I.A., Antrobus R., Dougan G., Lehner P.J. 2016. ATF7IP-mediated stabilization of the histone methyltransferase SETDB1 is essential for heterochromatin formation by the HUSH complex. *Cell Rep.* **17** (3), 653–659. doi 10.1016/j.celrep.2016.09.050.
50. Xu W., Zhang X., Liu G., Zhu M., Wu Y., Jie Z., Xie Z., Wang S., Ma Q., Fan S., Fang X. 2020. Oxidative stress abrogates the degradation of KMT2D to promote degeneration in nucleus pulposus. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1866** (10), 165888. doi 10.1016/j.bbadis.2020.165888.
51. de Boer E., Ockeloen C.W., Kampen R.A., Hampstead J.E., Dingemans A.J.M., Rots D., Lütje L., Ashraf T., Baker R., Barat-Houari M., Angle B., Chatron N., Denommé-Pichon A.S., Devinsky O., Dubourg C., Elmslie F., Elloumi H.Z., Faivre L., Fitzgerald-Butt S., Geneviève D., Goos J.A.C., Helm B.M., Kini U., Lasa-Aranzasti A., Lesca G., Lynch S.A., Mathijssen I.M.J., McGowan R., Monaghan K.G., Odent S., Pfundt R., Putoux A., van Reeuwijk J., Santen G.W.E., Sasaki E., Sorlin A., van der Spek P.J., Stegmann A.P.A., Swagemakers S.M.A., Valenzuela I., Viora-Dupont E., Vitobello A., Ware S.M., Weber M., Gilissen C., Low K.J., Fisher S.E., Vissers L.E.L.M., Wong M.M.K., Kleefstra T. 2022. Missense variants in ANKRD11 cause KBG syndrome by impairment of stability or transcriptional activity of the encoded protein. *Genet Med.* **24** (10), 2051–2064. doi 10.1016/j.gim.2022.06.007.
52. Fukuura K., Inoue Y., Miyajima C., Watanabe S., Tokugawa M., Morishita D., Ohoka N., Komada M., Hayashi H. 2019. The ubiquitin-specific protease USP17 prevents cellular senescence by stabilizing the methyltransferase SET8 and transcriptionally repressing p21. *J. Biol. Chem.* **294** (44), 16429–16439. doi 10.1074/jbc.RA119.009006.
53. Butler J.S., Dent S.Y. 2013. The role of chromatin modifiers in normal and malignant hematopoiesis. *Blood*. **121** (16), 3076–3084. doi 10.1182/blood-2012-10-451237.
54. Shi Y., Lan R., Matson C., Mulligan P., Whetstine J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. **119**, 941–953. doi 10.1016/j.cell.2004.12.012.
55. Xia M., Liu J., Wu X., Liu S., Li G., Han C., Song L., Li Z., Wang Q., Wang J., Xu T., Cao X. 2013. Histone methyltransferase Ash1l suppresses interleukin-6 production and inflammatory autoimmune diseases by inducing the ubiquitin-editing enzyme A20. *Immunity*. **39** (3), 470–481. doi 10.1016/j.immuni.2013.08.016.
56. Nowak S.J., Corces V.G. 2004. Phosphorylation of histone H3: A balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet.* **20**, 214–220. doi 10.1016/j.tig.2004.02.007.

Changes in Histone Code Regulation during the Initiation of Paraptosis-Like Death of HEP-2 Tumor Cells by Oxidized Disulfiram Derivatives

© 2024 г. М. Е. Solovieva¹, *, Yu. V. Shatalin¹, V. S. Akatov¹

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Russia*

**e-mail: m_solovieva@iteb.ru*

Disulfiram (DSF) and its oxidized derivatives (DSFoxy) are currently being investigated as possible anti-cancer agents. We previously found that DSFoxy initiate paraptosis-like death of tumor cells, which is of potential interest for the treatment of tumors resistant to the initiation of apoptosis. Based on bioinformatics analysis of mass spectrometric data on protein ubiquitination, we formulated a conception about the important role of disruption of the retrograde transport of damaged proteins from the endoplasmic reticulum to the cytosol in the mechanism of initiation of paraptosis-like cell death. In the present work, it was found that DSFoxy, in the process of initiating paraptosis-like death of human adenocarcinoma HEP-2 cells, also enhances the ubiquitination of histones and histone code enzymes. In particular, this applies to the ubiquitination of histone H2BC12, histone methyltransferases responsible for transcription and repair of damaged DNA, as well as acetylating and ubiquitin-conjugating proteins. Bioinformatics analysis of changes in ubiquitination of cell nuclear proteins using the STRING database revealed during this process an increase in the occurrence of ubiquitinated proteins (functional enrichment) of cell cycle regulation, cell response to DNA damage and DNA repair, the regulation of which also depends on the histone code. This directly indicates damage to the cell nucleus and is consistent with confocal microscopy data. These results indicate that when paraptosis-like death is initiated by DSFoxy, along with impairment of retrograde transport and ER stress, there is also a change in the regulation of the histone code, which points to a pleotropic mechanism of cell death induction.

Keywords: histone code, histones, histone ubiquitination, histone methylation, paraptosis, disulfiram