

## ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА – ПРАКТИЧЕСКОМУ ЗДРАВООХРАНЕНИЮ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.11+617.51/.53]-006.04-085.277.3.015.4

Гапонова А.В., Серебрянский И.Г., Киямова Р.Г.

### РОЛЬ ГЕНОВ *RAD50* И *SMARCA5* В РЕГУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЦИСПЛАТИНУ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКА И РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, Россия

**Цель исследования** – оценка влияния генов *RAD50* и *SMARCA5* на чувствительность к цисплатину и другим ДНК-повреждающим агентам, используемым в терапии опухолевых заболеваний (5-фторурацил, олапариб), оценка роли данных генов в регуляции ответа на повреждение ДНК в клеточных линиях рака яичника (*OVCAR8*) и головы и шеи (*SCC61*, *SCC25*).  
**Материал и методы.** Нами была выполнена трансфекция опухолевых клеток малыми интерферирующими РНК (миРНК) («Qiagen», Германия) для осуществления нокдауна генов *RAD50* и *SMARCA5*, а также контрольных генов. Выживаемость опухолевых клеток в присутствии и отсутствии ДНК-повреждающих агентов оценивали спектрофотометрическим методом с использованием реагента CellTiterBlue («Promega», США). Для оценки роли *RAD50* и *SMARCA5* в регуляции ответа на повреждение ДНК мы выполнили анализ фосфорилирования гистонового белка H2AX методом иммунофлуоресцентной микроскопии.

**Результаты.** Нами было показано влияние генов *RAD50* и *SMARCA5* на выживаемость опухолевых клеток и регуляцию чувствительности к цисплатину и другим ДНК-повреждающим агентам (5-фторурацил, олапариб) в клеточных линиях рака головы и шеи (*SCC61*, *SCC25*) и рака яичника (*OVCAR8*). Полученные данные указывают на роль *SMARCA5* в регуляции базового уровня фосфорилирования гистонового белка H2AX в отсутствие повреждения ДНК.

**Заключение.** Полученные нами данные характеризуют гены *RAD50* и *SMARCA5* как перспективные терапевтические мишени в лечении и предиктивные маркеры ответа на терапию цисплатином и другими ДНК-повреждающими препаратами у пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи и раком яичника.

**Ключевые слова:** рак яичника; опухоли головы и шеи; цисплатин; химиотерапия; репарация ДНК.

**Для цитирования:** Гапонова А.В., Серебрянский И.Г., Киямова Р.Г. Роль генов *RAD50* и *SMARCA5* в регуляции чувствительности к цисплатину опухолевых клеток рака яичника и рака головы и шеи. *Российский онкологический журнал*. 2017; 22(1): 39–43. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-1-39-43>

**Для корреспонденции:** Гапонова Анна Владиславовна, младший научный сотрудник кафедры биохимии; 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, E-mail: [annagaponova28@gmail.com](mailto:annagaponova28@gmail.com).

Gaponova A.V., Serebriiskii I.G., Kiyamova R.G.

#### THE ROLE OF GENES *RAD50* AND *SMARCA5* IN REGULATION OF SENSITIVITY TO CISPLATIN IN TUMOR CELLS OF OVARIAN, HEAD AND NECK CANCER

Kazan Federal University, Kazan, 420008, Russian Federation

**Aim of the study.** To assess the role of genes *RAD50* and *SMARCA5* in regulation of sensitivity to cisplatin and other anticancer DNA damaging drugs (5-fluorouracil, olaparib), to assess the role of these genes in the response to the DNA damage in ovarian cancer (*OVCAR8*) and head and neck cancer cell lines (*SCC61*, *SCC25*).

**Material and Methods.** We used small interfering RNAs (siRNAs) (Qiagen, Germany) to deplete either *RAD50* and *SMARCA5* or control genes and under basal and DNA damaging drug-treatment conditions, we assessed cell viability with the use of Cell Titer Blue reagent (Promega, USA) with following spectrophotometry. To assess the role of genes in response to DNA damage, analysis of phospho-H2AX focus formation was performed by means of using immunofluorescence microscopy.

**Results.** We demonstrated the role of *RAD50* and *SMARCA5* in regulation of survival and sensitivity of ovarian cancer (*OVCAR8*), head and neck cancer cell lines (*SCC61*, *SCC25*) to cisplatin and other DNA damaging drugs (5-fluorouracil, olaparib). Our data suggest the role of *SMARCA5* in regulation of baseline histone H2AX protein phosphorylation in the absence of DNA damage.

**Conclusion.** Our findings characterize genes *RAD50* and *SMARCA5* as promising therapeutic targets and predictive markers for response to cisplatin and other DNA damaging drugs in patients with ovarian cancer and squamous cell carcinoma of head and neck.

**Keywords:** ovarian cancer; head and neck cancer; cisplatin; chemotherapy; DNA repair.

**For citation:** Gaponova A.V., Serebriiskii I.G., Kiyamova R.G. The role of genes *RAD50* and *SMARCA5* in regulation of sensitivity to cisplatin in tumor cells of ovarian, head and neck cancer. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*. (Russian Journal of Oncology). 2017; 22(1): 39–43. (In Russ). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-1-39-43>

**For correspondence:** Anna V. Gaponova, Junior Researcher of the Department of Biochemistry; Kazan, 420008, Russian Federation. E-mail: [annagaponova28@gmail.com](mailto:annagaponova28@gmail.com).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** A study was sponsored by a grant from the Russian Scientific Foundation (project № 15-15-20032)

Received 15 September 2016

Accepted 22 September 2016

Несмотря на прогрессивное развитие таргетных противоопухолевых препаратов, воздействующих на специфические для опухолевых клеток молекулярные мишени, применение классических химиопрепаратов с высоким цитотоксическим действием продолжает занимать значительное место в монотерапии и комбинированной терапии рака.

Цисплатин, несмотря на выраженное побочное действие, остается стандартом терапии для ряда опухолей, таких как рак яичника, яичка, молочной железы (РМЖ), легкого, головы и шеи, желудка, толстой кишки, почки, мочевого пузыря и других видов рака. Цисплатин вызывает нарушения молекулярной структуры ДНК, которые заключаются в формировании моноаддуктов и поперечных сшивок, индуцирующих образование двухцепочечных разрывов ДНК и активацию сигнальных путей апоптоза в опухолевых клетках [1, 2].

Следует отметить, что эффект цисплатина варьирует у разных больных, что предположительно связано с различным ответом на применяемую терапию вследствие индивидуального разнообразия молекулярных нарушений в опухолях пациентов. Прогноз течения заболевания нередко определяется степенью чувствительности опухоли к терапии цисплатином. Устойчивые к действию цисплатина опухоли имеют крайне неблагоприятный прогноз.

Молекулярные механизмы устойчивости к цисплатину не до конца изучены, однако известно, что в них участвуют сигнальные пути, активирующиеся в ответ на повреждение ДНК (DDR – DNA Damage Response) [3–5]. Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе действия цисплатина, а также поиск новых маркеров, вовлеченных в регуляцию ответа на терапию цисплатином, могут не только значительно улучшить эффект этого препарата, но также позволят предсказывать, будет ли лечение эффективным у того или иного больного.

Для поиска потенциальных опухолевых маркеров нами был использован метод SEREX (Serological Identification of cDNA Expression Libraries), который выявил два аутоантигена медуллярной карциномы молочной железы, а именно *RAD50* и *SMARCA5*, которые могут быть вовлечены в регуляцию чувствительности злокачественных опухолей к терапии ДНК повреждающими агентами и являются потенциальными предиктивными маркерами терапии цисплатином [6–8].

*RAD50* входит в состав комплекса MRN (Mre11/*RAD50*/Nbs1), осуществляющего репарацию двухцепочечных разрывов ДНК и поддержание целостности теломер [9, 10]. Было показано, что подавление экспрессии *RAD50* влияет на чувствительность клеток рака молочной железы к повреждающему действию цисплатина [11, 12].

Белок *SMARCA5*/SNF2H входит в состав различных ремоделирующих хроматин комплексов, а также вовлечен в ответ на повреждения ДНК. Было показано, что подавление экспрессии *SMARCA5* увеличивает чувствительность опухолевых клеток к действию ионизирующей радиации, которое заключается в формировании двухцепочечных разрывов ДНК [13]. Эти данные могут свидетельствовать о потенциальной вовлеченности *SMARCA5* в регуляцию ответа на терапию цисплатином, который имеет сходный механизм с действием ионизирующей радиации. Молекулярные механизмы, ответственные за привлечение *RAD50* и *SMARCA5* к месту повреждения ДНК, схематично представлены на рис. 1.

Целью данной работы являлась оценка влияния генов *RAD50* и *SMARCA5* на чувствительность к цисплатину и их роли в регуляции ответа на повреждение ДНК в клеточных линиях рака яичника (OVCAR8) и

голова и шеи (SCC61, SCC25). Для оценки специфичности данного влияния мы также изучали действие нокдауна данных генов на чувствительность к ряду других химиопрепаратов, таких как 5-фторурацил (5-ФУ) и олапариб, имеющих отличный от цисплатина молекулярный механизм повреждения ДНК. 5-ФУ приводит к угнетению репликации ДНК путем истощения запаса тимина в клетке, а олапариб вызывает повреждение ДНК путем ингибирования поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP1), участвующей в репарации ДНК.

## Материал и методы

### Культура клеток

В экспериментах *in vitro* были использованы клеточные линии плоскоклеточной карциномы головы и шеи SCC61 и SCC25 (American Type Culture Collection (ATCC), США), а также клеточная линия карциномы яичника OVCAR8, резистентная к действию цисплатина. Клетки SCC61 и SCC25 культивировали в бреде DMEM-F12, содержащей 10% сыворотки теленка и 1% L-глутамин, пенициллин и стрептомицин («Sigma», США). Клетки OVCAR8 культивировали в среде RPMI-1640, также содержащей 10% сыворотки теленка и 1% L-глутамин, пенициллин и стрептомицин.

### Трансфекция клеток при помощи миРНК, обработка клеток лекарственными препаратами, анализ выживаемости клеток

Все миРНК были приобретены в фирме «Qiagen» (Германия). Трансфекцию клеток проводили в 96-луночном планшете при помощи 10 нМ миРНК и трансфекционного реагента DF1 («Dharmacon», США) согласно протоколу производителя. Количество клеток, вносимых в каждую лунку 96-луночного планшета, различалось между клеточными линиями: 10 000 клеток на лунку для SCC61 и SCC25, 4000 клеток на лунку для OVCAR8 в финальном объеме питательной среды 90 мкл на лунку. Через 24 ч после трансфекции к клеткам добавляли лекарственные вещества, применяемые в лечении опухолей головы и шеи, а также рака яичника: цисплатин, (5-ФУ) и олапариб (Fox Chase Cancer Center, Cell Culture Facility, США). Через 72 ч после добавления лекарств проводили анализ выживаемости

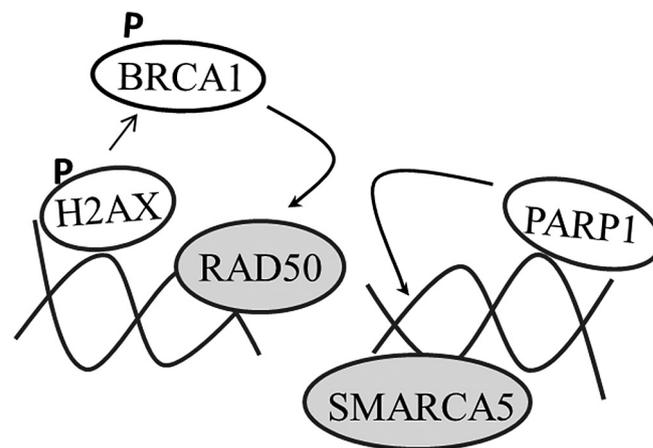


Рис. 1. Схематическое изображение молекулярных механизмов, ответственных за привлечение *RAD50* и *SMARCA5* к месту повреждения ДНК. Нарушение двухцепочечной структуры ДНК ведет к активации гистонового белка H2AX и белка PARP1. Данные процессы в свою очередь запускают привлечение *RAD50* и *SMARCA5* к месту повреждения ДНК, последующей репарацией повреждения.

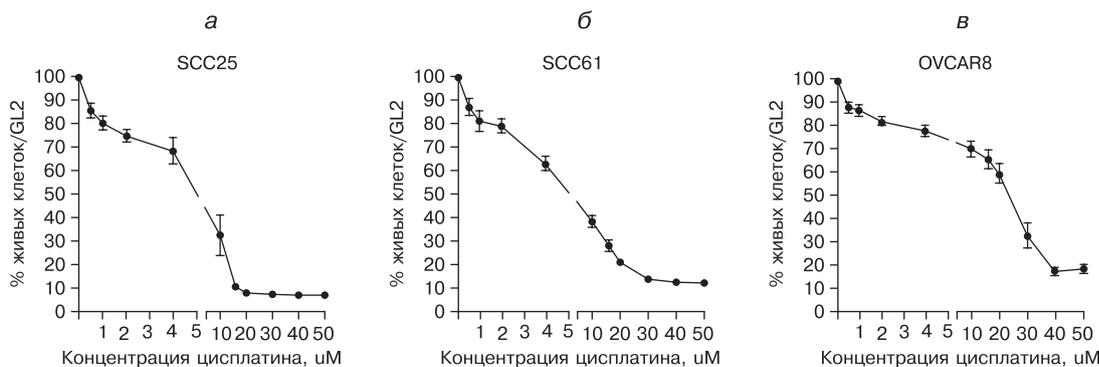


Рис. 2. Кривые выживаемости клеток SCC25 (а), SCC61 (б), OVCAR-8 (в) в различных концентрациях цисплатина (кривые IC50).

клеток. К клеткам добавляли 10 мкл на лунку реагента Cell Titer Blue («Promega», США). Через 3 ч после добавления реагента флуоресценцию клеток считывали при помощи спектрофотометра на длине волны 573 нм. Интенсивность сигнала была прямо пропорциональна количеству жизнеспособных клеток в лунке. Ген *REV3L*, известный как регулятор чувствительности к цисплатину согласно данным литературы и связанный с DDR, был взят в качестве положительного контроля сенситизации к цисплатину [14–16]. В качестве отрицательного контроля использовали РНК против гена *GL2*, кодирующего люциферазу светлячка, не имеющую мишени в клетках человека. Результаты анализа были нормализованы на контроль *GL2*.

#### Анализ фосфорилирования гистонного белка H2AX методом иммунофлуоресцентной микроскопии

Количественная оценка фокусов репарации ДНК, возникающих в результате фосфорилирования гистонного белка H2AX ( $\gamma$ -H2AX – обозначение для фосфорилированной формы белка), который является маркером двухцепочечных разрывов ДНК, выполнена при помощи автоматизированного высокопроизводительного флуоресцентного микроскопа ImageXpress Micro с использованием программного обеспечения MetaXpress и AcuityXpress («Molecular Devices», Саннивейл, США). Предварительно была проведена трансфекция клеток OVCAR8, SCC61 и SCC25 в 96-луночном планшете. миРНК против гена *CHEK1* использовали в качестве положительного контроля, поскольку, согласно данным литературы, нокдаун этого гена сам по себе повышает базовый уровень фокусов репарации ДНК, образованных  $\gamma$ -H2AX [17, 18]. миРНК против гена *GL2* использовали в качестве отрицательного контроля. Через 24 ч после трансфекции к клеткам было добавлено 16 и 30  $\mu$ M цисплатина или питательная среда в том же объеме

в качестве контроля. Через 18 ч клетки отмыли холодным натрий-фосфатным буфером и зафиксировали 4% параформальдегидом, в течение 10 мин клетки были вновь отмыты и пермеабелизованы 0,1% раствором Triton-X100 («Sigma-Aldrich» США). Окрашивание клеток проводили с использованием первичных антител к  $\gamma$ -H2AX (1:1000, Mouse Monoclonal, Millipore Upstate, Биллерика, США) в течение 12 ч при 4 °C и вторичных антител, меченных FITC (1:1000, goat anti-mouse IgG (H+L), «AlexaFluor»® 488 conjugate), в течение 1 ч при комнатной температуре.

#### Результаты

*Влияние нокдауна генов RAD50 и SMARCA5 на выживаемость и чувствительность к цисплатину и другим химиопрепаратам в клеточных линиях рака яичника OVCAR8 и плоскоклеточной карциномы головы и шеи SCC61 и SCC25*

Нами были установлены влияние, которое оказывает нокдаун *RAD50* и *SMARCA5* на жизнеспособность опухолевых клеток человека, и роль данных генов в регуляции чувствительности опухолевых клеток к цисплатину, а также другим распространенным в терапии рака яичника и опухолей головы и шеи химиопрепаратам, таким как 5-ФУ и олапариб.

Для нокдауна каждого гена использовали смесь двух лучших миРНК, заявленных фирмой-производителем («Qiagen», Германия). Через 24 ч после трансфекции к клеткам добавляли цисплатин в концентрации IC20–IC30 (рис. 2) и питательную среду в таком же объеме, что и цисплатин, в качестве отрицательного контроля.

Нокдаун генов *RAD50* и *SMARCA5* значительно снижал жизнеспособность (на 30–60%) опухолевых клеток (рис. 3). При этом наиболее выраженный цитотоксический эффект нокдауна данных генов был пока-

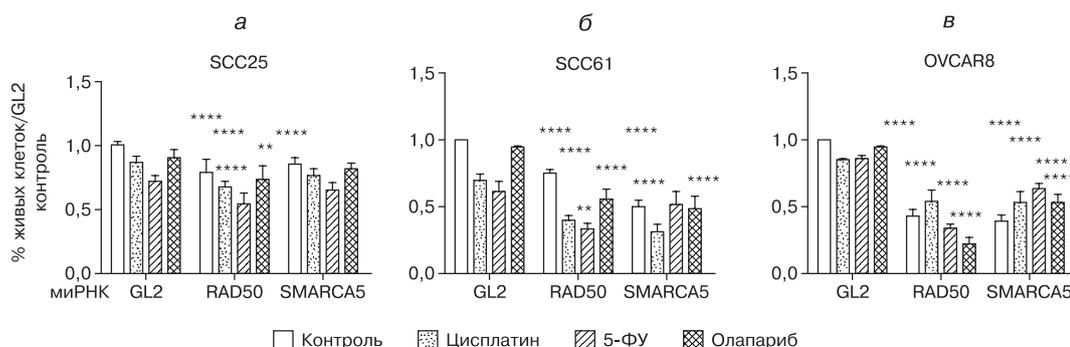


Рис. 3. Влияние нокдауна генов *RAD50* и *SMARCA5* на выживаемость опухолевых клеток (контроль), а также на их чувствительность к цисплатину, 5-ФУ и олапарибу в клеточных линиях плоскоклеточной карциномы головы и шеи SCC25 (а), SCC61 (б) и рака яичника OVCAR8 (в) (данные нормализованы на *GL2*-контроль). \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$  статистическая значимость по сравнению — с *GL2*.

зан в клеточной линии рака яичника OVCAR-8, резистентной к действию цисплатина (см. рис. 3, в). Таким образом, можно предположить, что экспрессия этих генов играет существенную роль в жизнедеятельности опухолевых клеток.

Мы оценивали влияние нокдауна генов *RAD50* и *SMARCA5* на чувствительность клеток непосредственно к цисплатину. После 72 ч обработки препаратом мы обнаружили повышение чувствительности к токсическому действию цисплатина в клеточных линиях опухоли головы и шеи с нокдауном генов *RAD50* и *SMARCA5* (для нокдауна данного гена эффект сенситизации наблюдался по крайней мере в одной из клеточных линий) (см. рис. 2, а, б). Эти результаты коррелируют с данными, полученными на клеточных линиях рака молочной железы для гена *RAD50* [11].

В клеточной линии OVCAR-8, полученной от пациентки с приобретенной устойчивостью к терапии цисплатином, также наблюдался выраженный эффект сенситизации к цисплатину в случае нокдауна генов *RAD50* и *SMARCA5* (см. рис. 2, в). Эти данные могут свидетельствовать о том, что гены *RAD50* и *SMARCA5* могут быть вовлечены в механизм резистентности клеточной линии OVCAR8 к действию цисплатина.

Мы также определяли, насколько специфичен к действию цисплатина оказываемый эффект сенситизации, повторив эксперимент с участием других препаратов, повреждающих ДНК.

Паттерны сенситизации к 5-ФУ и олапарибу были сходны с паттерном чувствительности к цисплатину (см. рис. 2). Можно предположить, что данный эффект связан со сходными молекулярными механизмами, определяющими чувствительность опухолевых клеток к данным ДНК-повреждающим препаратам. Так, распознавание повреждений ДНК и активация систем ответа на повреждение – базовый неспецифический процесс, не зависящий от рода повреждающего агента (ионизирующая радиация или химиотерапевтический препарат). Повреждение ДНК связано с фосфорилированием главных киназ ATR и ATM, отвечающим за активацию множества сигнальных путей, ответственных за различные виды репарации и регуляцию клеточного цикла в клетке. Под

действием киназ ATR/ATM с последующей активацией киназ CHEK1 и CHEK2 [19] в области повреждения ДНК фосфорилируется гистоновый белок H2AX, что является первым этапом в запуске сигнального каскада, вызывающего привлечение в место повреждения белков и сборку комплексов репарации.

Нарушение ответа на повреждение ДНК на самых ранних этапах может лежать в основе сенситизации опухолевых клеток с нокдауном генов *RAD50* и *SMARCA5* к действию ДНК повреждающих препаратов.

*Влияние нокдауна генов RAD50 и SMARCA5 на фосфорилирование гистонного белка H2AX, известного маркера повреждения ДНК в клеточной линии рака яичника OVCAR-8 и плоскоклеточной карциномы головы и шеи SCC61 и SCC25*

Для проверки данной гипотезы о возможном молекулярном механизме, лежащем в основе сенситизации опухолевых клеток с нокдауном генов *RAD50* и *SMARCA5* к ДНК-повреждающим препаратам, мы исследовали влияние нокдауна данных генов на формирование фокусов репарации – H2AX. Хорошо известно, что повреждение ДНК, в том числе вызванное действием цисплатина, характеризуется формированием фокусов репарации, которые возникают в результате фосфорилирования гистонного белка H2AX ( $\gamma$ -H2AX) [20, 21].

Было показано, что нокдаун гена *SMARCA5* не оказывал влияния на уровень  $\gamma$ -H2AX в присутствии цисплатина, однако приводил к увеличению базового уровня фокусов  $\gamma$ -H2AX в контрольных образцах без добавления цисплатина. В то же время нокдаун гена *RAD50* не менял ни базовый  $\gamma$ -H2AX, ни уровень фосфорилирования гистонного белка в присутствии цисплатина (рис. 4).

Данные результаты указывают на роль *SMARCA5* в регуляции уровня фосфорилирования гистонного белка H2AX. Отсутствие влияния нокдауна генов на уровень фосфорилирования H2AX в условиях повреждения ДНК позволяет предположить, что влияние данных генов на чувствительность к цисплатину связано с более поздними этапами активации ответа клетки

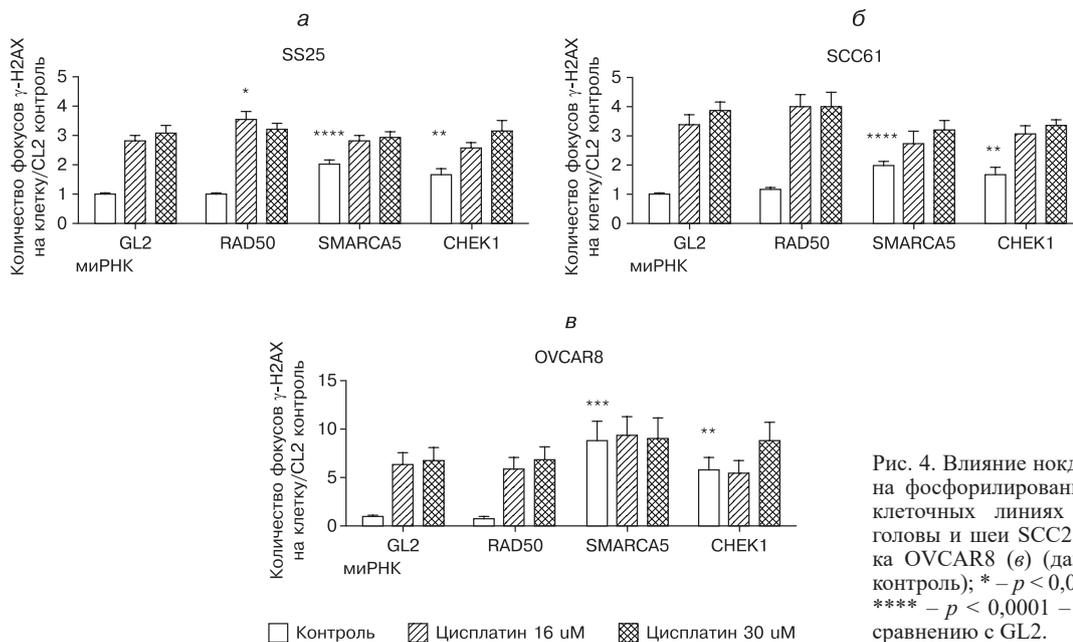


Рис. 4. Влияние нокдауна генов *RAD50* и *SMARCA5* на фосфорилирование гистонного белка H2AX в клеточных линиях плоскоклеточной карциномы головы и шеи SCC25 (а), SCC61 (б) и рака яичника OVCAR8 (в) (данные нормализованы на GL2-контроль); \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$  – статистическая значимость по сравнению с GL2.

на повреждение. Таким образом, идентификация молекулярных механизмов регуляции данными генами чувствительности к цисплатину требует дальнейших исследований.

### Обсуждение

*RAD50* и *SMARCA5* играют важную роль в процессах репарации ДНК и являются известными маркерами резистентности к цисплатину при раке молочной железы [9–12, 22, 23].

В данной работе нами была показана роль генов *RAD50* и *SMARCA5* в регуляции жизнеспособности клеток опухолей головы и шеи и рака яичника. Кроме того, мы продемонстрировали роль данных генов в регуляции чувствительности опухолевых клеток к цисплатину и другим химиотерапевтическим ДНК-повреждающим препаратам, применяемым в лечении опухолей головы и шеи и рака яичника. Нокдаун генов *RAD50* и *SMARCA5* значительно увеличивал чувствительность клеток данных опухолей к цисплатину, 5-ФУ и олапарибу.

Нами установлена роль гена *SMARCA5* в регуляции базового уровня фосфорилирования H2AX. Однако нокдаун обоих генов не влиял на уровень  $\gamma$ -H2AX в присутствии цисплатина.

Очевидно, молекулярные механизмы сенситизации к ДНК-повреждающим препаратам в данном случае реализуются на более поздних этапах ответа на повреждение. Следует отметить, что повреждающее действие цисплатина, 5-ФУ и олапариба связано также с активацией эксцизионной репарации (nucleotide excision repair (NER)) и репарацией путем гомологичной рекомбинации (homologous recombination (HR)), а также блокадой клеточного цикла на этапе репликации ДНК (блокада G1-S и S-фазы клеточного цикла) [24–27]. Оценка роли этих процессов в сенситизации к ДНК-повреждающим препаратам, опосредованной нокдауном *RAD50* и *SMARCA5*, требует дальнейших исследований.

Таким образом, гены *RAD50* и *SMARCA5* являются потенциальными терапевтическими мишенями в лечении и предиктивными маркерами ответа на терапию цисплатином и другими ДНК-повреждающими препаратами у пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи и раком яичника. Мы надеемся, что полученные нами данные помогут лучше понять механизмы возникновения резистентности и разработать возможные пути ее преодоления в клинике.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-15-20032).

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Chu G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(2): 787–90.
2. Perez R.P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur. J. Cancer.* 1998; 34(10):1535–42.
3. Johnson S.W., Perez R.P., Godwin A.K., Yeung A.T., Handel L.M., Ozols R.F., Hamilton T.C. Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 47(4): 689–97.
4. Johnson S.W., Swiggard P.A., Handel L.M., Brennan J.M., Godwin A.K., Owls R.F. et al. Relationship between platinum-DNA adduct formation and removal and cisplatin cytotoxicity in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 1994; 54(22): 5911–6.
5. Tan D.S., Kaye S.B. Chemotherapy for patients with BRCA1 and BRCA2-mutated ovarian cancer: same or different? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* 2015: 114–21.

6. Kiyamova R., Kostianets O., Malyuchik S., Filonenko V., Usenko V., Gurtovyy V. et al. Identification of tumor-associated antigens from medullary breast carcinoma by a modified SEREX approach. *Mol. Biotechnol.* 2010; 46(2): 105–12.
7. Kostianets O., Shyian M., Demidov S., Antoniuk S., Gout I., Filonenko V., Kiyamova R. Serological analysis of SEREX-defined medullary breast carcinoma-associated antigens. *Cancer Invest.* 2012; 30(7): 519–27.
8. Kostianets O., Antoniuk S., Filonenko V., Kiyamova R. Immunohistochemical analysis of medullary breast carcinoma autoantigens in different histological types of breast carcinomas. *Diagn. Pathol.* 2012; 7(1):161. DOI: 10.1186/1746-1596-7-161.
9. Bartkova J., Tommiska J., Oplustilova L., Aaltonen K., Tamminen A., Heikkinen T. et al. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene. *Mol. Oncol.* 2008; 2(4): 296–316.
10. Tommiska J., Seal S., Renwick A., Barfoot R., Baskcomb L., Jayatilake H. et al. Evaluation of RAD50 in familial breast cancer predisposition. *Int. J. Cancer.* 2006; 118(11): 2911–6.
11. Abuzeid W.M., Jiang X., Shi G., Wang H., Paulson D., Araki K. et al. Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(7): 1974–85.
12. Flores-Perez A., Rafaelli L.E., Ramirez-Torres N., Aréchaga-Ocampo E., Frias S., Sánchez S. et al. RAD50 targeting impairs DNA damage response and sensitizes human breast cancer cells to cisplatin therapy. *Cancer. Biol. Ther.* 2014; 15(6): 777–88.
13. Smeenk G., Wiegant W.W., Martijn J.A., Luijsterburg M.S., Sroczynski N., Costelloe T. et al. Poly(ADP-ribosyl)ation links the chromatin remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-dependent DNA damage signaling. *J. Cell. Sci.* 2013; 126(4): 889–903.
14. Xu X., Xie K., Zhang X.Q., Pridgen E.M., Park G.Y., Cui D.S. et al. Enhancing tumor cell response to chemotherapy through nanoparticle-mediated codelivery of siRNA and cisplatin prodrug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(46): 18638–43.
15. Doles J., Oliver T.G., Cameron E.R., Hsu G., Jacks T., Walker G.C., Hemann M.T. Suppression of Rev3, the catalytic subunit of Pol{zeta}, sensitizes drug-resistant lung tumors to chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2010; 107(48): 20786–91.
16. Huang K.K., Jang K.W., Kim S., Kim H.S., Kim S.M., Kwon H.J. et al. Exome sequencing reveals recurrent REV3L mutations in cisplatin-resistant squamous cell carcinoma of head and neck. *Sci. Rep.* 2016; 6: 19552.
17. Sharma A., Singh K., Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Meth. Mol. Biol.* 2012; 920: 613–26.
18. Turinetto V., Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(5): 2489–98.
19. Pabla N., Huang S., Mi Q.S., Daniel R., Dong Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(10): 6572–83.
20. Jackson S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis.* 2002; 23(5): 687–96.
21. Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M., Bonner W.M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 2000; 10(15): 886–95.
22. Jin Q., Mao X., Li B., Guan S., Yao F., Jin F. Overexpression of SMARCA5 correlates with cell proliferation and migration in breast cancer. *Tumour Biol.* 2015; 36(3): 1895–902.
23. Heikkinen K., Rapakko K., Karppinen S.M., Erkkö H., Knuutila S., Lundán T. et al. RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. *Carcinogenesis.* 2006; 27(8): 1593–9.
24. Wyatt M.D., Wilson D.M. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol. Life Sci.* 2009; 66(5): 788–99.
25. Adamsen B.L., Kravik K.L., De Angelis P.M. DNA damage signaling in response to 5-fluorouracil in three colorectal cancer cell lines with different mismatch repair and TP53 status. *Int. J. Oncol.* 2011; 39(3): 673–82.
26. Martin L.P., Hamilton T.C., Schilder R.J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(5): 1291–5.
27. Meehan R.S., Chen A.P. New treatment option for ovarian cancer: PARP inhibitors. *Gynecol. Oncol. Res. Pract.* 2016; 3: 3.