

두경부종양 세포주에서 Ku 단백질 발현 정도에 따른 방사선 민감도

울산대학교 의과대학 서울아산병원 방사선종양학과*, 병리과†

이상욱* · 유은실[†] · 이소령* · 손세희* · 김종훈* · 안승도* · 신성수* · 최은경*

목적: DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)는 serine/threonine kinase로 470 kDa의 catalytic subunit (DNA-PKcs)와 각각 70 kDa과 86 kDa의 무게를 갖는 Ku 70, Ku 80 단백질로 구성된다. 이 DNA-PK는 방사선에 의해 DNA의 두 가닥이 동시에 절단되는 경우 DNA 손상 복구에 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 Ku 발현과 이온화방사선에 민감도와와의 상관 관계를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법: 예비실험으로 두경부종양 기원의 세포주 9개에 대한 방사선에 대한 민감도실험을 한 결과 AMC-HN3이 방사선에 가장 민감하였고, AMC-HN9이 방사선에 가장 저항성을 보여 2개의 세포주에 대한 Ku70/80의 발현을 Western blot과 면역형광 염색을 시행하여 방사선의 반응도와와의 상관관계를 알아보았다.

결과: 방사선에 저항성을 보이는 AMC-HN9에서 Ku80 발현이 높았고 방사선에 민감한 AMC-HN3에서 세포자멸사가 더 많이 일어남을 관찰할 수 있었다.

결론: Ku80 단백질 발현이 높은 세포는 방사선에 대한 DNA 손상 복구가 많이 되어 방사선에 대한 내성을 보이는 것으로 생각되었다.

핵심용어: Ku70/80, 이온화방사선, 두경부종양 세포주

서 론

이온화 방사선의 항암효과는 주로 DNA 손상을 유발하여 나타나는데, 만약 손상된 DNA를 완전복구하면 세포는 생존할 수 있으나 완전복구하지 못하면 세포자멸사, 세포분열사, 세포주기의 영원한 정지 등이 일어나게 된다. 알려진 바에 의하면 DNA 손상이 일어나면 특정한 신호(signal)가 발생하여 전사인자 발현에 영향을 주게 된다. DNA 손상시 신호전달체계에 의해 전사인자의 양이 변하거나 인산화(phosphorylation), 탈인산화(dephosphorylation)되어 유전자 발현의 변화로 이어져 DNA 복구에 영향을 주게 되는데 복구 가능하지 않은 심각한 손상이 발생하여 DNA 완전복구에 실패하면 세포는 사멸하게 된다.¹⁾

방사선치료의 항암 기전은 DNA 이중나선 구조의 파괴에 의한 세포사가 주된 작용인데 만약 암세포의 손상된

DNA 복구 기전을 이해하여 회복 정도를 예측할 수 있다면 방사선치료 선택유무와 선량 등을 효과적으로 결정할 수 있을 것이다. 방사선에 의한 암세포의 분자생물학적 반응기전은 매우 복잡하고 다양한 것으로 알려져 있다. DNA가 방사선에 의해 손상을 받으면 절단된 DNA 구조를 복구하기 위하여 절단된 양측 DNA에 일차적으로 Ku 단백질이 부착되고 DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs)와 Ku 단백질이 결합하여 DNA를 복구하게 된다. DNA-PKcs/Ku 복합체는 DNA의 이중나선 구조가 파괴된 경우(double-strand-breaks, dsb) 이를 인지하고 복구하는데 중추적 역할을 하는 효소이다.²⁻⁵⁾ DNA-PK 복합체는 catalytic subunit인 DNA-PKcs와 regulatory subunit인 Ku로 구성되어 있는데 Ku는 그 질량에 의해 Ku70과 Ku86으로 분류되어 있다.^{6,7)} DNA-PK에서 Ku는 절단된 DNA 말단부에 DNA염기 서열에 관계없이 직접 부착되는 부분이다. Ku는 polymyosites-scleroderma overlap 증후군 환자의 혈청에서 최초로 확인되었으며 당시 두 명의 환자 이름의 앞자릿 첫 자를 인용하여 만들었다.^{8,9)} Ku 단백질은 DNA 이중나선구조 손상 복구, 면역글로블린 V(D)J 재조합, telomere 길이 유지, 세포주기 및 전사 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹²⁾

두경부 종양의 치료에 있어서 방사선치료는 매우 중요

이 논문은 2004년 3월 22일 접수하여 2004년 8월 18일 채택되었음. 본 연구는 아산생명과학연구소 신진과제 (2003-308) 지원에 의해 수행 되었음.

책임저자: 이상욱, 서울아산병원 방사선종양학과
Tel: 02)3010-4435, Fax: 02)486-7258
E-mail: lsw@amc.seoul.kr

한 역할을 하고 있지만 방사선치료의 효과를 예측할 수 있는 편하고 정확한 방법은 없는 상태이다. 두경부암의 방사선치료 시 Ku 발현 정도가 방사선치료 결과의 예측 인자로써 의미 있다면 향후 수술적 치료보다 장기보존 목적의 방사선치료가 적당한 환자군을 구별하는 데 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 암 조직내에서 Ku 단백질 발현 정도가 방사선에 대한 반응성을 직접적으로 예측할 수 있다면 방사선치료 전에 방사선치료에 대한 반응유무를 쉽게 예측할 수 있게 됨으로써 방사선치료에 따른 국소제어율을 향상시킬 수 있을 것이다. 후두암, 하인두암, 구강암, 그리고 구인두암에서 장기 보존율을 향상시킬 수 있고 환자 삶의 질 향상을 기대할 수 있을 것이다. 본 저자들은 방사선에 반응도가 다른 두경부종양 세포주에서 그 원인으로 Ku 단백질 발현의 차이로 가설을 세우고 연구를 진행하였다. 본 연구는 암세포의 방사선 민감도의 차이와 Ku 단백질 발현정도와의 연관성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

사람 두경부종양 세포주인 AMC-HN은 이 세포주를 최초로 배양에 성공한 원 제작자(울산의대 김상윤 교수)에서 제공 받아 사용하였다.^{13,17} 세포배양을 위해서 사용한 배지는 15% FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)이 함유된 DMEM (Dulbecco Modified Essential Medium, Gibco BRL, USA)에 24 mM HEPES 완충액 (Gibco BRL, USA) 및 10% streptomycin-penicillin 등을 첨가하여 하여 사용하였고, 5% CO₂, 37°C 조건에서 자라게

하여 10회 이하 계대 배양된 지수 성장기의 세포를 이용하였다.

2. 방사선조사

방사선 조사는 6 MV 에너지의 치료용 선형가속기(Varian Co, Milpitas, CA)를 이용하여 분당 2 Gy 내외의 선량율(dose rate)로 균일하게 조사하였다. 방사선 조사량은 3 Gy, 6 Gy, 9 Gy, 12 Gy를 조사하였다.

3. 세포생존측정(Clonogenic survival)

지수 성장기에 있는 세포를 trypsinize하여 계수한 후, 순차적 희석을 통하여 T-25 플라스크에 적당한 숫자의 암세포를 분주하였다. 분주한 암세포가 플라스크 바닥에 붙게 하기 위하여 CO₂ 배양기에서 24시간 이내 배양하였다. 세포들을 각각 T-25 플라스크에 키운 후 0, 3, 6, 9, 12 Gy의 방사선을 조사한 후 세포배양기 내에서 10~14일 배양하여 세포집락(colony)이 생기는 것을 확인하였다. 방사선조사에 따른 세포생존은 세포집락 형성 능력을 기준으로 판단하였다. 상층의 배지를 제거하고 플라스크 전체를 0.5% crystal violet, 20% 에탄올 혼합액에 넣어 3분 염색하고 PBS로 여분의 혼합액을 제거한 후 건조시켜 세포집락의 수를 계측하였다. 대조군 (0 Gy)에서 얻은 배양효율(plating efficiency, P.E.)을 기준으로 각 실험군의 생존분획(survival fraction, S.F.)을 산출하였다. 각각의 생존분획은 3번 이상 반복 실험하였으며 이의 평균값을 환산하였다.

4. Western blot

AMC-HN-3과 AMC-HN-9세포를 배양하여 방사선조사전

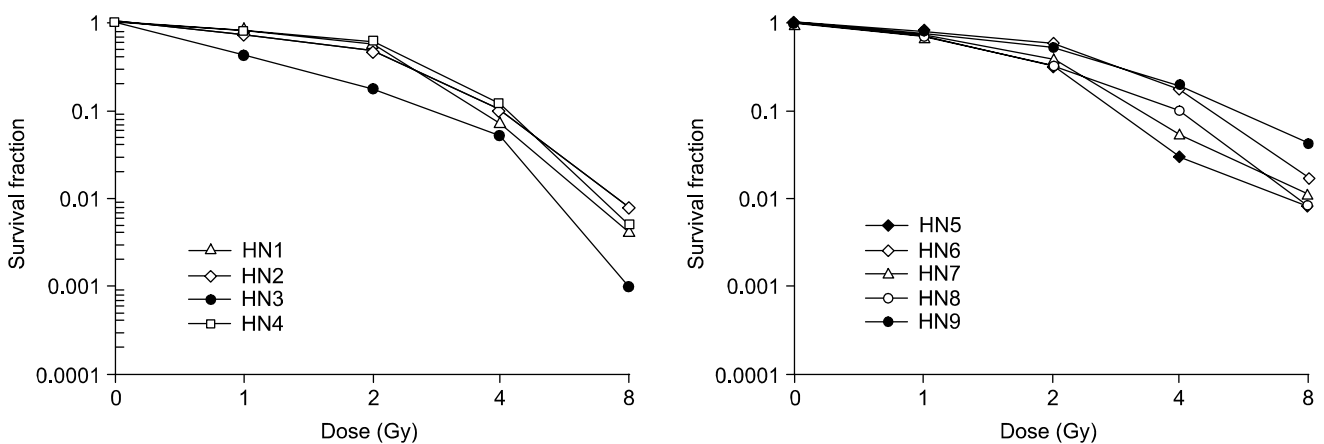


Fig. 1. Clonogenic cell survival of AMC-HN-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8 and -9 cells were generated after their exposure to 0, 1, 2, 4, 8 Gy of ionizing radiation. AMC-HN-3 was most radiosensitive and AMC-HN-9 was most radioresistance.

과 방사선 12 Gy 조사 후 시간별(2, 4, 8, 16, 24시간) RIPA buffer (Tris 50 mM (pH 7.5), NaCl 300 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0.5%, 1mM NaF, 1% Aprotinin, 1% Leupeptin, 10 mM Iodoacetamide, 1% Peptatin, 0.25% Sodium deoxycholate, 2 mM PMSF)로 단백을 추출하였으며 Bradford 법으로 정량 (BioRad, USA)하여 10% Tris-Glycine gel에 40 mA로 전기영동하였다. PVDF membrane (Amersham Co., USA)에 cold Transfer buffer (0.025 M Tris, 0.192 M Glycine, 20% Methanol)로 2시간 동안 전기영동하였다. Marker

(Amersham Co., USA)의 위치를 확인한 후 5% skim milk에 Primary Antibody를 가하였으며 2시간 동안 항원항체 반응시켰다. TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 세척하고 HRP conjugated secondary Antibody를 1 : 1,000의 비율로 가했으며 항원항체 반응시킨 후 충분히 세척하여 ECL (Amersham Co., USA)으로 반응을 검출하였다. 필름(AGFA, USA)에 노출시키고 band의 굵기를 Phospho-Image analyzer (BioRad, USA)로 분석하여 반응세기를 계산하였다. 여기에 쓰인 Primary antibody는 Ku80, Ku70, p53, p21 (PharMingen, USA)이었다.

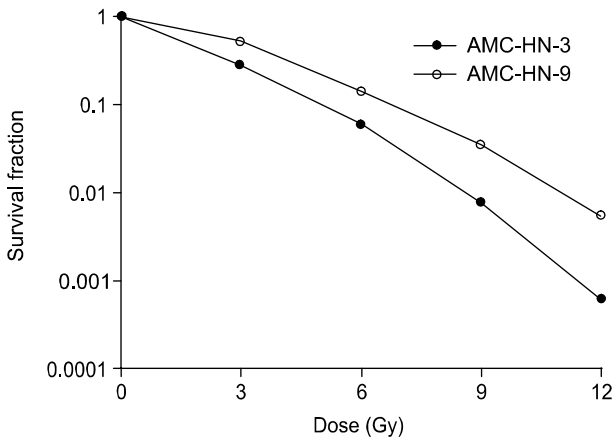


Fig. 2. Clonogenic cell survival of AMC-HN-3 and -9 cells were generated after their exposure to 0, 3, 6, 9, 12 Gy of ionizing radiation. Variation of radiosensitivity through the cell lines of head and neck cancer.

5. 유세포 분석

세포주기를 분석하기 위해서 PI를 이용하여 DNA content를 분석하였다. AMC-HN-3,-9 세포를 12 Gy 방사선 조사 후 처치한 세포를 분리하기 위해서 1,000×g에서 5분간 원심분리한 후 상층액은 버리고 pellet만 조심스럽게 풀어 주었다. Azide 완충액(PBS with 2.5% FCS, 0.05% Na-azide) 1 ml를 섞고 위와 같은 방법으로 원심분리한 후 세척하였다. 세포의 농도를 1×10⁶/ml로 하고 azide 완충액과 50μg/ml PI를 넣고 4°C에서 1시간 반응시킨 후 완충액 400μl를 가해 전체를 500μl로 맞추어 유세포 분석기 FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 dual color parameter protocol을 사용하여 분석하였다. 단 30분 이후에는 4°C 혹은 얼음에 보관하며 빛을 차단하였고, 3시간 이내 분석하였다.

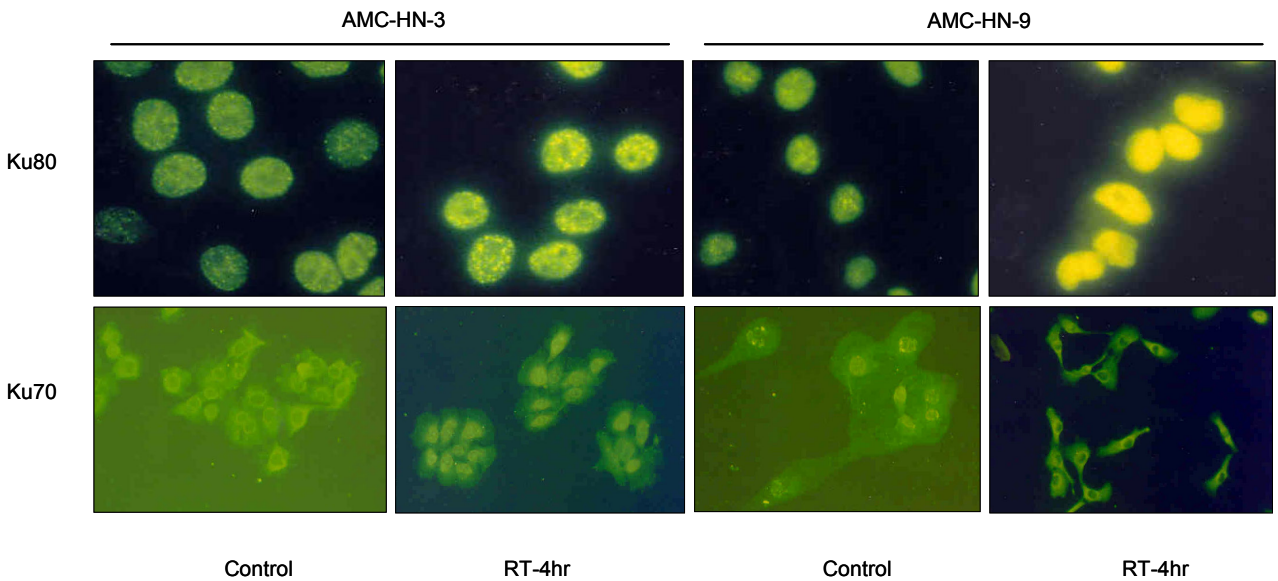


Fig. 3. Immunofluorescent staining was performed in Ku70 and Ku80 (×250 magnification) after 12 Gy of ionizing radiation. Expression of Ku80 was increased in AMC-HN-9 cell line postirradiation.

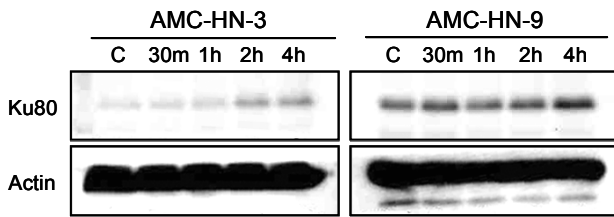


Fig. 4. Western blot showing the levels of Ku80 protein (30 minutes interval) in the AMC-HN-3 and AMC-HN-9 after 12 Gy of ionizing radiation. Expression of Ku80 was increased in AMC-HN-9 more than AMC-HN-3.

6. 면역형광염색

Chamber 슬라이드에 10⁴개의 세포를 심고 24시간 동안 배양하였다. PBS (phosphate buffered saline, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)로 씻어준 후 250µl의 메탄올을 넣어 20분간 고정시켰다. PBS로 씻고 5% skin milk로 3시간 동안 차단한(blocking) 후 일차 항체(Oncogene Science, Mahassett, NY, USA)를 넣고 실온에 2시간 두었다. PBS로 씻은 후 이차 항체(Oncogene Science)를 넣고 실온에 1시간 두었다. PBS로 씻고 형광 현미경으로 관찰하였다.

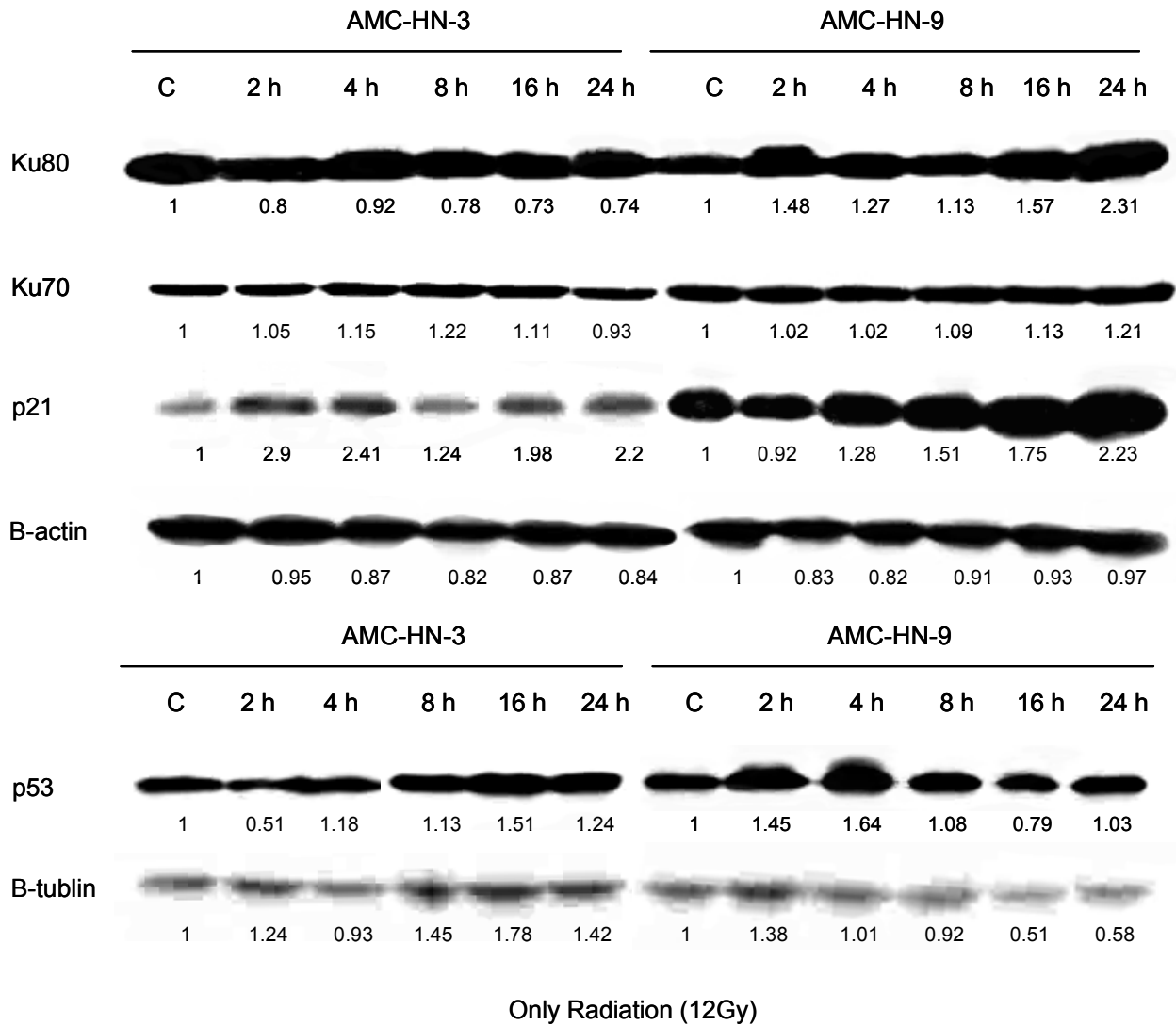


Fig. 5. Western blot showing the levels of Ku70, Ku80, p53, and p21 in the AMC-HN-3 and -9 cell lines were observed in time interval (at 0, 2, 4, 8, 16, 24 hours) after 12 Gy of ionizing radiation.

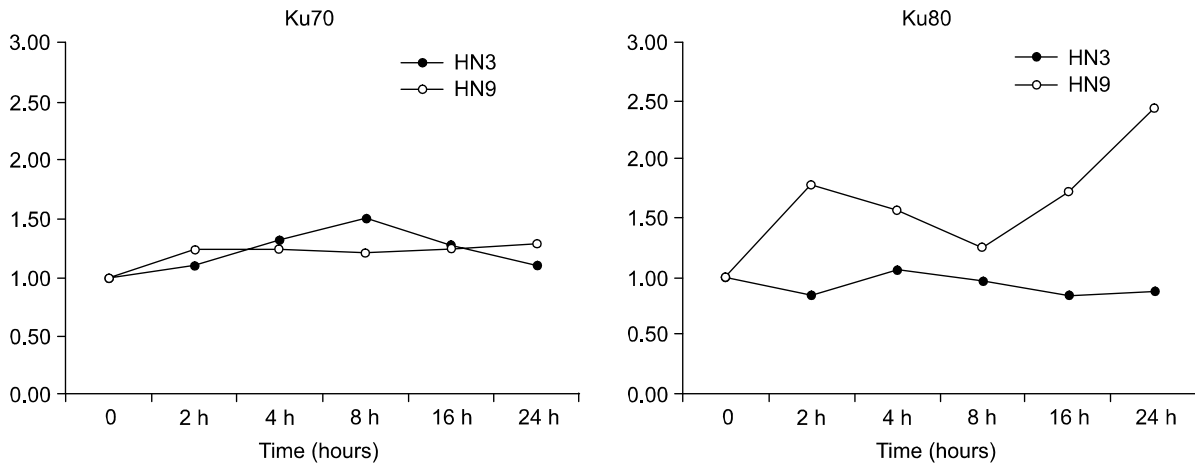


Fig. 6. Western blot showing the levels of Ku70 Ku80 by phosphoimage analyzer (at 0, 2, 4, 8, 16, 24 hours) in the AMC-HN-3 and AMC-HN-9 after 12 Gy of ionizing radiation.

7. 연구방법

총 9개의 두경부종양 세포주의 방사선조사에 대한 생존율의 차이는 다음과 같다(Fig. 1). 방사선에 저항성이 높은 9번 세포주(AMC-HN-9)와 민감도가 높은 3번 세포주(AMC-HN-3) 2개의 세포주를 선택하여 방사선에 대한 민감도와 Ku 단백질의 발현정도의 상관 관계를 일차적으로 밝혀내 고자 하였다.

결 과

AMC-HN-3과 AMC-HN-9 세포주의 방사선에 대한 감수성을 확인하기 위하여 0 Gy, 3 Gy, 6 Gy, 9 Gy, 12 Gy로 방사선량을 변화시키면서 세포 생존 곡선을 구하였다(Fig. 2). AMC-HN-3 세포주가 AMC-HN-9 세포주에 비해서 방사선에 의해 더 많은 세포사 발생하여 생존 세포 분획이 적게 관찰되었다.

방사선조사에 의한 Ku단백질 발현의 변화 양상을 두 가지 세포주에서 관찰하기 위하여 방사선 8 Gy 조사하고 4 시간 후 면역 형광염색을 시행하였다(Fig. 3). Ku70은 방사선 조사에 의해 현저한 변화를 관찰할 수 없었지만 Ku80은 AMC-HN-3 세포주와 AMC-HN-9에서 모두 발현이 증가되었다. 특히 AMC-HN-9 세포주에서는 Ku80의 발현이 강하게 증가 하였다. 방사선조사 후 시간 변화에 따라 Ku80의 변화를 관찰하기 위하여 8 Gy 방사선조사하고 30분, 1 시간, 2시간, 4시간 지난 시점에서 Western blot을 시행하여 Ku80의 발현을 관찰하였다. 방사선조사하기 전 기저상태에서부터 AMC-HN-9에서 Ku80의 발현이 증가되어 있었고 방

사선조사 후 30분 부터 Ku80의 발현이 증가하였다(Fig. 4).

방사선조사에 의해 유발 신호전달 체계상에서 Ku 단백질 발현에 상위단계에서 관여하는 p53의 변화를 관찰하고자 하였다. 방사선 12 Gy 조사하고 Western blot을 시행하여 Ku70, Ku80, p53, p21발현을 시간에 변화에 따라 관찰하여 보았다(Fig. 5). 방사선에 의한 Ku 단백질 발현양상은 AMC-HN-3세포주에서는 Ku70과 Ku80 모두 발현이 증가하지 않았다. AMC-HN-9 세포주에서는 방사선조사 후 Ku80은 약 2시간째 1.5배 증가하였고 Ku70은 별다른 변화를 보이지 않았다(Fig. 6). 방사선을 조사하고 4시간까지의 변화를 관찰하였던 Fig. 4의 결과와 같았고, 이런 결과는 24시간까지 관찰하여도 비슷한 양상임을 알 수 있었다. p53과 p21은 AMC-HN-3 세포주보다 AMC-HN-9 세포주에서 더 많이 발현되었다.

12 Gy 방사선에 의해 유도되는 세포고사를 관찰하기 위하여 시행한 유세포 분석 결과에 따르면 AMC-HN-3 세포주에서 세포고사가 현저히 증가됨을 관찰할 수 있었고, 세포주기 변화는 G1기, G2기 세포주기 지연이 AMC-HN-9 세포주에서 현저히 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 7, 8).

고 찰

방사선에 의한 세포사의 주 기전은 DNA 이중나선구조의 절단이고 DNA 손상복구에 작용하는 중요한 물질 중의 하나는 Ku70과 Ku80이다. 본 연구는 방사선에 대한 반응도가 다른 2개의 사람 두경부종양 세포주에서 Ku 단백질 발현의 차이를 알아보려고 하였다. 비교적 방사선에 내성을 나타내는 AMC-HN-9 세포주에서 방사선에 대한 반응이

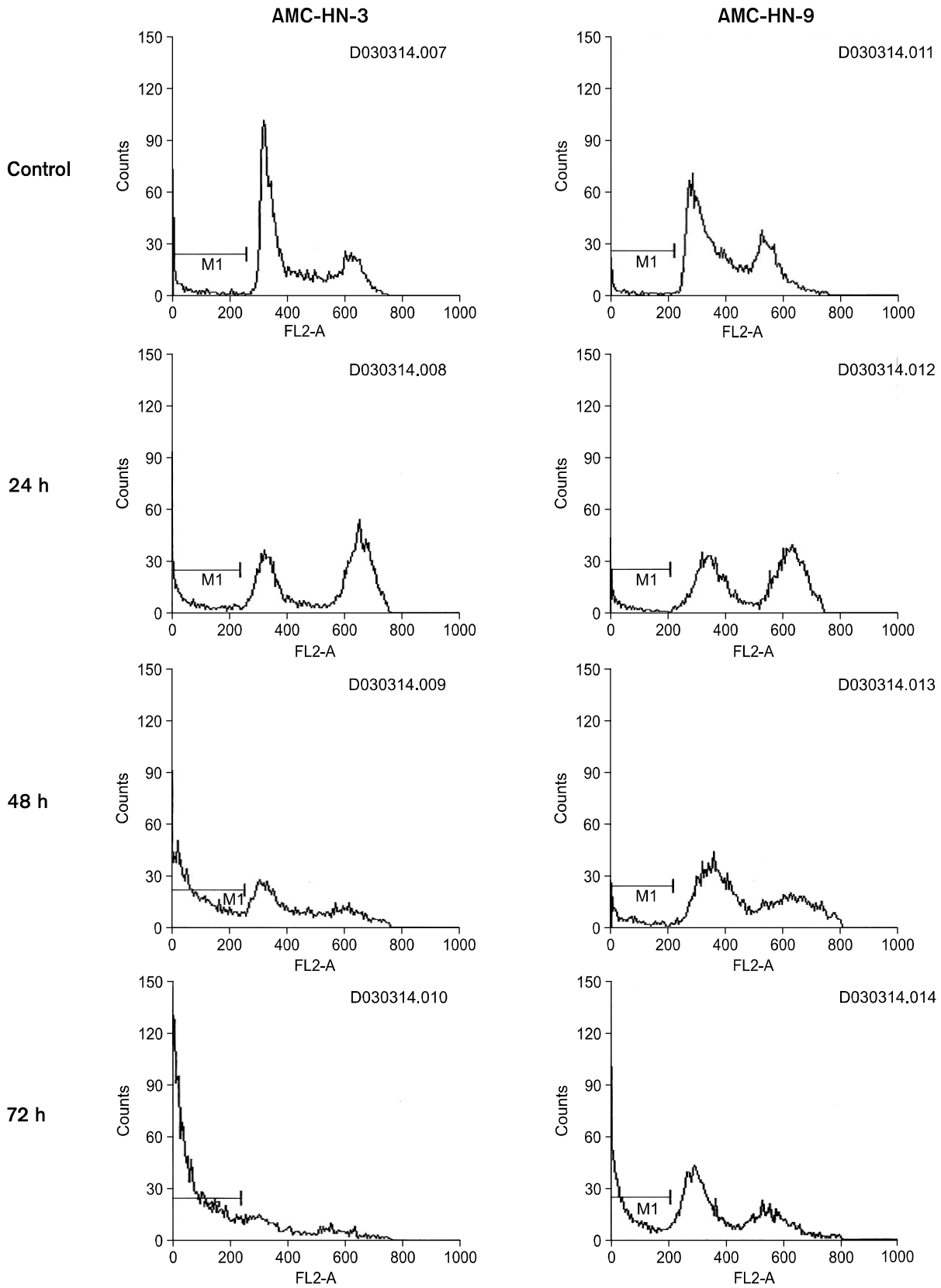


Fig. 7. Cell cycle analysis by flowcytometry in the AMC-HN-3 and AMC-HN-9 after 12 Gy of ionizing radiation.

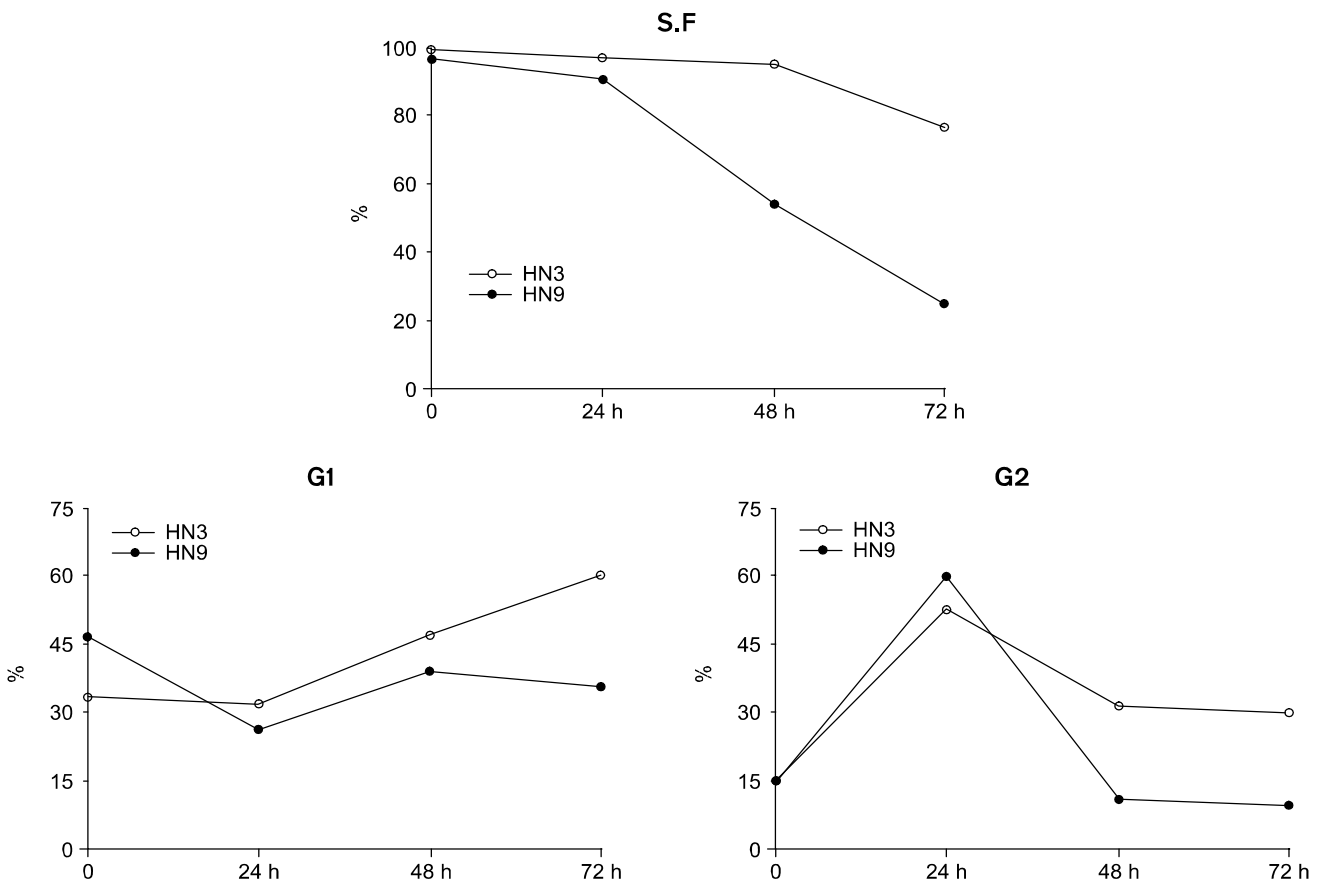


Fig. 8. Numerical analysis of cell cycles using flowcytometry in the AMC-HN-3 and AMC-HN-9 after 12 Gy of ionizing radiation.

다르게 나타나는 이유 중의 하나는 방사선조사 후 Ku80의 발현이 증가된다는 점이었다. 한편 Ku70은 양 세포주간에 차이가 없었고 방사선 조사 후 발현이 증가하지도 않았다. Ku 단백질의 존재가 밝혀진 것은 오래되었지만⁸⁾ 아직까지 Ku70과 Ku80에 대한 각각의 역할과 기능은 밝혀져 있지 않고 있다. Ku70에 대한 면역조직화학염색(immunohistochemical staining) 연구결과에 따르면 Ku70의 발현이 방사선치료의 반응에 영향이 있다는 보고가 대부분이고,^{14,15)} Ku80을 면역화학염색을 한 연구의 결과는 상반된 결과가 보고되는데 자궁경부암에서 Ku80의 발현이 낮은 경우 국소재발률이 낮았다는 보고도 있고 편도암에서 Ku80의 발현이 낮은 종양에서 방사선치료 성적이 오히려 저조하였다는 연구결과도 있어 결론을 내기 어려운 상태이다.^{16,18)} 직장암에서 Ku70과 Ku80을 동시에 면역조직화학염색한 결과에서 보면 Ku70의 발현만 방사선치료반응과 통계학적으로 연관성이 있었고 Ku80의 발현은 방사선에 대한 반응에서 의미가 없었다.¹⁵⁾ 문헌보고의 결과를 종합해보면 방사선치료 전 Ku70의 발현 정도는 방사선 민감도와 관련이

있을 것으로 생각되고 본 연구 결과에 따르면 Ku70의 발현이 방사선조사에 의해 증가하지는 않는 것으로 나타났다. 따라서 Ku70의 발현이 방사선치료 반응 예측인자로는 적절할 수 있지만 Ku80처럼 방사선에 의해 발현이 증가하지는 않는 것으로 생각된다. 앞으로 Ku70과 Ku80의 정확한 기능을 밝혀내는 연구가 진행되어야 할 것이다.

AMC-HN-3 세포주와 AMC-HN-9 세포주에서 방사선에 대한 반응도가 차이가 나는 이유는 방사선 조사에 의해 손상된 DNA 이중나선구조가 AMC-HN-9 세포주에서는 Ku80의 발현이 증가되어 복구되기 때문인 것으로 생각되었다. 방사선조사 후 시행한 유세포 분석 결과에 따르면 각각의 세포주에서 세포고사의 차이가 있었는데 AMC-HN-3 세포주에서는 손상된 DNA가 복구되지 못했기 때문에 세포고사로 이어진 것으로 생각된다. 방사선조사 후 AMC-HN-9 세포주는 AMC-HN-3세포주에 비해서 일종의 방어기전으로 G1기, G2기 세포 주기 지연이 유발되어 DNA손상이 복구되었기 때문일 것으로 생각된다. 방사선에 의한 세포내 신호전달 체계에서 DNA 손상이 일어나면 ATM이 발현되

고 ATM이 p53을 유도하고 p53은 Ku발현을 유발하는 것으로 알려져 있다. p53은 방사선에 의해 손상받은 세포를 세포고사로 진행시키거나 p21 유도에 의해 G1기 세포주기 지연을 유발하여 DNA 손상복구를 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구결과 보면 AMC-HN-9 세포주에서 p53과 p21의 AMC-HN-3 세포주에 비해서 증가되어 있는데 그 이유로 생각해 볼 수 있는 점은 p53의 발현이 Ku80의 발현을 유발하여 DNA 이중나선 구조를 복구하고, 다른 측면에서는 p21을 유도하여 세포주기에 영향을 주어 DNA 손상복구에 필요한 시간을 조절하는 것으로 생각된다. 하지만 방사선, p53, Ku에 대한 상호 작용에 대한 자세한 기전은 아직까지 밝혀져 있지 않아 향후 Ku 단백질의 발현을 유발하는 데 기여하는 신호전달체계에 대한 연구를 계속 진행해야 할 것이다.

방사선치료의 실패원인 중의 하나는 암세포의 방사선에 대한 저항성 때문으로 추측되는데 방사선에 의한 반응성을 향상시키기 위해서 Ku 단백질 발현에 관여하는 물질과 신호전달체계를 억제하여 Ku 단백질 발현 자체를 억제하거나 Ku 단백질이 손상된 DNA에 부착하지 못하게 하거나 Ku 단백질이 손상된 DNA에 결합된 후 nonhomologous DNA end-joining (NHEJ)을 억제하여 궁극적으로 손상된 DNA 복구를 억제할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요할 것이다. 카페인이나 wortmanine은 ATM kinase를 억제하는 것으로 알려져 있어 직접적으로 Ku발현을 억제하지 못한다 하더라도 ATM kinase를 억제함으로써 간접적으로 Ku 발현이 억제되는지를 실험하면 좀더 Ku 발현에 대한 기전의 연구에 도움이 될 것으로 생각된다.

요약하면 AMC-HN-9 세포주가 방사선에 저항성을 나타내는 이유는 p53 발현에 의해 Ku80의 발현이 증가되어 DNA 손상복구가 AMC-HN-3 세포주에 비해 상대적으로 더 많이 일어나기 때문이고 DNA 손상 복구와 관련하여 p53의 발현이 p21을 유도하고 세포주기에 영향을 주어 DNA 손상 복구에 필요한 시간을 세포주기 지연을 통해 연기 때문일 것으로 생각되었다. Ku 발현을 방사선치료의 예측인자로 활용할 수 있다면 방사선치료에 민감한 환자에서는 방사선치료 선량을 줄일 수 있게 되어 방사선치료에 따른 부작용을 현저히 줄일 수 있을 것이다. 또한 Ku 억제자를 개발하거나 돌연변이를 유발하여 Ku의 기능을 억제함으로써 방사선치료의 민감도를 현저히 증진시킬 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature (Lond.)* 1992;358:15-16
2. Hammarsten O, DeFazio LG, Chu G. Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J Biol Chem* 2000;275:1541-1550
3. Lieber MR, Grawunder U, Wu X, Yaneva M. Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7:99-104
4. Plumb MA, Smith GC, Cunniffe SM, Jackson SP, O'Neill P. DNA-PK activation by ionizing radiation-induced DNA single-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 1999;75:553-561
5. Weaver DT. Regulation and repair of double-strand DNA breaks. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6:345-375
6. Doherty AJ, Jackson SP. DNA repair: how KU makes ends meet. *Curr Biol* 2001;11:R920-R924
7. Dynan WS, Yoo S. Interaction of ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1551-1559
8. Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 1981;68:611-620
9. Weaver DT. Telomeres: moonlighting by DNA repair proteins. *Curr Biol* 1998;8:R492-R494.
10. Haber JE. Sir-Ku-itous routes to make ends meet. *Cell* 1999;97:829-832
11. Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 1999;13:916-934
12. Tuteja R, Tuteja N. Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000;35:1-33
13. Kim SY, Chu KC, Lee HR, Lee KS, Carey TE. Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines. *Acta Otolaryngol* 1997;117:775-84
14. Wilson CR, Davidson SE, Margison GP, Jackson SP, Hendry JH, West CM. Expression of Ku70 correlates with survival in carcinoma of the cervix. *Br J Cancer*. 2000;83: 1702-1706
15. Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, et al. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer* 2002; 95:1199-1205
16. Friesland S, Kanter-Lewensohn L, Tell R, Munck-Wikland E, Lewensohn R, Nilsson A. Expression of Ku86 confers favorable outcome of tonsillar carcinoma treated with radiotherapy. *Head Neck* 2003;25:313-321
17. Kim SH, Carey TE, Liebert M, Yoo SJ, Kwon HJ, Kim SY. Characterization of AMC-HN-9, a cell line established from an undifferentiated carcinoma of the parotid gland: Expression of $\alpha\beta4$ with the absence of BP180 and 230. *Acta Otolaryngol* 2000;120:660-666.
18. Yoko H, Satoshi S, Yoshitaka M, et al. Expression of Ku80 in cervical cancer correlates with response to radiotherapy and survival. *Am J Clin Oncol* 2003;26:e80-e85

Abstract

Expression of Ku Correlates with Radiation Sensitivities in the Head and Neck Cancer Cell Lines

Sang-wook Lee, M.D.*, Eunsil Yu, M.D.[†], So-Lyoung Yi, M.S.*,
Se-Hee Son, B.S.*, Jong Hoon Kim, M.D.*, Seung Do Ahn, M.D.*,
Seong Soo Shin, M.D.* and Eun Kyung Choi, M.D.*

Departments of *Radiation Oncology, [†]Pathology, University of Ulsan
College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea

Purpose: DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) is a serine/threonine kinase consisting of a 470 kDa catalytic subunit (DNA-PKcs) and a heterodimeric regulatory complex, called Ku, which is composed of 70 kDa (Ku 70) and 86 kDa (Ku 80) proteins. The DNA-PK has been shown to play a pivotal role in rejoining DNA double-strand-breaks (dsb) in mammalian cells. The purpose of this study is to examine the relationship between the level of Ku expression and radiation sensitivity.

Methods and Materials: Nine head and neck, cancer cell lines showed various intrinsic radiation sensitivities. Among the nine, AMC-HN-3 cell was the most sensitive for X-ray irradiation and AMC-HN-9 cell was the most resistance. The most sensitive and resistant cell lines were selected and the test sensitivity of radiation and expression of Ku were measured. Radiation sensitivity was obtained by colony forming assay and Ku protein expression using Western blot analysis.

Results: Ku80 increased expression by radiation, whereas Ku70 did not. Overexpression of Ku80 protein increased radiation resistance in AMC-HN9 cell line. There was a correlation between Ku80 expression and radiation resistance. Ku80 was shown to play an important role in radiation damage response.

Conclusion: Induction of Ku80 expression had an important role in DNA damage repair by radiation. Ku80 expression may be an effective predictive assay of radiosensitivity on head and neck cancer.

Key Words: Ku70/80, irradiation, Head and neck cancer cell line