인체 S100A2 단백질에 특이적인 단일클론 항체

[1]한국생명공학연구원 세포생물학연구실, [2]을지의과대학 임상병리학교실,
[3]한국생명공학연구원 유전체사업단

김재화[1] · 윤선영[1] · 김주헌[2] · 주종혁[1] · 김진숙[1]
이영희[1] · 염영일[3] · 최용경[1] · 최인성[1]

Characterization of the Monoclonal Antibody Specific to Human S100A2 Protein

Jae Wha Kim[1], Sun Young Yoon[1], Joo Heon Kim[2], Jong-Hyuck Joo[1], Jin Sook Kim[1], Younghee Lee[1], Young Il Yeom[3], Yong-Kyung Choe[1] and In Seong Choe[1]

[1]Cell Biology Laboratory, KRIBB, [2]Department of Pathology, Eulji University, School of Medicine, [3]Genome Research Center, KRIBB, Daejeon, Korea

ABSTRACT

Background: The S100A2 gene, also known as S100L or CaN19, encodes a protein comprised of 99-amino acids, is a member of the calcium-binding proteins of EF-hand family. According to a recent study, this gene was over-expressed in several early and malignant carcinomas compared to normal tissues. To elucidate the role of S100A2 protein in the process during carcinogenesis, production of monoclonal antibody specific to the protein is essential. **Methods:** First, cDNA sequence coding for ORF region of human S100A2 gene was amplified and cloned into an expression vector to produce GST fusion protein. Recombinant S100A2 protein and subsequently, monoclonal antibody to the protein were produced. The specificity of anti-S100A2 monoclonal antibody was confirmed by immunoblot analysis of cross reactivity to other recombinant proteins of S100A family (GST-S100A1, GST-S100A4 and GST-S100A6). To confirm the relation of S100A2 to cervical carcinogenesis, S100A2 protein in early cervical carcinoma tissue was immunostained using the monoclonal antibody. **Results:** GST-S100A2 recombinant protein was purified by affinity chromatography and then fusion protein was cleaved and S100A2 protein was isolated. The monoclonal antibody (KK0723; Korean patent pending #2001-30294) to the protein was produced and the antibody did not react with other members of EF-hand family proteins such as S100A1, S100A4 and S100A6. **Conclusion:** These data suggest that anti-S100A2 monoclonal antibody produced in this study can be very useful for the early detection of cervical carcinoma and elucidation of mechanism during the early cervical carcinogenesis. **(Immune Network 2003; 3(1):16-22)**

Key Words: S100A2, monoclonal antibody, cervical carcinoma

서 론

인체 S100A2 단백질은 세포 내 칼슘이온과 결합하여 칼슘기능을 조절하는 19종류의 S100 칼슘결합 단백질 중의 하나로 1996년 epidermal differentiation complex (EDC)의 구성유전자 중 하나로서 발견되었다(1,2). S100A2 유전자는 상피구조의 최종 분화과정에 매우 중요하게 관련되어 있으며 구조 및 기능적으로 유사한 유전자들의 집합체인 epidermal differentiation complex (EDC)가 위치하고 있는 인간 1번 염색체의 q21에 위치하고 있다. S100A2 칼슘결합 단백질은 일부 정상조직에만 분포되어 있다고 알려져 있었으며(3,4) 최근에는 피부관련 종양, 유방암, 후두의 편평 상피세포 암종과 같은 인체의

책임저자 : 최인성, 한국생명공학연구원 세포생물학실
㉾ 305-600, 대전광역시 어은동 52번지
Tel: 82-42-860-4180, Fax: 82-42-860-4593
E-mail: choemcbg@kribb.re.kr
본 연구는 2002년도 한국생명공학연구원 기관고유사업비(KGS2010212)와 정책연구사업비(NTM0020213)에 의하여 이루어졌음.

일부 특정종양에서도 발현된다고 보고되었다(5-8). 인체 S100A2 유전자는 promoter 영역 내에 p53 종양억제 단백질과의 결합부위를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, p53 활성인자인 etoposide에 의하여 S100A2 mRNA의 발현이 유도되는 결과로 보아 종양세포주의 핵 내에서 p53 단백질에 의하여 조절되는 종양억제 유전자로서의 기능을 가질 것으로 생각되고 있다(9). 그러나 인체 keratinocyte 유래의 HaCaT 세포주에서 상피 성장인자 수용체의 활성화와 관련되어 S100A2 단백질이 증가되는 것으로 보아 편평 상피세포의 재생 및 종양발생과 관련되어 있을 가능성을 제기하고 있다(10). S100A2 단백질은 *in vitro* 실험결과 근육세포에서 칼슘이온의 존재 하에 tropomyosin과 결합하거나(11) 세포 내의 기능을 위하여 homodimer를 형성하는 것으로 알려져 있으나(5), S100A2 칼슘결합 단백질의 세포 내 역할 및 기능에 대한 구체적이고 정확한 사실은 아직 연구 중에 있다. 실제 종양세포의 형질전환 및 침윤과정에서 일어나는 칼슘이온의 항상성 유지는 매우 중요한 부분이다. 두 개의 EF-hand 구조를 가지는 S100 단백질들 중에서 DNA 염기서열에서 서로 상동성이 높은 S100A4와 S100A6는 종양의 발달 및 전이와 관련되어 연구되어 왔으며 여러 종류의 암세포에서 그 발현이 증가하는 것이 알려져 있어 RNA 또는 단백질 수준에서 진단 표식자로서 활용을 하고 있거나 그런 가능성을 지닌다(12-14). 인체 구성세포 및 종양의 발생과 관련된 S100A2 단백질의 기능분석 및 연구결과에 대한 보고는 몇 건에 불과한 바, S100A2 단백질에 특이적으로 반응하는 단일클론 항체와 이 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주의 제작은 S100A2 칼슘결합 단백질의 세포 내 기능분석과 임상적으로는 종양 진단에 높은 활용가치가 있다고 판단된다.

본 연구에서는 S100A2 유전자를 이용하여 S100A2 재조합 단백질을 생산한 후, S100A2 단백질을 인식하는 단일클론 항체 및 이를 생산하는 융합 세포주를 제작하고 생산된 단일클론 항체의 특이성을 검증하였으며 실제 자궁경부의 상피 내 종양(cervical intraepithelial neoplasia; CIN)의 S100A2 단백질의 발현형태를 조사하여 이 단일클론 항체의 활용가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물, 세포주 및 환자 조직. 융합세포주의 제작에 필요한 면역화 된 마우스를 얻기 위하여 생후 6~8주 된 Balb/c 마우스를 사용하였고 이 실험동물들은 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)내의 실험동물센타로부터 분양 받아 항온·항습실에서 사육하면서 실험하였다. 인체 유방암(breast carcinoma) 세포주인 MD-MBA 231 세포주와 세포융합 시 모세포(parent cell)로 사용되는 SP2/0·Ag14 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland)으로부터 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY)을 함유하는 RPMI 1640 (Gibco-BRL) 배지에서 배양하였다. 본 실험실에서 제조한 단일클론 항체의 세포 내 S100A2 단백질에 대한 반응성을 확인하고자 을지 의과대학 병원에서 외과적으로 절제된 자궁경부암 환자의 조직들을 조직화학염색을 위하여 10% formalin 용액에 고정하였다.

인체 S100A2 재조합 단백질을 생산하는 발현벡터의 제조. 인체 S100A2 유전자(GenBank accession number, NM005978)의 전체 open reading frame (ORF) 서열을 얻기 위해 인체 유방암 세포주인 MD-MBA 231 세포로부터 추출한 cDNA를 주형으로 하여 두 종류의 primer, 5'-CGGGATCCATGTGCAGTTCTCTGGAG-3'과 5'-CGGAATTCTCAGGGTCGGTCTGGGCA-3'를 사용하여 PCR로 증폭시킨 후, 이를 제한효소 BamHI과 EcoRI으로 절단하여 300 bp 크기의 DNA 절편을 분리·정제하여 얻었다. 정제한 DNA 절편을 BamHI과 EcoRI으로 절단한 후 분리한 pGEX4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, UK) vector와 접합 시켜 제조한 GST-S100A2 발현벡터를 사용하여 DH5α 대장균을 형질전환 시켰다. 또한 제조한 단일클론 항체의 특이성을 확인하기 위하여 S100A2 유전자와 유사한 구조를 지니며 인체 암과 관련이 있는 S100 유전자들 중 S100A1 (GenBank number, NM006271), S100A4 (GenBank number, 002961), S100A6 (GenBank number, M18981) 유전자의 재조합 단백질을 제조하였다. 각각의 S100 family 유전자들의 전체 ORF 서열을 얻기 위하여 S100A1은 5'-CGGGATCCATGGGCTCTGAGCTGGAG-3'과 5'-CGGAATTCTCAACTGTTCTCCCAGAA-3'를, S100A4의 경우는 5'-CGGGATCCATGGCGTGCCCTCTGGAG-3'과 5'-CGGAATTCTCATTTCTTCCTGGGCTG-3'를, S100A6는 5'-CGGGATCCATGGCATGCCCCTGGATCAGG-3'과 5'-CGGAATTCTCAGCCCTTGAGGGCTTCAT-3' primer를 사용하여 증폭한 후 S100A2 유전자와 동일하게 pGEX4T-1 vector와 접합 시킨 후 DH5 대장균을 형질전환 시켰다.

인체 S100A2 재조합 단백질의 분리·정제. GST- S100A2와 다른 S100 재조합 단백질 발현 vector들로 형질전환 시킨 대장균을 37°C에서 배양한 후 1 mM IPTG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)로 각각의 재조합 단백질 생산을 유도하였다. 우선 단일클론 항체를 제조하기 위한 항원으로 사용될 S100A2 단백질은 대량의 GST- S100A2 재조합 단백질의 발현을 유도시킨 배양액을 원심분리 하여 균체를 회수한 후 초음파로 파쇄하고 세포조액(cell lysates)의 상등액에 존재하는 GST-S100A2 재조합 단백질을 GST affinity column (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 분리·정제하였다. 정제된 GST- S100A2 재조

합 단백질은 thrombin (Sigma-Aldrich)으로 GST 단백질 부위를 절단한 후 S100A2 단백질 부위만을 gel elution 방법(15)을 사용해 SDS-PAGE로 분리 농축하였다. 최종 농축된 단백질의 양은 Bradford 시약(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용하여 측정한 결과 1 mg/ml이었다. 분리·정제된 단백질들은 15% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동 하여 그 크기를 확인하였다. 반면에 다른 S100 재조합 단백질들은 1 mM IPTG로 각각 발현을 유도한 후 각각의 세포조액을 12% SDS-PAGE로 분리하여 Coomassie blue 염색과 GST 항체를 이용한 immunoblotting 방법으로 확인하였다.

인체 S100A2 재조합 단백질에 대한 단일클론 항체의 제조. 융합세포주(hybridoma)의 제작에 필요한 면역화된 마우스를 얻기 위하여 Harlow와 Lane(16)이 제시한 방법에 따라 PBS 용액에 용해된 인체 S100A2 재조합 단백질(10μg/100μl)을 완전 보조항원(complete adjuvant, Sigma-Aldrich)과 함께 섞어 생후 6주 된 마우스의 복강 내에 주사하였다. 2주 간격으로 1차 면역주사한 것과 동일한 양의 항원을 불완전 보조항원(incomplete adjuvant, Sigma-Aldrich)과 함께 섞어 생쥐의 동일 부위에 2～3차례 주사한 후 4～5일 후에 면역화된 마우스의 혈액을 소량 채취하여 96 well microtiter plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 well당 1μg의 재조합 단백질을 부착시켜 ELISA 방법으로 항체의 역가를 확인하고 융합세포주를 제조하는 단계로 진행하였다. 단일클론 항체를 분비하는 융합세포주를 제조하는데 거치는 세포융합(cell fusion), 융합세포의 선별과정, 단일클론 항체의 대량생산 방법은 특허(출원번호, 2001-30294)에 제시된 내용에 따라 실시하였다. S100A2 재조합 단백질에 대한 항체를 분비하는 융합세포주를 배양한 배양액에 있는 단일클론 항체의 역가는 ELISA 방법으로 측정하였다. 또한 생산된 단일클론 항체의 immunoglobulin 아형의 결정은 ImmunoType™ Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Sigma-Aldrich)을 사용하여 확인하였다.

단일클론 항체와 S100A2 재조합 단백질의 항원-항체 반응. 분리·정제된 단일클론 항체의 인체 S100A2 재조합 단백질에 대한 특이성은 immunoblotting 방법으로 확인하였다. 우선 서로 유사한 구조를 지니는 인체 S100 family 중 S100A1, S100A4, S100A6 단백질들과 단일클론 항체와의 반응성을 확인하여 인체 S100A2 단백질에 대한 특이성을 검증하였다. 각각의 S100 family 재조합 단백질들을 1 mM IPTG로 발현을 유도하여 얻은 세포조액을 12% SDS-PAGE로 분리하고 PVDF 막(Millipore, Bedford, MA)으로 단백질들을 옮긴 후 5% skim milk로 막을 차단하여 비특이적인 반응을 방지하고 1차 항체로 준비된 단일클론 항체(1μg/μl)를 1,000배로 희석하여 상온에서 2시간 결합시켰다. 이후 PVDF 막을 PBST 용액으로 3회 세척하고 2차 항체로 anti-mouse IgG-HRP (Sigma-Aldrich)을 상온에서 30분간 반응시켰다. 항원-항체반응을 나타내는 발색과정은 HRP (Horse radish peroxidase)의 기질로 사용되는 0.018% chloro-1-naphtol (Sigma-Aldrich)와 0.045% H_2O_2을 사용하여 반응시켰다.

인체 자궁경부암 조직에서의 S100A2 단일클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색법. 10% formalin 완충액으로 고정한 자궁경부암 환자의 조직을 파라핀에 포매하고 포매시킨 조직을 microtome으로 얇게 박절한 다음 이 절편을 glass slide 위에 고정하여 xylene과 histoclear 용매로 파라핀을 제거하였다. 절편을 1 M Tris 완충용액으로 세척한 후 1차 항체로 200배 희석한 S100A2 단일클론 항체(1μg/μl)를 40°C에서 20분 간 처리하였다. 다시 1 M Tris 완충액으로 완전히 세척한 후 2차 항체로 biotin-labeled avidin-horseradish peroxidase (Vector, Burlingame, CA)을 40°C에서 10분 간 처리하고 반응하지 않은 2차 항체를 완전히 세척하였다. 이 절편들을 peroxidase 기질 용액인 0.05% H_2O_2를 포함한 3-amine-9-ethylcarbazole 용액에 반응시켜 Meyer's hematoxylin으로 대조염색시키고 slide를 봉합한 후 관찰하였다.

결 과

인체 S100A2 재조합 단백질의 발현 및 정제. 인체 유방암 세포주인 MD-MBA 231의 cDNA로부터 얻은 인체 S100A2 유전자의 전체 ORF 지역을 포함하는 pGEX4T-1-S100A2 발현벡터로 형질전환 시킨 대장균을 배양하며 1 mM IPTG로 S100A2 재조합 단백질의 발현을 유도 시킨 후 12% SDS-PAGE로 확인해 본 결과, 분자량이 약 38 kDa에 해당하는 GST-S100A2 단백질이 전체 단백질의 30% 정도로 과발현되었음을 확인하였고 이 과발현된 GST-S100A2 재조합 단백질의 존재는 anti-GST 항체로 다시 확인하였다(Fig. 1A). 과발현 된 GST-S100A2 재조합 단백질의 가용성을 확인하기 위하여 재조합 단백질의 생산을 유도한 균체를 PBS 용액 중에서 초음파로 파쇄하여 세포조액의 상등액을 SDS-PAGE로 분석한 결과 과발현 된 단백질의 90% 이상이 가용성임을 확인하였다. 이 재조합 단백질을 GST affinity column으로 분리한 다음 thrombin 효소의 인식부분을 지니는 GST-S100A2 재조합 단백질을 thrombin 효소로 처리하고 그 반응정도를 확인해 본 결과 약 70% 정도의 융합단백질이 GST (약 29 kDa)와 S100A2 (약 10 kDa)로 절단되었다(Fig. 1B). S100A2 단백질에 특이적인 항체 생산을 위하여 GST 부분이 제거된 S100A2 단백질만을 SDS-PAGE 상에서 전기적인 방법으로 추출하여 농축한 것을 6～15% gradient gel 상에서 Coomassie blue 염색으로 확인하였다(Fig. 1B).

인체 S100A2 단백질에 대한 단일클론 항체의 제조 및

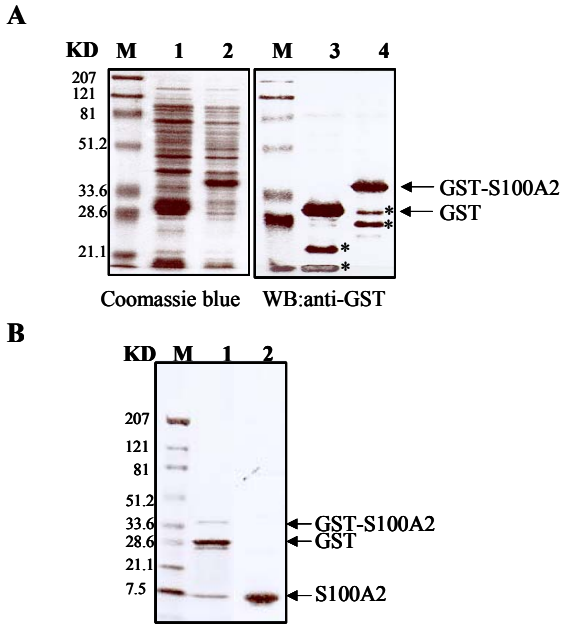

Figure 1. Expression of GST-S100A2 fusion protein and immnunoblot analysis with anti-GST antibody. A. GST (approximately 29 kDa, lane 1) and GST-S100A2 recombinant protein (approximate molecular weight of 39 kDa, lane 2) were induced by 1 mM IPTG and the recombinant proteins were identified by immunoblot analysis using anti-GST antibody (lane 3, 4). B. GST-S100A2 recombinant protein was purified using the glutathione-sepharose 4B affinity chromatography and then the recombinant protein was cleaved by thrombin (lane 1). The cleaved S100A2 protein was extracted from SDS-PAGE gel by electroelution and concentrated (lane 2). *: the degraded proteins of GST-S100A2. Lane M: prestained protein marker.

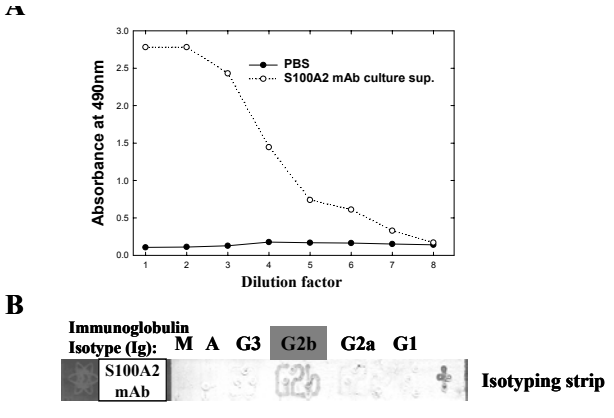

Figure 2. Characterization of monoclonal antibody to S100A2 recombinant protein. A. Titration of S100A2 using anti-S100A2 monoclonal antibody was carried out by ELISA method. Each microtiter plate well was coated with 100 ng S100A2 recombinant protein and the coated proteins were reacted with diluted anti-S100A2 antibodies. Dilution factor represents the logarithmic value. B. The isotype of monoclonal antibody produced by a hybridoma cell line produced in this study and named KK0723 was determined as IgG_{2b}.

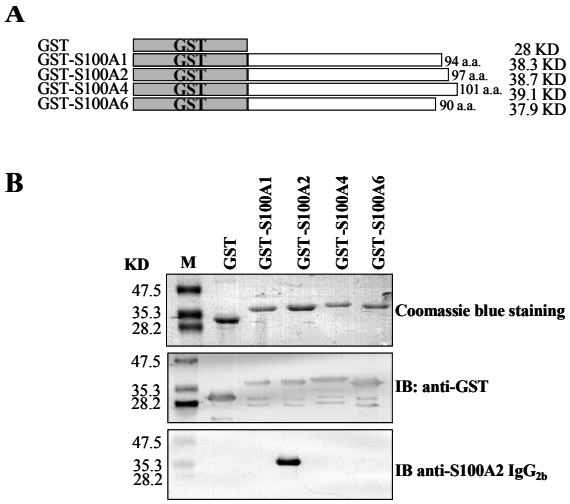

Figure 3. Specificity determination of anti-S100A2 monoclonal antibody to S100A2 recombinant protein. A. This diagram shows a schematic design for other fusion proteins of GST and S100A family proteins. B. Cross reactivity of anti-S100A2 monoclonal antibody was tested with recombinant fusion proteins such as GST-S100A1, GST-S100A4 and GST-S100A6. All these proteins were analyzed on SDS-PAGE (upper panel) and then transferred to PVDF membrane. The membrane was incubated with anti-GST (middle panel) and later anti-S100A2 antibodies (lower panel). Virtually anti-S100A2 monoclonal antibody showed no cross-reactivity to other S100A proteins and had strong affinity to S100A2 protein only.

특성. 정제된 약 10 kDa 크기의 S100A2 단백질을 항원으로 사용하여 생후 6주 된 3마리의 마우스를 면역화 시킨 후 이미 보고한 방법(특허 출원번호, 2001-30294)에 따라 단일클론 항체를 분비하는 융합세포주를 선별하여 한국생명공학연구원 유전자원센타에 기탁하였다(기탁번호, KCTC 0689BP). 이 융합 세포주에서 분비되는 단일클론 항체의 항원 특이성을 확인하기 위하여 융합 세포주를 배양한 배양액을 이용하여 정제된 S100A2 재조합 단백질에 대한 항원-항체 반응을 ELISA방법으로 확인한 결과 microtiter plate의 well에 부착된 S100A2 단백질에 대해서는 높은 반응을 나타냈으나 대조군으로 사용한 RPMI 1640 배지의 경우 항원-항체 반응이 일어나지 않았다 (Fig. 2A). 이 단일클론 항체의 아형은 ImmunoType™ Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Sigma-Aldrich)으로 결정하였으며 제조회사가 제시한 방법에 따라 확인한 결과 IgG_{2b}임을 확인하였다(Fig. 2B).

인체 S100A2 단백질에 대한 단일클론 항체의 특이성. S100A2 재조합 단백질을 항원으로 하여 생산된 단일클론 항체가 S100A2 단백질만을 특이적으로 인식하는가를 검증하는 한 방법으로 S100 family protein 중 S100A2 단백질과 유사한 구조를 지니고 있는 S100A1, S100A4, S100A6 유전자들을 각각에 특이적인 primers를 이용하여 인체 간암 세포주(HepG2)와 유방암 세포주(MD-MBA

231)로부터 PCR 방법으로 확보한 후 이들을 GST 재조합 단백질로 발현시켜 단일클론 항체가 어떠한 교차반응을 나타내는지 Western blotting 방법으로 확인하였다. 그 결과 GST, GST-S100A1, GST-S100A4 그리고 GST-S100A6 단백질들은 anti-S100A2 단일클론 항체와 반응하지 않았고 GST-S100A2 재조합 단백질에만 그 특이성을 보였다(Fig. 3B). 각각의 GST 융합 단백질들은 Fig. 3A의 모식도에서 제시된 것과 동일하게 제조되었음을 Coomassie blue 염색과 anti-GST 항체로 검증하였다(Fig. 3B).

인체 자궁경부암 조직에서의 S100A2 단백질에 대한 단일클론 항체의 특이성. 인체 S100A2에 대한 단일클론 항체의 특이성을 검증하는 또 다른 방법으로 실제 자궁경부암 환자의 조직을 대상으로 이 실험에서 제조된 단일클론 항체를 이용하여 시료조직 상에서 인체 S100A2 단백질 분포를 확인하였다. 그 결과, 조직학적으로 정상 소견을 보이는 조직시료는 S100A2 단백질의 발현이 상피조직 하단부에 발현이 있으나 전반적으로 적게 발현되고 있음을 확인하였고 자궁경부암의 초기 발생단계로 분류되는 이형성(dysplasia)과 상피내암(cervical intraepithelial neoplasia: CIN) 조직시료에서는 정상조직에 비해 다량의 S100A2 단백질의 증가가 확인되었다(Fig. 4). Fig. 4에서 보는 바와 같이 정상 자궁조직의 세포는 대부분이 인유두종 바이러스가 그 발생원인이며 자궁경부암의 초기단계인 이형성 발생 시에는 정상세포에 비하여 핵 내의 DNA 양의 변화에 따라 polyploidy를 나타내는 세포들로 변하고 궁극적으로 상피내암으로의 진행에 이어 침윤암 단계로 진전되어 생명에 치명적인 병변이 될 수도 있다. 이형성과 상피내암에 분포하는 S100A2 단백질은 대부분이 세포질에 분포하고 있으며 상피내암의 경우 종종 핵 내에 분포하는 S100A2 단백질도 확인할 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 인체의 상피세포의 재생 및 이와 관련한 종양발생에 밀접한 관련이 있는 S100A2 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체를 제조하는 융합 세포주와 그 항체를 이용하여 자궁경부암 조직에 특이적으로 과발현 되는 인체 S100A2 단백질을 인식하여 정상세포와 암세포를 식별할 수 있는 표식자로서의 활용 가능성을 제시함을 목적으로 하였다. 인체 S100A2의 세포 내 기능은 현재까지 정확히 알려진 바 없으나 1990년대 초에 유방암 세포에서 발현이 감소하는 S100 단백질들 중 하나로 확인되었으며(17) 이후 암화 된 조직에서보다 특정 정상조직이나 세포에서 발현이 높고 암화 과정이 진행됨에 따라 발현이 감소한다는 보고가 있은 후 실제로 암 억제 관련유전자로 보고되고 있다(12-14,18-20). 또한 DNA에 대한 손상을 유도할 때 과발현 되는 p53 단백질에 의해 S100A2 단백질의 발현이 조절된다는 보고도 있다(21). 그러나 최근 연구에서 S100A2 단백질이 후두의 정상조직보다 상피세포암 조직에서 과발현되고 있음

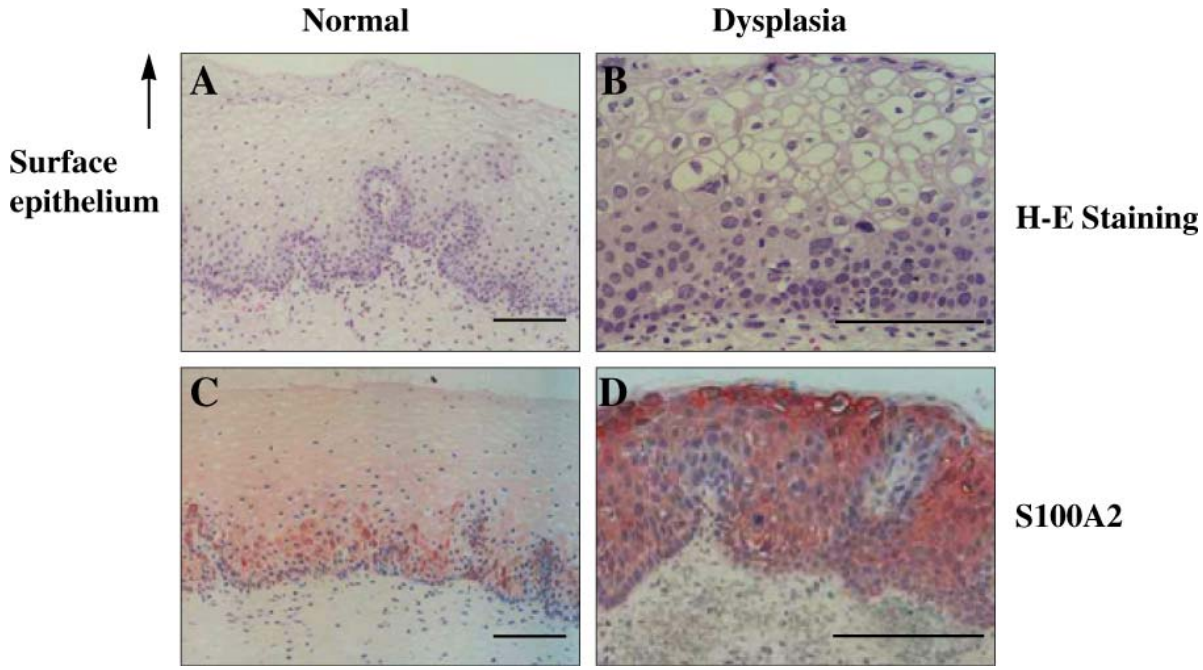

Figure 4. Immunohistochemical staining for S100A2 of early stage of cervical carcinoma and normal cervix tissues. Normal cervix and dysplasia tissues from a patient diagnosed cervical carcinoma were stained with Hematoxylin & Eosin (A, B) and anti-S100A2 monoclonal antibody (C, D). S100A2 expression in dysplasia of cervix was higher compared to normal counterpart. Bar = 100μm.

을 확인하였고(22) keratinocyte 유래의 HaCaT 세포주에서 상피 성장인자(epidermal growth factor)의 자극에 의해 S100A2 발현이 증가된다는 사실(10) 등 기존의 보고와 상반되는 내용의 연구결과가 발표되어 있다. 본 연구에서도 S100A2 발현이 자궁경부의 정상조직보다 상피내암 조직에서 그 발현이 현저히 증가됨이 밝혀졌다. 이러한 상반된 연구결과의 원인은 정확히 규명할 수는 없으나 서로 다른 세포나 조직의 종류에 따라서 단백질의 발현조절 기전에 차이가 있을 것으로 추측된다.

본 연구에서 제작한 인체 S100A2 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 자궁경부암 환자의 조직에서 S100A2 단백질의 발현을 확인한 결과 정상조직보다는 자궁경부암 초기 단계인 이형성(dysplasia), 상피내암 조직에서 발현이 현저히 증가함을 확인하였다(Fig. 4). 자궁경부암의 초기 발생단계에서 S100A2 단백질이 과발현 됨을 확인하였고 이 단백질이 자궁경부암에 대한 조기진단용 표식자로서 활용될 수 있음을 확인함으로서 이 단백질에 특이적인 단일클론 항체를 확보하는 것은 활용가치가 높다고 판단된다. 또한 자궁경부 질환의 진단은 다른 장기의 질병을 진단하는 것보다 환자의 조직을 쉽게 채취할 수 있다는 면에서 조기진단이 유리한데 특히 S100A2 단백질의 과발현이 자궁경부의 상피내암에 국한되어 있는 사실은 조기진단 표식자로서 활용가능성이 높음을 알 수 있다.

본 연구실에서 제조한 인체 S100A2 단백질에 대한 단일클론 항체는 현재 보급되고 있는 Sigma사의 anti-S100A2 항체(Clone SH-1)와는 항체를 생산하기 위하여 사용한 항원이 구별된다. Sigma사의 경우 돼지의 위 조직에서 분리·정제한 S100A2 단백질을 사용한 반면에 본 연구실에서는 인체의 S100A2 재조합 단백질을 생산하여 이용하였다. 또한 각각의 단일클론 항체의 아형에 차이가 있으며 S100A2와 유사한 S100A1, S100A4 그리고 S100A6와의 cross-reactivity가 전혀 없는 항체로서 특허출원이 완료된 상태이다(특허출원번호: 2001-30294). 따라서 본 연구는 인체 S100A2 단백질에만 특이적인 단일클론 항체를 확보함으로써 기존에 연구가 미비한 조기진단 분야에서 임상적으로 활용하여 체계적인 연구수행을 위한 초석이 될 수 있고 또한 S100A2 단백질이 자궁경부의 초기 암 발생과 밀접한 관련이 있다면 암 치료제의 표적 단백질로서의 가능성도 크다고 판단된다. 본 연구에서 제작한 단일클론 항체는 임상적으로는 조기 암 진단에 유용한 표식자로서 활용 가능하고 또 앞으로 지금까지 밝혀지지 않은 세포의 암화 기전을 연구하는데 기초가 될 것이다.

참 고 문 헌

1. Donato R: Functional roles of S100 protiens, calcium-binding proteins of the EF-hand type. Biochim Biophys Acta 1450; 191-231, 1999
2. Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A: Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex (epidermal differentiation complex) on human chromosome 1q21. J Invest Dermatol 106;989-992, 1996
3. Hoyaux D, Decaestecker C, Heizmann CW, Vogl T, Schafer BW, Salmon I, Kiss R, Pochet R: S100 proteins in Corpora amylacea from normal human brain. Brain Res 867;280-288, 2000
4. Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A, Barraclough R: Expression of calcium-binding protein S100A2 in breast lesions. Br J Cancer 83;1473-1479, 2000
5. Deshpande R, Woods TL, Fu J, Zhang T, Stoll SW, Elder JT: Biochemical characterization of S100A2 in human keratinocytes:subcellular localization, dimerization, and oxidative cross-linking. J Invest Dermatol 115;477-485, 2000
6. Lauriola L, Michetti F, Maggiano N, Galli J, Cadoni G, Schafer BW, Heizmann CW, Ranelletti FO: Prognostic significance of the Ca (2+) binding protein S100A2 in laryngeal squamous-cell carcinoma. Int J Cancer 89; 345-349, 2000
7. Nagy N, Hoyaux D, Gielen I, Schafer BW, Pochet R, Heizmann CW, Kiss R, Salmon I, Decaestecker C: The Ca (2+)-binding S100A2 protein is differentially expressed in epithelial tissue of glandular or squamous origin. Histol Histopathol 17;123-130, 2002
8. Kyriazanos ID, Tachibana M, Dhar DK, Shibakita M, Ono T, Kohno H, Nagasue N: Expression and prognostic significance of S100A2 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. Oncol Rep 9;503-510, 2002
9. Tan M, Heizmann CW, Guan K, Schafer BW, Sun Y: Transcriptional activation of the human S100A2 promoter by wild-type p53. FEBS Lett 445;265-268, 1999
10. Stoll SW, Zhao X, Elder JT: EGF stimulates transcription of CaN19 (S100A2) in HaCaT keratinocytes. J Invest Dermatol 111;1092-1097, 1998
11. Gimona M, Lando Z, Dolginov Y, Vandekerckhove J, Kobayashi R, Sobieszek A, Helfman DM: Ca2+-dependent interaction of S100A2 with muscle and nonmuscle tropomyosin. J Cell Sci 110;611-621, 1997
12. Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW: Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. Int J Cancer 68;325-332, 1996
13. Maelandsmo GM, Florenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O: Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. Int J Cancer 74;464-469, 1997
14. Mueller A, Bachi T, Hochli M, Schafer BW, Heizmann CW: Subcellular distribution of S100 proteins in tumor cells and their relocation in response to calcium activation. Histochem Cell Biol 111;453-459, 1999
15. Hunkapiller MW, Lujan E, Ostrander F, Hood LE: Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. Methods Enzymol 91;227-236, 1983
16. Harlow ED, Lane D: Antibodies: a laboratory manual. In Cold Spring Harbor Laboratory. 132-312, 1988
17. Lee SW, Tomasetto C, Swisshelm K, Keyomarsi K, Sager R: Downregulation of a member of the S100 gene family in mammary carcinoma cells and reexpression by azadeoxycytidine treatment. Proc Natl Acad Sci USA 89;2504-2508, 1992
18. Wicki R, Franz C, Scholl FA, Heizmann CW, Schafer BW: Repression of the candidate tumor suppressor gene S100A2

in breast cancer is mediated by site-specific hypermethylation. Cell Calcium 22;243-254, 1997
19. Vellucci VF, Germino FJ, Reiss M: Cloning of putative growth regulatory genes from primary human keratinocytes by subtractive hybridization. Gene 166;213-220, 1995
20. Xia L, Stoll SW, Liebert M, Ethier SP, Carey T, Esclamado R, Carroll W, Johnson TM, Elder JT: CaN19 expression in benign and malignant hyperplasias of the skin and oral mucosa:evidence for a role in regenerative differentiation. Cancer Res 57;3055-3062, 1977
21. Sun Y: Identification and characterization of genes responsive to apoptosis: application of DNA chip technology and mRNA differential display. Histol Histopathol 15;1271-1284, 2000
22. Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, Reed SG: Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of cDNA subtraction and microarray analysis. Laryngoscope 110; 374-381, 2000