

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.05.0421

论著

MN1 单域抗体的筛选及功能探究

刘旭婧¹, 韩雪¹, 李铭宸¹, 马振毅², 刘喆²

(1.天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津 300070; 2.杭州师范大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 杭州 311121)

摘要 目的: 筛选并验证内在无序蛋白 Meningioma-1 (MN1) 单域抗体 (sdAbs) 及其生物学功能。方法: 利用原位邻近连接分析联合二代测序技术 (*isPLA-seq*) 筛选合成 sdAb 库, 并借助截短突变体结合实验和免疫共沉淀 (Co-IP) 验证抗体特异性; 通过假单胞菌外毒素 A (ETA) 跨膜肽递送系统导入重组 sdAb; 采用转录组测序 (RNA-seq)、基因集富集分析 (GSE) 及双荧光素酶报告实验解析其分子机制。结果: 成功筛选出靶向 MN1 的 sdAbs, 其中特异性结合 MN1 的 N 端 polyQ 无序区域的 sdAb #11, 通过 ETA 递送入胞内可显著抑制 MN1 功能。与正常细胞相比, sdAb #11 诱导 U2OS 细胞周期停滞, G0/G1 期比例升高 ($F=565.30, P<0.001$, sdAb #11/NC: $t=13.25, P<0.001$), 细胞的集落形成能力降低; RNA-seq 显示该 sdAb 通过干扰 BAF (mSWI/SNF) 复合物的染色质重塑活性, 进而下调致癌基因表达, 同时降低 MN1 mRNA 水平。结论: MN1 sdAb 具有抑制 MN1 功能, 阻滞细胞周期, 下调致癌基因的潜能。

关键词 *isPLA-seq*; 单域抗体; MN1; 转录组测序; 转录调控

中图分类号 R361+3

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)05-0421-09

Screening and functional characterization of single-domain antibodies targeting MN1

LIU Xujing¹, HAN Xue¹, LI Mingchen¹, MA Zhenyi², LIU Zhe²

(1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

Abstract Objective: To screen and functionally characterize single-domain antibodies (sdAbs) targeting the intrinsically disordered protein Meningioma-1 (MN1) and their biological functions. **Methods:** A synthetic sdAb library was screened using *in situ* proximity ligation assay sequencing (*isPLA-seq*). Antibody specificity was validated through truncated mutant binding assays and co-immunoprecipitation (Co-IP). Recombinant sdAbs were delivered into cells via a Pseudomonas exotoxin A (ETA) transmembrane peptide system. Molecular mechanisms were investigated using transcriptome sequencing (RNA-seq), gene set enrichment analysis (GSE), and dual-luciferase reporter assays. **Results:** The sdAbs targeting MN1 were successfully screened. Among them, the sdAb#11, which specifically bound to the N-terminal polyQ disordered region of MN1, could significantly inhibit the function of MN1 when delivered into the cells by ETA. Compared with normal cells, sdAb#11 induced U2OS cell cycle arrest, increased the ratio of G0/G1 phase ($F=565.30, P<0.001$, sdAb #11/NC: $t=13.25, P<0.001$), and reduced colony forming ability of cells. RNA-seq analysis revealed that sdAb downregulated oncogene expression and concomitantly reduced MN1 mRNA levels by interfering chromatin remodeling activity of the BAF (mSWI/SNF) complex. **Conclusion:** MN1 sdAb has the potential to inhibit the function of MN1, block the cell cycle and down-regulate oncogenes.

Key words *isPLA-seq*; sdAbs; MN1; RNA-seq; transcriptional regulation

内在无序蛋白和区域 (IDPs 和 IDRs) 在真核生物蛋白质组中占比达 30%~50%, 其通过动态构象参与细胞周期调控、凋亡信号转导等重要生理过程, 其异常折叠与恶性肿瘤、神经病变等密切相关^[1]。研究表明, MN1 作为典型的 IDP 成员, 不仅是急性髓系白血病 (AML) 的关键驱动因子, 还在骨源性肉瘤、胃肠肿瘤等实体瘤中呈现显著过表达特征^[2-5]。尽管 MN1 的促肿瘤机制已被逐步揭示, 但针对其

活性的靶向干预策略仍存在空白。

单域抗体 (sdAbs) 因其亚纳米级分子尺寸、优异组织穿透力及低异源免疫反应特性, 在精准靶向治疗领域展现出独特优势^[6]。笔者课题组开发过一种基于原位邻近连接分析 (*isPLA*) 的高通量 cDNA 筛选单细胞 sdAbs 的方法^[7]。本研究采用原位邻近连接分析联合二代测序技术 (*isPLA-seq*), 在体外和体内筛选并验证了靶向 MN1 的 sdAbs。功能验证也显

基金项目 国家自然科学基金 (82173320)

作者简介 刘旭婧 (1999-), 女, 硕士在读, 研究方向: 免疫学; 通信作者: 刘喆, E-mail: zheliu@tmu.edu.cn。

示了这些 sdAbs 对细胞中 MN1 的生物调节作用及其在临床前研究中的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系及质粒 HeLa、U2OS、A549、MCF-7、THP-1、RAW264.7、LLC1、4T-1 及 HEK293T 细胞系均购自美国 ATCC 生物生物标准品资源中心。细胞使用推荐培养基[含 10% 胎牛血清(FBS, 美国赛默飞生物公司)及 100 U/mL 青霉素-链霉素(美国赛默飞生物公司)]于 37℃、5% CO₂ 恒湿培养箱中培养。PCMV-HA、pcDNA3.1、pET28a、pET32a 载体购于北京安诺伦生物公司。

1.1.2 试剂、酶与抗体 主要试剂和酶:4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, 美国 Sigma 公司);牛血清白蛋白(BSA, 美国 NEB 公司);谷胱甘肽(GSH, 美国 Sigma 公司);咪唑(美国 Sigma 公司);小鼠免疫球蛋白 G(IgG, 武汉爱博泰克公司);聚乙烯亚胺(PEI, 美国 Polysciences 公司);多聚甲醛(PFA, 美国 Sigma 公司);多聚赖氨酸(美国 Sigma 公司);Protein G Sepharose CL-4B 磁珠(美国 GE 医疗公司);蛋白酶抑制剂混合物片剂(瑞士罗氏医疗公司);限制性内切酶 EcoRI、BamHI(美国 NEB 公司);PLA 原位红色检测试剂盒(美国 Sigma 公司);碘化丙啶(PI, 上海碧云天生物公司);iTaq™ SYBR® Green Supermix(美国伯乐生物公司);GST 亲和层析柱(Glutathione Sepharose 4B, 美国 GE 医疗公司);Ni-NTA 亲和柱(Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, 美国 GE 医疗公司);Lipofectamine 3000(美国赛默飞生物公司);双荧光素酶检测系统试剂盒(美国 Promega 公司)。抗体:抗 Flag 抗体(美国 Sigma 公司);抗 HA 抗体(美国 CST 公司);抗 MN1 抗体(美国赛默飞生物公司);抗 Flag M2 亲和磁珠(美国 Sigma 公司)。分子克隆与检测试剂:pEASY®-Basic 无缝克隆试剂盒、Trans2K® Plus II DNA 分子量标准(北京全式金生物公司);PageRuler™ 预染蛋白分子量标准(美国赛默飞生物公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 *isPLA* *isPLA* 实验采用 Duolink 原位红色检测试剂盒,按照说明书操作。载玻片使用含 DAPI 的 Duolink II 封片剂封片,并通过蔡司 Axiovert 200 M 显微镜成像。*isPLA-seq* 按文献^[7]方法进行:将含随机化 21-aa CDR3 的 Flag 标签 sdAb 库和不含 CDR3 区的 sdAb 作为阴性对照(sdAb con)分别与 HA 标签 MN1 共转染 HEK293T 细胞,经荧光激活细胞分选(FACS)分离 *isPLA* 阳性细胞后,通过 PCR 扩增

阳性细胞中的 sdAb DNA,并亚克隆至原载体中进行三轮筛选。CDR3 编码区测序引物为:5'-GCACCA-AAATCAACGGGAC-3'。后续实验中 sdAb con 均代表不含 CDR3 区的 sdAb 作为阴性对照。

1.2.2 重组蛋白表达、纯化与 pulldown 实验 重组蛋白表达与纯化:将 6×His 标签 MN1 及其截短突变体克隆至 pET28a 载体,sdAb #8、#11 和 sdAb con 融合蛋白(含 GST、TEV 酶切位点、ETA 转位域及 3×Flag 标签)克隆至 pET32a 载体。转化至大肠杆菌 BL21(DE3)后,于 LB 培养基(37℃)中培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8,加入 0.2 mmol/L IPTG 诱导 16 h(16℃)。细胞超声破碎后,上清经 GST 亲和层析柱或 Ni-NTA 亲和柱纯化。

pulldown 实验:将纯化的 sdAb #11 和 sdAb con 重组蛋白与 6×His 标签 MN1 全长及突变体(摩尔比 1:3)重组蛋白于缓冲液 A(20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0)中孵育,加入 Ni-NTA 琼脂糖珠(4℃, 2 h),离心洗涤后,样品经 SDS-PAGE 及考马斯亮蓝染色分析。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 U2OS 细胞以 1×10⁴/孔接种于 96 孔板,分别加入 sdAb #8、#11 或 sdAb con 重组蛋白(200、500、1 000 ng/mL)。0~8 d 后,加入 MTT (5 g/L) 孵育 4 h, DMSO 溶解甲瓩后测定 490 nm 吸光度(酶标仪)。

1.2.4 细胞周期分析 U2OS 细胞以 4×10⁵/孔接种于 6 孔板,200 ng/mL sdAb #11 和 sdAb con 重组蛋白处理 48 h 后,70%乙醇固定 12 h(4℃),碘化丙啶染色 30 min (RT),流式细胞术检测 DNA 含量(FlowJo 7.6 分析)。对数据进行分析,分析处于 G1 期、S 期和 G2 期细胞的百分比。

1.2.5 集落形成实验 U2OS 细胞以 500~1 000/孔接种于 6 孔板,200 ng/mL sdAb #11 和 sdAb con 重组蛋白处理 14 d 后,4%多聚甲醛固定 15 min,之后 0.2%结晶紫染色 5 min,对超过 50 个细胞的菌落进行计数,以数字方式采集图像。

1.2.6 RNA 提取与实时定量 PCR (qRT-PCR) 分别用 200 ng/mL sdAb #8 和 #11 与 sdAb con 重组蛋白处理 U2OS 细胞,使用 TRIzol 法提取总 RNA,使用 iTaq™ SYBR® Green Supermix 于 iQ5 实时 PCR 系统中检测 MN1、TCF4、FOXO6、HOXA10 及 MEIS1 基因表达。相关引物序列与产物大小见表 1。

1.2.7 双荧光素酶报告实验 分别用 200 ng/mL sdAb con 和 sdAb #11 重组蛋白处理 U2OS 细胞,将 HOXA10、Meis1、TCF4、FOXO6 及 MN1 启动子报告质粒与内参 Renilla 荧光素酶质粒利用 Lipofec-

表 1 qRT-PCR 引物序列及产物长度

Tab.1 Primer sequences and product length of qRT-PCR

检测基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
GAPDH	F:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R:GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	196
HOXA10	F:CTCGCCCATAGACCTGTGG R:GTTCTGCGCGAAAGAGCAC	150
MEIS1	F:GGGCATGGATGGAGTAGGC R:GGTACTGATGCGAGTGCAG	117
TCF4	F:CAAGCACTGCCGACTACAATA R:CCAGGCTGATTCATCCCACTG	142
FOXO6	F:CACCCATCAGCCTTATGAC R:GAACATGTCGAGGTCCAGGT	197
MN1	F:CCTCCCGGACTTCCACAGT R:GGCTCTTGGTTCCTCACC	163

tamine 3000 共转染 U2OS 细胞,48 h 后按照双荧光素酶检测系统试剂盒说明书测定活性。相关引物序列与产物大小见表 2。

表 2 双荧光素酶报告实验的引物序列及产物长度

Tab.2 Primer sequences and product length of dual luciferase reporter assay

检测基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
HOXA10	F:CTATCGATAGGTACCGAGTCTATC- CTACTTGAGGGGAAGGCA R:CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGG- GAAGACCCAGTGGCGCT	1 874
MEIS1	F:CTATCGATAGGTACCGAGTCTTG- TGGATGTGAGGTTTCCAG R:CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGG- AGAACCCGGAAGTAGTGG	1 493
TCF4	F:CTATCGATAGGTACCGAGTCTGAT- GTCTACAGTATACC R:CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGG- GTTGTTTCTTTGGCC	298
FOXO6	F:CTATCGATAGGTACCGAGTCTGAG- GTGCAAGCCGCGCTG R:CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGG- CCCGCCCGCTCGGG	536
MN1	F:CTATCGATAGGTACCGAGTCTGTT- GCTGCTTCTCCCGCGCT R:CAGTACCGGAATGCCAAGCTTACT- TGGCGGGGGCAGAGGG	1 235

1.2.8 转录组测序与数据分析 从 sdAb con 和 sdAb #11 重组蛋白处理的 U2OS 细胞以及正常 U2OS 细胞中提取细胞总 RNA。由北京安诺优达公司使用 NovaSeq 6000 平台完成测序。原始数据上传至 GEO 数据库(编号 GSE214561)。

1.2.9 免疫荧光与荧光显微镜成像 细胞接种于多聚赖氨酸包被的盖玻片(6 孔板),HA 标签 MN1 全长及其截短突变体(PCMV-HA 载体)与 Flag 标签抗 MN1 sdAb(#7、#8、#11、#17 和 sdAb con,均为 pcDNA3.1 载体)转染 HEK293T 细胞;Flag 标签抗 MN1 sdAb #11 和 sdAb con(均为 pcDNA3.1 载体)转染 U2OS 和 MCF-7 细胞,验证与内源性 MN1 共定位。

1% PFA 固定 10 min, PBS 清洗 2 遍,以抗 sdAb 的 Flag 抗体和抗 MN1 的 HA 或 MN1 抗体为一抗(稀释比例 1:5 000),抗 Flag/HA/MN1 抗体(稀释比例 1:500)为荧光二抗染色。使用含 DAPI 的防荧光淬灭封片剂进行封片,将盖玻片安装在玻璃载玻片上,并使用蔡司 Axiovert 扫描共聚焦显微镜进行观察。

1.2.10 免疫共沉淀与免疫印迹 U2OS 细胞中,转染 Flag 标签 MN1 sdAb(#7、#8、#11、#17)和 sdAb con(均为 pcDNA3.1 载体),验证与内源性 MN1 免疫共沉淀;转染 Flag 标签抗 MN1 sdAb #11 和 sdAb con(均为 pcDNA3.1 载体)与 HA 标签 MN1 全长及截短突变体(PCMV-HA 载体)的免疫共沉淀验证;细胞裂解液在 12 000 r/min 转速下离心 15 min 以去除不溶性部分。上清与 Protein G 磁珠预孵育(4℃,30 min),12 000 r/min 离心 10 min。上清液与 3 μL Flag 一抗(稀释比例 1:5 000)或正常小鼠 IgG 在 4℃孵育过夜,然后加入蛋白 G-Sepharose CL-4B 珠子在 4℃孵育 2 h。然后洗涤珠子,将免疫复合物进行 SDS-PAGE 电泳转膜到硝酸纤维素膜上。用相应的抗体进行免疫印迹分析,并在柯达(Kodak X 光胶片)显微镜下观察。

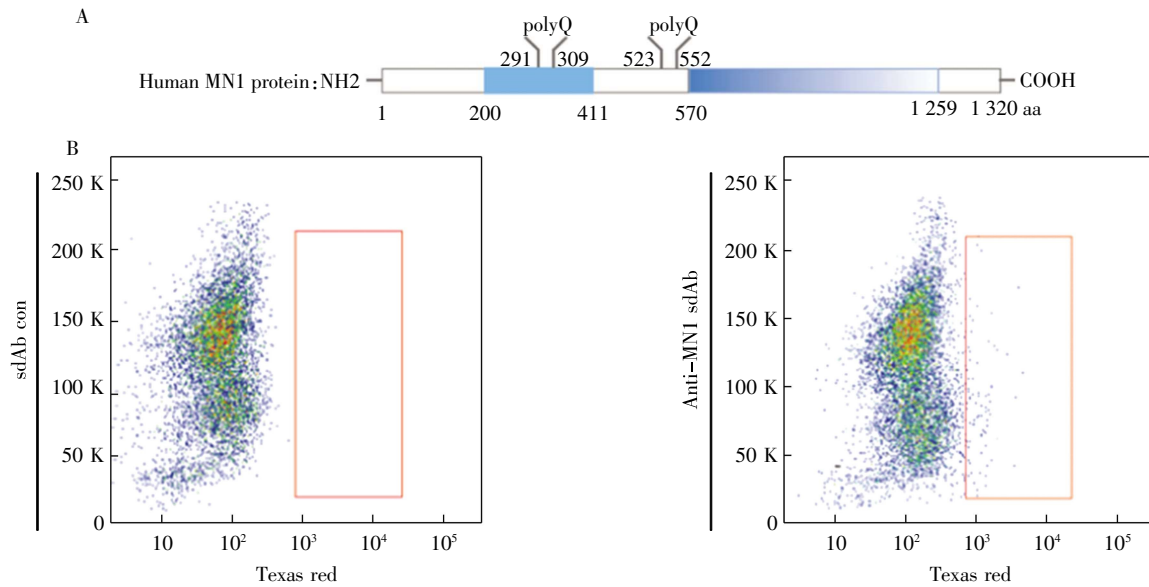
1.3 统计学处理 数据分析采用 SPSS 18.0 和 Graph-Pad Prism V5.0。结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式报告。根据数据类型,采用多因素方差分析或 *t* 检验比较不同组数据, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选和鉴定针对 MN1 的 sdAbs 经过 isPLA 筛选后,流式细胞术分选出红色荧光信号的阳性细胞(图 1A、1B)。经 3 轮筛选后,将富集的 CDR3 DNA 编码区进行测序,前 30 个 CDR3 氨基酸序列列于表 3。

利用 isPLA,免疫荧光发现与 sdAb con 相比,在 HEK293T 细胞中,所有 MN1 sdAbs(包括 #7、#8、#11 和 #17)都分别显示出与 MN1 共定位的阳性信号(图 2A)。在测试的细胞系中,人骨肉瘤 U2OS 细胞表达了非常稳定的 MN1,而 MCF-7 或 4T1 乳腺癌细胞则检测不到 MN1 蛋白(图 2B)。免疫共沉淀结果显示,在 U2OS 细胞中,与 sdAb con 相比,MN1 sdAbs(包括 #7、#8、#11 和 #17)均可高效沉淀内源性 MN1,显示出与 MN1 的特异性结合(图 2C)。

2.2 MN1sdAb 的结合域验证 进一步利用 isPLA,免疫荧光表明只有 sdAb #7、#8、#11 特异性识别 MN1 的 N 端多聚谷氨酰胺(polyQ)无序区域(200~411 aa),即第一个 polyQ 和无序区;同时,所有 4 种 sdAb 还可结合 C 端区域(571~1320 aa)及第二 polyQ



注:A:人 MN1 蛋白结构示意图;200~411 aa 及 411~570 aa 分别包含第一多聚谷氨酰胺(polyQ)富集区与第二 polyQ 富集区,其中 200~411 aa 为无序区域;B: HEK293T 细胞中,原位邻近连接分析(isPLA)阳性细胞与 sdAb con 流式细胞术对比

图 1 MN1 单域抗体的筛选

Fig.1 Screen of sdAbs against MN1

表 3 isPLA-seq 筛选得到 MN1 sdAb 的 CDR3 序列

Tab.3 CDR3 sequences of MN1 sdAb identified by isPLA-seq screening

编号	氨基酸序列	重复次数	编号	氨基酸序列	重复次数
1	VFSICALVWSRAGRGDVVTL	14 007	16	NRWARDVPGGAHFRVLDIPMF	3 274
2	GQEEVSRRRVDREHSLERCAC	13 276	17	QRVALRNDTSSTIYLEAMTTF	3 143
3	TRGVDDSSGACGSYSIHGVDVS	8 141	18	VVATERNNQGGVAVGVGLMHD	2 932
4	CSDLFNRAHWSTYVNP	7 876	19	SRYCGTWQETLPCITDCGLVS	2 818
5	CSDLFNRAHWSTYVNP	7 380	20	ARCIRYSYEPCLRVCLKGVRV	2 549
6	MLSLGRSLGSTAPCEGITWGV	4 839	21	GWPARLFQSDTFWSESKVKLV	2 535
7	ACTVTGCVTSRWCIADLVGNL	4 423	22	GGLRGIHARSATSHSLIRDCC	2 504
8	RECCNLNEKSGAWCATSMGRG	4 315	23	PLSRRFWIVPGIASHASKRWS	2 476
9	ESKDCASSVPVRLCVSFCACA	3 916	24	AATYRRTRFCRANTQVQVTRG	2 435
10	IVAGECSFSLRLTRTAPADR	3 896	25	VTRLGAEGIQAYLLLWHDYRK	2 361
11	RYWHDGKDGCEEQRGLHTTIG	3 871	26	GREPLSDVRTLRVCALRNYGL	2 359
12	RYVGRALHAGFHLGPFERSALT	3 802	27	VGSMQPHVIESYSILSKHLVP	2 323
13	ATRGVHGRVVHQFGTTTAVG	3 757	28	SVPVSCRVVNEEGVSKQYSQC	2 318
14	CVHSHQTVRLYALGFTTQRWG	3 751	29	IERRLYPLIWGTGGRLVYVSG	2 270
15	WATPDAATGPEPMDRNLIGAR	3 468	30	VKSRRMKFYEVSALEPTEFL	2 189

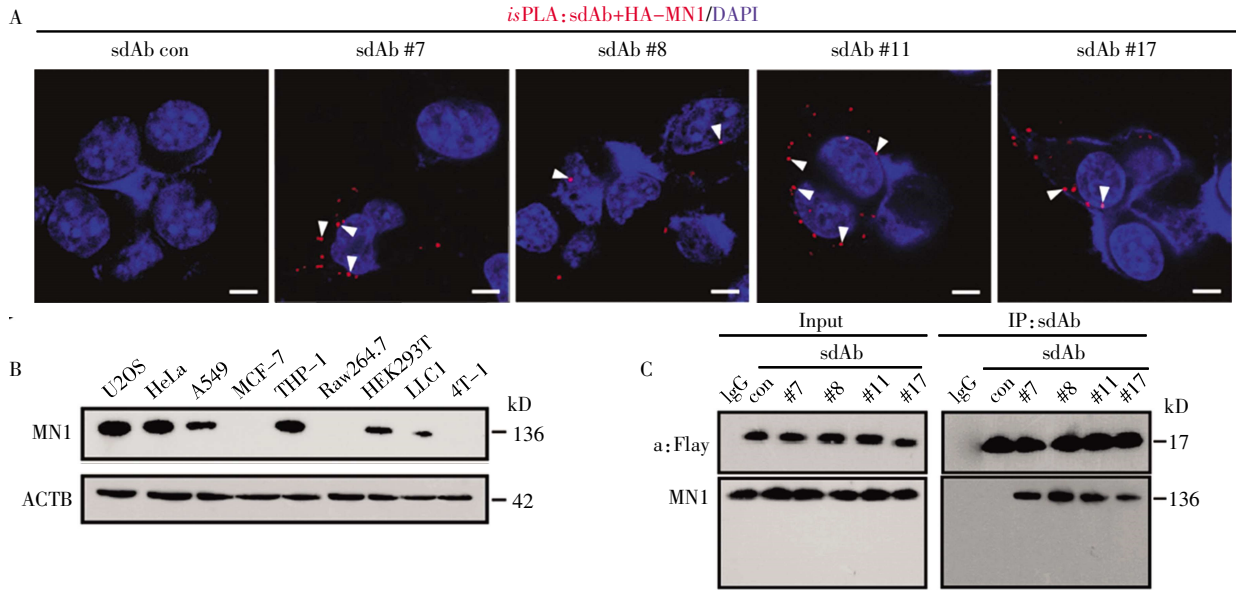
区缺失的(1~570 Δ 523~553 aa)突变体(图 3)。相较于第二 polyQ 区(523~553 aa),第一 polyQ 区(200~411 aa)显示出更强的 sdAb 结合潜力,且 sdAb #8 和 #11 与 MN1 第一 polyQ 区结合的 isPLA 阳性信号在细胞核中更强,故后续实验侧重 sdAb 11# 和 8# 功能验证。

考马斯亮蓝染色显示,sdAb #11 特异性结合 MN1 N 端区域(200~411 aa)(图 4A),与 isPLA 结果一致。然而,第二 polyQ 区缺失的(1~570 Δ 523~553 aa)突变体在 pulldown 实验中未检测到结合信号(图 4A)。Western 印迹结果显示,sdAb #11 与全长

MN1 结合能力稳定(图 4B),而 1~570 Δ 523~553 aa 突变体则无结合信号(图 4B)。

在 U2OS 细胞中,免疫荧光显示 sdAb #11 与内源性 MN1 在细胞核及胞质中共定位;而在不表达 MN1 的 MCF-7 细胞中未观察到共定位信号(图 4C)。

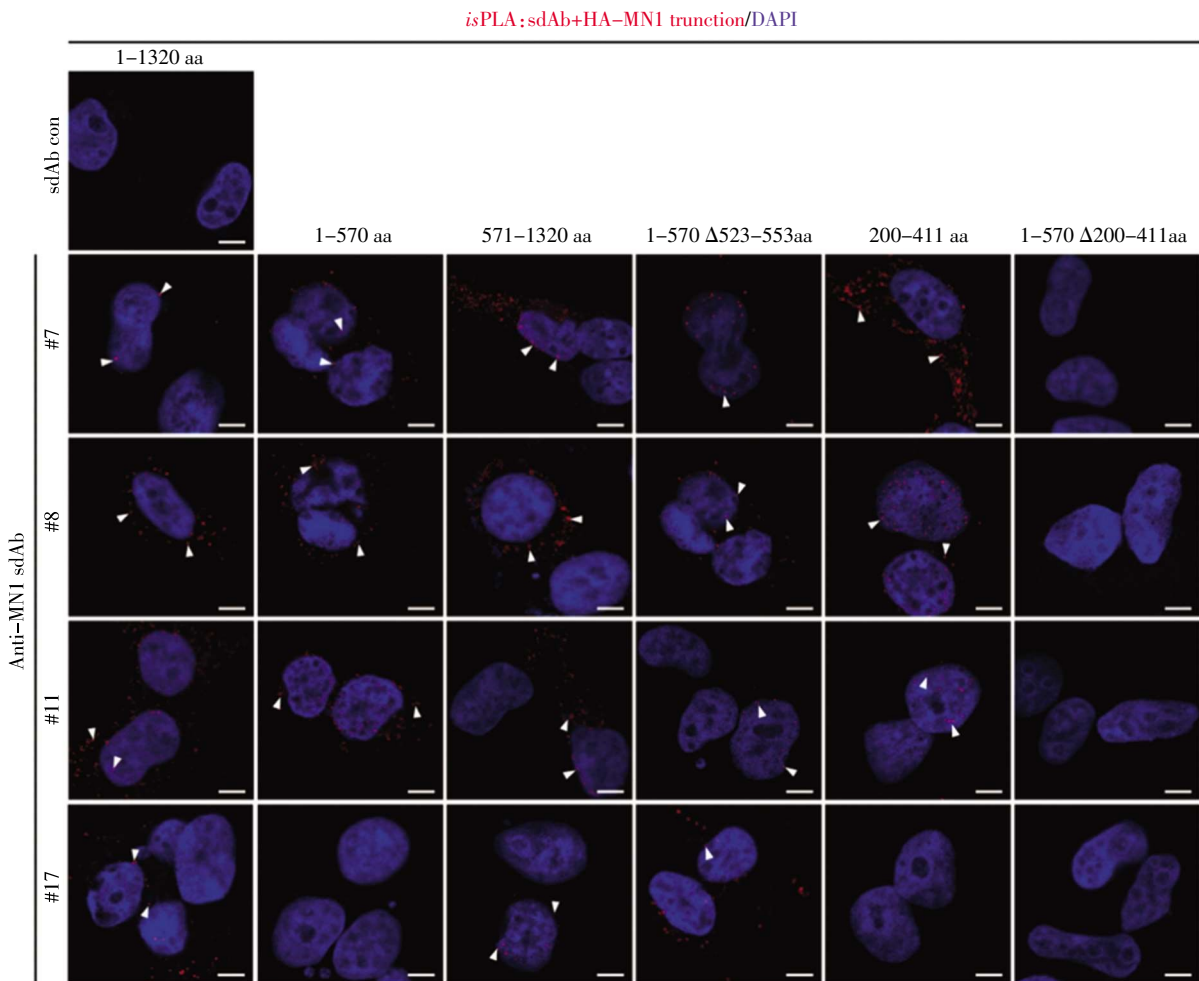
2.3 MN1 sdAb 抑制 U2OS 细胞周期进程 在大肠杆菌中,以重组表达融合蛋白的 sdAb con 和 sdAb #11 为例(图 5A)。结果显示,与 sdAb con 重组蛋白处理组相比,sdAb #11 重组蛋白处理显著抑制 U2OS 细胞的集落形成能力($t=23.21, P<0.001$),见图 5B。MTT 实验显示,与正常细胞(NC)相比,sdAb



注:A:HA 标签 MN1 与 Flag 标签 sdAb con 和抗 MN1 sdAb(#7、#8、#11、#17)共转染 HEK293T 细胞的代表性 *isPLA* 阳性信号(红点),细胞核经 DAPI 复染(蓝色);标尺:10 μ m;B:不同细胞系中 MN1 基础蛋白水平的免疫印迹分析,以 β -肌动蛋白(ACTB)为内参;C:Flag 标签抗 MN1 sdAb(#7、#8、#11、#17)和 sdAb con 与 U2OS 细胞内源性 MN1 的免疫共沉淀(Co-IP)结果

图 2 MN1 单域抗体的鉴定

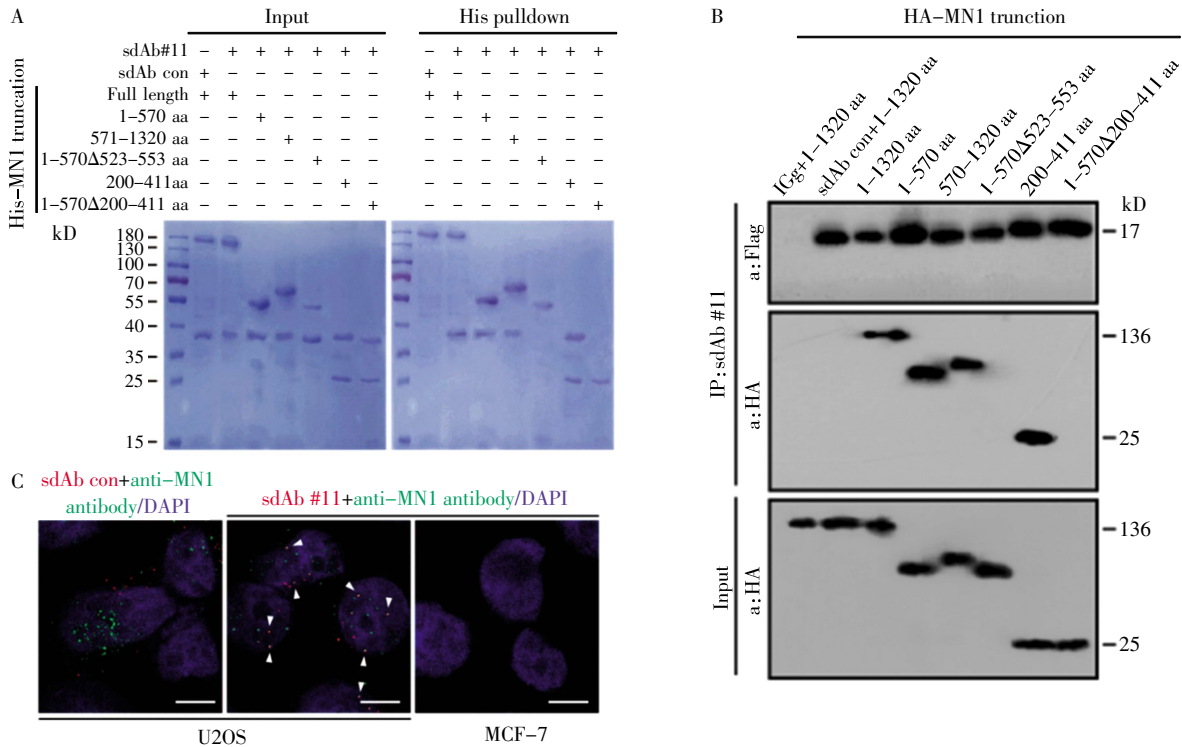
Fig.2 Identification of sdAbs against MN1



注:HA 标签 MN1 截短突变体与 Flag 标签抗 MN1 单域抗体(#7、#8、#11、#17) 共转染 HEK293T 细胞 48 h 后, 通过原位邻近连接分析 (*isPLA*)结合抗 HA 与抗 Flag 抗体验证结合区域(白色箭头指示阳性信号);细胞核经 DAPI 复染(蓝色);标尺:10 μ m

图 3 *isPLA* 检测 4 种 sdAbs 与 MN1 蛋白的结合区域

Fig.3 *isPLA* analysis of binding regions between four sdAbs and MN1 protein



注:A:体外 pull-down 实验:将重组 6×His 标签 MN1(全长)及其截短突变体蛋白与 sdAb #11 重组蛋白体外孵育后凝胶电泳及考马斯亮蓝色分析;B:HEK293T 细胞中 Flag 标签抗 MN1 单域抗体 #11 与 HA 标签 MN1 截短突变体的免疫共沉淀(Co-IP)验证;C:免疫荧光共定位分析:在 U2OS 细胞中,Flag 标签抗 MN1 单域抗体 #11 与内源性 MN1 抗体共定位(白色箭头),不表达 MN1 的 MCF-7 细胞及 sdAb con 作为阴性对照;实验独立重复 3 次,结果一致;细胞核经 DAPI 复染(蓝色);标尺:10 μm

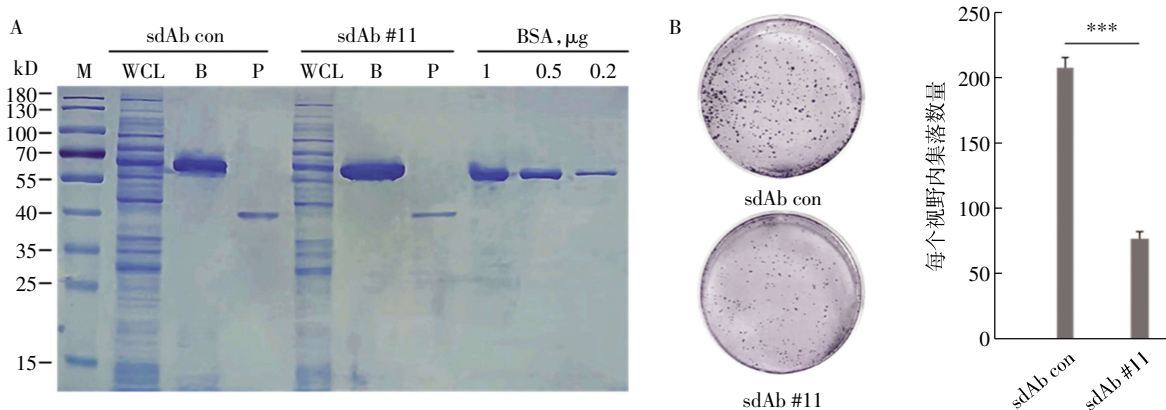
图 4 MN1 单域抗体结合域验证

Fig.4 Binding domain validation of MN1 sdAbs

con 和 sdAb #11 及 #8 重组蛋白处理细胞后,3 种处理剂量的 sdAb #11 及 #8 组细胞活性均显著降低(200 ng/mL: $F=309.40, P<0.001, sdAb \#11/NC: t=10.93, sdAb \#8/NC: t=23.38$, 均 $P<0.01$;500 ng/mL: $F=496.50, P<0.001, sdAb \#11/NC: t=8.23, sdAb \#8/NC: t=9.51$, 均 $P<0.01$;1 000 ng/mL 组: $F=147.40, P<0.001, sdAb \#11/NC: t=5.97, sdAb \#8/NC: t=14.09$, 均 $P<0.05$),见图 6A。流式细胞术分析表明,与 NC相

比,sdAb #11 重组蛋白处理导致 U2OS 细胞 G_0/G_1 期比例显著升高($F=565.30, P<0.001. sdAb \#11/NC: t=13.25, P<0.001$),同时 S 期与 G_2/M 期细胞比例减少(图 6B)。

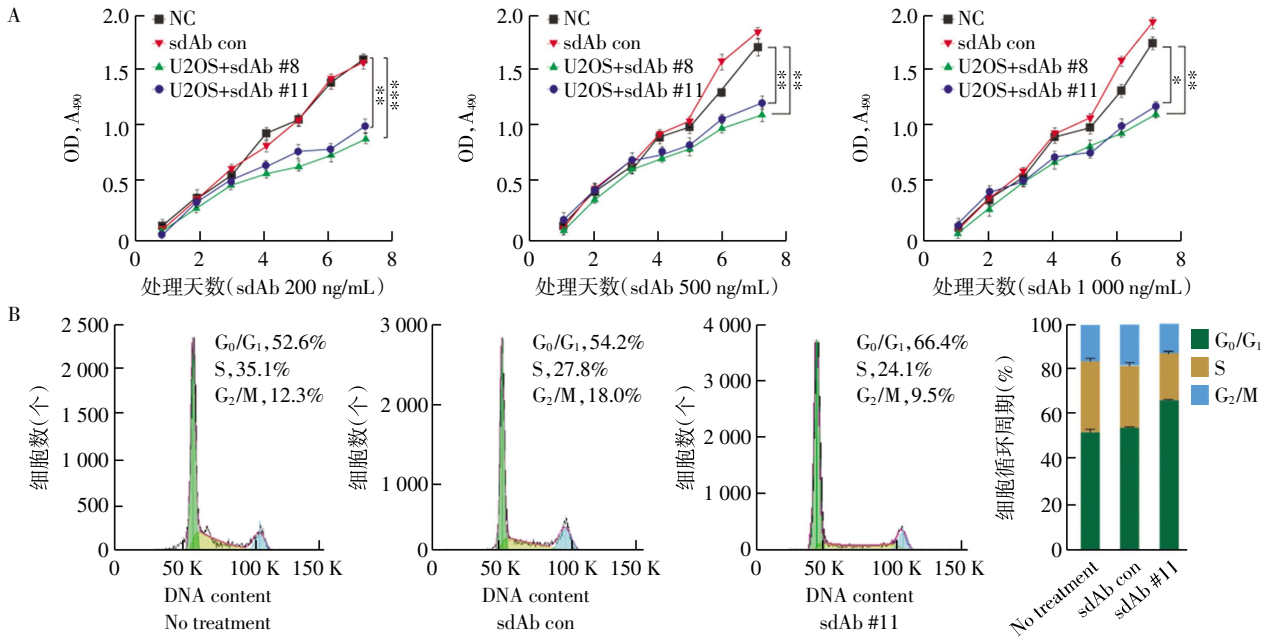
2.4 MN1 sdAb 对 U2OS 细胞转录活性的抑制作用
转录组测序(RNA-seq)数据显示,经纯化 sdAb #11 重组蛋白处理的 U2OS 细胞中,数百个 MN1 依赖性差异表达基因发生显著变化(图 7,数据集 GSE214561)。



注:A:大肠杆菌 BL21(DE3)表达的 sdAb con 和 sdAb #11 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳的分析及考马斯亮蓝色染色;以 BSA(66.5 kD)为定量对照;WCL:0.2 mmol/L IPTG 诱导的全细胞裂解液;B:谷胱甘肽(GSH)树脂结合蛋白;P:纯化 sdAb;M:蛋白分子量标记;B:200 ng/mL sdAb con 和 sdAb #11 重组蛋白处理 U2OS 细胞 14 d 后的集落形成实验(结晶紫染色,6 孔板);右图:处理组集落数量定量分析

图 5 重组单域抗体对 U2OS 集落形成能力的影响

Fig.5 Effects of recombinant sdAb on U2OS colony formation



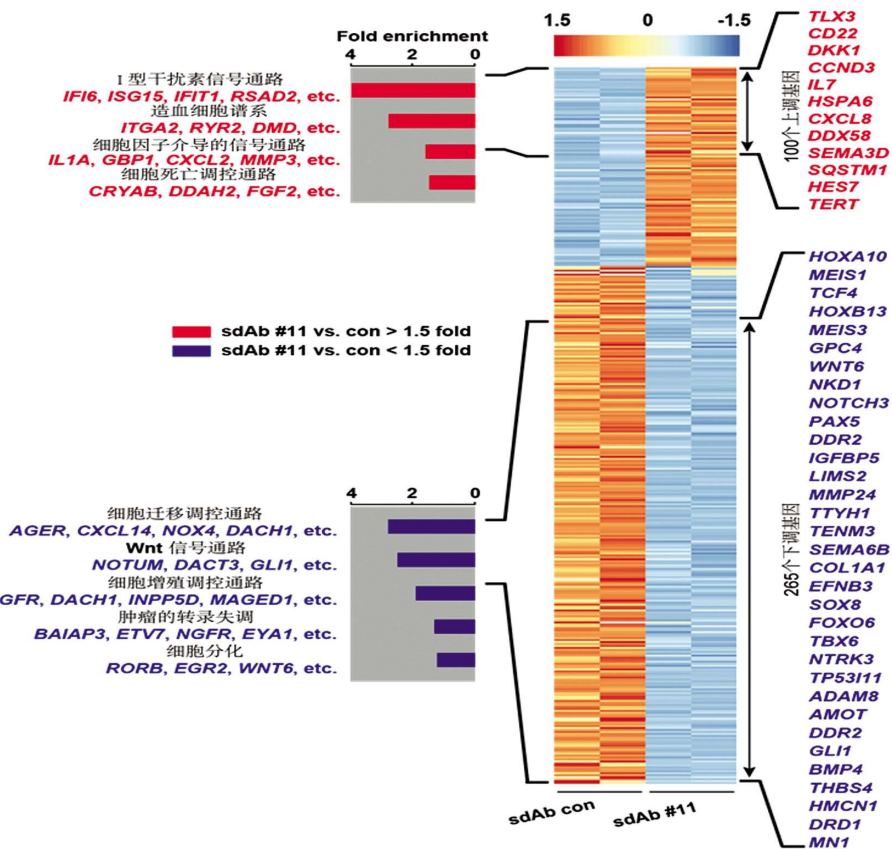
注:A:抗 MN1 sdAb #8、#11 或 sdAb con 重组蛋白(200、500、1 000 ng/mL)处理 U2OS 细胞的 MTT 增殖抑制曲线,NC 为正常 U2OS 细胞组; B:200 ng/mL 抗 MN1 sdAb #11 重组蛋白处理 48 h 后,U2OS 细胞的周期分布变化

图 6 MN1 单域抗体抑制 U2OS 细胞周期进程

Fig.6 MN1 sdAb mitigated cell cycle in U2OS cells

基因集富集(GSE)分析表明,这些基因富集于“癌症转录失调”及“细胞增殖”通路。其中RT-qPCR 证实,

与 sdAb con 重组蛋白处理组相比,抗MN1 sdAb #8 或 #11 重组蛋白处理组中,TCF4、FOXO6、HOXA10 及



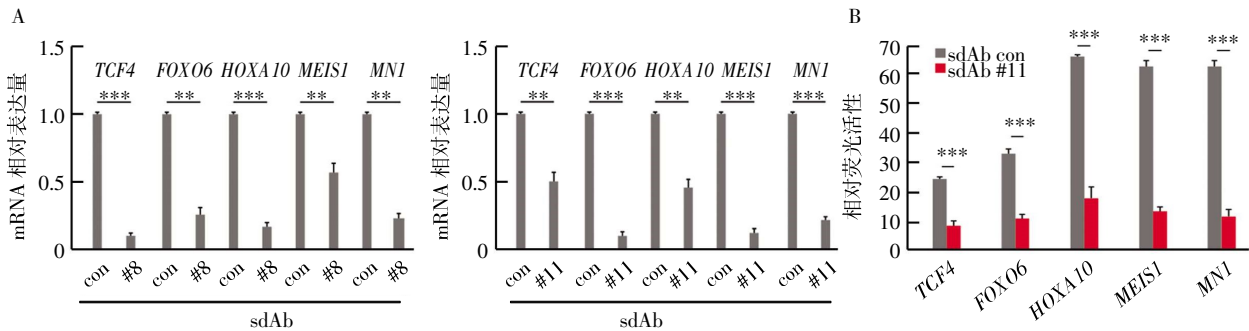
注:重组 MN1 单域抗体 #11 处理的 U2OS 细胞基因表达谱分析;图中列出 MN1 调控的代表性基因及其关联功能通路,RNA-seq 数据已上传至 GEO 数据库(编号 GSE214561)

图 7 重组 MN1 单域抗体 #11 处理的 U2OS 细胞 RNA-seq 分析

Fig.7 RNA-seq analysis of U2OS cells treated with recombinant MN1 sdAb

MEIS1 的 mRNA 水平显著下调(图8A)。值得注意的是,与 sdAb con 相比,sdAb #11 和 #8 重组蛋白处理 48 h 后,sdAb #11 组 MN1 自身 mRNA 降低更明显(sdAb #8: $t=10.61$; sdAb #11: $t=29.53$, 均 $P<0.001$)。后续只侧重验证 sdAb #11 的生物学功能,通过双荧光

素酶报告实验检测 TCF4、FOXO6、HOXA10、MEIS1 及 MN1 启动子活性,发现与 sdAb con 相比,sdAb #11 可显著抑制上述基因的转录活性(TCF4: $t=22.97$; FOXO6: $t=25.31$; HOXA10: $t=30.82$; MEIS1: $t=29.65$; MN1: $t=31.11$, 均 $P<0.001$),见图 8B。



注:A:定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)分别验证200 ng/mL sdAb #8和#11与sdAb con重组蛋白处理组中MN1、TCF4、FOXO6、HOXA10及MEIS1的mRNA水平;B:双荧光素酶报告实验显示,sdAb #11和sdAb con转染48 h后,下游基因MN1、TCF4、FOXO6、HOXA10及MEIS1的启动子活性

图8 MN1单域抗体对U2OS细胞转录活性的抑制作用

Fig.8 Inhibition of MN1 sdAb in transcriptional activity of U2OS cells

3 讨论

靶向细胞内IDPs及IDRs仍面临挑战,这主要源于其非结构化特性^[8]。MN1的过表达足以导致AML的转化,其介导的生物过程可作为某些肿瘤的治疗靶点^[3,9-11]。然而,由于MN1具有多个IDR,因此难以在蛋白质水平成为直接靶点。

本研究通过isPLA-seq,初步筛选出4种特异性靶向MN1的sdAb,通过功能性验证最终筛选了一种(sdAb #11),在调控MN1活性中发挥抑制作用。转录组测序(RNA-seq)结果显示,MN1 sdAb通过抑制MN1下游基因(图7),具有调控MN1细胞内功能的潜在价值。

IDRs的功能依赖于其固有的构象异质性和可塑性,这种特性可能通过液-液相分离(liquid-liquid phase separation)驱动无膜细胞器的形成^[12]。MN1作为典型IDP,最初因在脑膜瘤患者中表达缺失而被认为具有抑癌功能^[13-15];然而,其高表达亦与髓系恶性肿瘤,如AML、骨髓增生异常综合征及慢性髓系白血病的进展密切相关^[9,16]。致癌性MN1通过异常稳定BAF复合物在增强子区域的结合,激活下游基因转录并维持造血祖细胞样表型,从而驱动AML的发生^[9,17]。因此,靶向BAF复合物特定亚基已成为治疗肿瘤及神经系统疾病的新策略^[18-19]。

研究显示,相较于MN1的两个无序区域(200~411 aa和570~1119 aa),其C端结构虽稳定但对于AML发生非必需^[17]。N端201~404 aa的缺失仅轻微影响细胞分化与疾病潜伏期^[9]。同时本研究发现,第

一 polyQ 区(200~411 aa)比第二 polyQ 区(523~553 aa)更易与筛选的 sdAb 结合(图 3、4)。前期研究表明,通过 shRNA 敲低高表达 MN1 的 AML 细胞系可诱导细胞周期停滞^[13]。RNA-seq 数据进一步表明, MN1 sdAb 处理可下调细胞周期相关基因(如 CCND3、GLI1、ADAMTS),导致 U2OS 细胞 G₀/G₁ 期阻滞(图 6、7)。此外,HOXA10、MEIS1、TCF4 及 FOXO6 等促癌基因的转录水平亦显著降低(图 8)。众所周知,AbdB 样 HOX 蛋白(包括 HOXA10)直接与 MEIS1 相互作用,以 MN1 依赖性的方式增强其 DNA 结合特异性^[20-21]。综上, MN1 sdAb 通过靶向 MN1 内在转录调控功能,抑制其下游致癌信号网络,进一步支持该抗体在基因转录调控中的关键作用。

sdAb 因其小分子量(15~20 kD)、高稳定性及易于重组表达等优势,在临床转化中极具潜力^[22-24]。近期研究已开发出靶向 PD-L1 的 Envafolelimab(用于实体瘤治疗)^[25]及靶向血管性血友病因子(vWF)的 Caplacizumab(用于获得性血栓性血小板减少性紫癜治疗)^[26]。相较于传统抗体,sdAb 的优异组织渗透性为其在疾病诊疗中的广泛应用奠定了基础^[27]。课题组建立的 isPLA-seq 筛选技术,可特异性识别构象依赖性抗原表位(如 MN1 的 IDR)^[7],为靶向 IDR 的抗体开发提供了新方法。然而,与已报道的染色质免疫共沉淀(ChIP)数据相比^[21], MN1 sdAb 在基因转录调控中的具体机制仍需深入探索。值得注意的是,在 MN1 sdAb #11 处理的 U2OS 细胞中, MN1 mRNA 水平显著下降。研究表明, MN1 自身表达的负反馈

调控涉及转录因子网络;MN1 抑制 MEIS1 活性,而 MEIS1 激活 miR-155 靶向 MN1 mRNA;RUNX1 恢复后结合 MN1 启动子,招募 HDAC 抑制转录^[28]。这些机制构成 MN1 自我调控网络,维持其致癌稳态。由于其构象的灵活性,MN1 可能与多个相互作用伙伴结合,并执行自我调节反馈等重要的生物学功能。具体来说,关于 MN1 的转录调控机制,MN1 中的不同 IDR 在细胞质和细胞核中都可能表现出不同的功能。因此,需要通过临床前动物模型来解读 MN1 sdAb 治疗后的体内机制。

参考文献:

- [1] SHARMA A, JYOTSANA N, GABDOULLINE R, et al. Meningioma 1 is indispensable for mixed lineage leukemia-rearranged acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*, 2020, 105(5): 1294-1305.
- [2] LI H B, HUANG G, TU J, et al. METTL14-mediated epitranscriptome modification of MN1 mRNA promote tumorigenicity and all-trans-retinoic acid resistance in osteosarcoma[J]. *Ebiomedicine*, 2022, 82: 104142.
- [3] HO Y J, LIU F C, CHANG J, et al. High expression of meningioma 1 is correlated with reduced survival rates in colorectal cancer patients[J]. *Acta Histochem*, 2019, 121(5): 628-637.
- [4] LIBBRECHT C, XIE H M, KINGSLEY M C, et al. Menin is necessary for long term maintenance of meningioma-1 driven leukemia[J]. *Leukemia*, 2021, 35(5): 1405-1417.
- [5] RIEDEL S S, HALADYNA J N, BEZZANT M, et al. MLL1 and DOT1L cooperate with meningioma-1 to induce acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1438-1450.
- [6] BLANC M R, ANOUASSI A, AHMED ABED M, et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type gamma-globulins from camelid sera[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 54(4): 207-212.
- [7] YIN Y, YAN F, ZHOU R, et al. Single-domain antibody screening by isPLA-seq[J]. *Life Sci Alliance*, 2022, 5(1): e202101115.
- [8] CHOUDHARY S, LOPUS M, HOSUR R V. Targeting disorders in unstructured and structured proteins in various diseases[J]. *Biophys Chem*, 2022, 281: 106742.
- [9] RIEDEL S S, LU C, XIE H M, et al. Intrinsically disordered meningioma-1 stabilizes the BAF complex to cause AML[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(11): 2332-2348.
- [10] SHARMA A, JYOTSANA N, GABDOULLINE R, et al. Meningioma 1 is indispensable for mixed lineage leukemia-rearranged acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*, 2020, 105(5): 1294-1305.
- [11] LANGER C, MARCUCCI G, HOLLAND K B, et al. Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(19): 3198-3204.
- [12] UVERSKY V N. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 44: 18-30.
- [13] LIU T, JANKOVIC D, BRAULT L, et al. Functional characterization of high levels of meningioma 1 as collaborating oncogene in acute leukemia[J]. *Leukemia*, 2010, 24(3): 601-612.
- [14] LEKANNE DEPREZ R H, GROEN N A, VAN BIEZEN N A, et al. A t (4;22) in a meningioma points to the localization of a putative tumor-suppressor gene[J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 48(4): 783-790.
- [15] MIYAKE N, TAKAHASHI H, NAKAMURA K, et al. Gain-of-function MN1 truncation variants cause a recognizable syndrome with craniofacial and brain abnormalities[J]. *Am J Hum Genet*, 2020, 106(1): 13-25.
- [16] BUIJS A, SHERR S, VAN BAAL S, et al. Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11[J]. *Oncogene*, 1995, 10(8): 1511-1519.
- [17] BOULAY G, SANDOVAL G J, RIGGI N, et al. Cancer-specific retargeting of BAF complexes by a prion-like domain[J]. *Cell*, 2017, 171(1): 163-178.
- [18] CENTORE R C, SANDOVAL G J, SOARES LMM, et al. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes: emerging mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Trends Genet*, 2020, 36(12): 936-950.
- [19] HODGES C, KIRKLAND J G, CRABTREE G R. The many roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF complexes in cancer[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(8): a026930.
- [20] SHEN W F, MONTGOMERY J C, ROZENFELD S, et al. AbdB-like hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(11): 6448-6458.
- [21] HEUSER M, YUN H, BERG T, et al. Cell of origin in AML: susceptibility to MN1-induced transformation is regulated by the MEIS1/AbdB-like HOX protein complex[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(1): 39-52.
- [22] CHELOHA R W, HARMAND T J, WIJNE C, et al. Exploring cellular biochemistry with nanobodies[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(45): 15307-15327.
- [23] HELMA J, CARDOSO M C, MUYLDERMANS S, et al. Nanobodies and recombinant binders in cell biology[J]. *J Cell Biol*, 2015, 209(5): 633-644.
- [24] WILTON E E, OPYR M P, KAILASAM S, et al. sdAb-DB: the single domain antibody database[J]. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(11): 2480-2484.
- [25] MARKHAM A. Envafolimab: first approval[J]. *Drugs*, 2022, 82(2): 235-240.
- [26] DUGGAN S. Caplacizumab: first global approval[J]. *Drugs*, 2018, 78(15): 1639-1642.
- [27] IEZZI M E, POLICASTRO L, WERBAJH S, et al. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging and treatment[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 273.
- [28] SWART L E, HEIDENREICH O. The RUNX1/RUNX1T1 network: translating insights into therapeutic options[J]. *Exp Hematol*, 2021, 94: 1-10.