

Ein High-Throughput-Screening-Test zur Identifikation von Lin28/pre-let-7-Antagonisten

Martina Roos¹, Ugo Pradere¹, Jonathan Hall¹

Forscher der ETH Zürich haben einen hochsensiblen, auf Förster-Resonanz-Elektronen-Transfer(FRET)-basierten High-Throughput-Screening(HTS)-Test zur Identifikation von Lin28/pre-let-7-Antagonisten entwickelt. Diese Forschungsarbeit ist sehr interessant für die Entwicklung von Medikamenten gegen Tumore.

Bei verschiedensten Krebsarten konnte eine Dysregulation der kurzen, nicht-kodierenden MicroRNAs nachgewiesen werden, weshalb die MicroRNAs ein äusserst interessantes, neues Target für die Entwicklung von Medikamenten darstellen. Lin28 ist ein Protein, welches an eine genau bekannte Struktur der pre-let-7-MicroRNAs bindet und dabei dessen weitere Prozessierung inhibiert und zu einer Depletion von reifer let-7-MicroRNA in den Krebszellen führt.

Dieser Mechanismus konnte bereits bei über 15% menschlicher Tumore verschiedenster Histologie nachgewiesen werden. Im Weiteren ist bekannt, dass die Aktivierung von Lin28 direkt mit starker Krebsmetastasierung und schlechten Heilungsprognosen assoziiert ist.

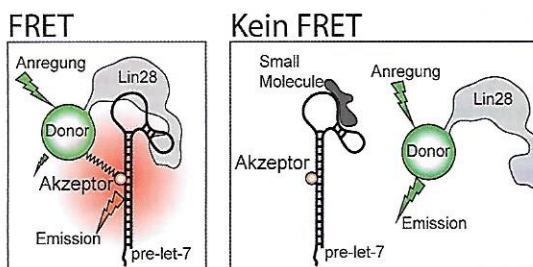
Basierend auf dem oben beschriebenen Sachverhalt haben Forscher der ETH Zürich einen hochsensiblen, auf FRET-basierten HTS-Test zur Identifikation von Lin28/pre-let-7-Antagonisten entwickelt.

Methoden

Beim Förster-Resonanzenergietransfer wird die Energie eines angeregten Farbstoffs, auch Donor genannt, auf einen zweiten Farbstoff (Akzeptor) übertragen. In dem verwendeten Test fungiert ein grün-fluoreszierendes Lin28-Protein als Donor und eine mit einem orange-fluoreszierenden Label versehene let-7-MicroRNA als Akzeptor [1].

Resultate

Findet ein FRET zwischen Donor und Akzeptor statt, so kann ein Emissionssignal des Akzeptors gemessen werden. Ist ein Antagonist des Systems präsent, so findet kein Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor statt und die Akzeptoremission entfällt (siehe Abbildung).



Ist ein Antagonist des Systems präsent, so findet kein Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor statt.

Mittels verschiedenster Optimierungs- und Miniaturisierungsansätze wurde ein hochsensibler HTS-Test mit einem exzellenten statistischen Signifikanzwert entwickelt [2]. Dies ermöglichte ein umfassendes Screening einer Bibliothek von 16 000 Small Molecules mit grösster struktureller Diversität als Quelle potentieller Lin28/pre-let-7-Antagonisten. Nach einer Identifikation und -Reevaluation der Hits werden die verbleibenden 14 Moleküle zurzeit zellulären Tests unterzogen.

Fazit

Potentielle Antagonisten des Lin28/let-7-Systems stellen einen vielversprechenden Ansatz zur Kontrolle endogener let-7-Level in Lin28-abhängigen Krebszellen dar und könnten so zu einem therapeutischen Vorteil in der Behandlung verschiedenster Krebsarten führen. ■

Literatur

- [1] Pradere U, Roos M, et al, *Angew Chem* 2013; 52: 12028–12032
 [2] Roos M, Pradere U, Hall J, Europäisches Patentamt Nr. 1404, ausgestellt im April 2013

Korrespondenzadresse

Martina Roos
 E-Mail: martina.roos@pharma.ethz.ch



Martina Roos, Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zürich, hat am diesjährigen Swiss Pharma Science Day den dritten Preis für ihren Posterbeitrag «Development of a FRET-based HTS for the Identification of Lin28/pre-let-7 Interaction Antagonists» erhalten. Die Pharmazeutische Gesellschaft Zürich (PharmGZ) sponserte diesen Award.

¹ Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich, 8093 Zurich, Switzerland

Test de criblage à haut débit pour l'identification d'antagonistes de Lin28/pre-let-7

Martina Roos¹, Ugo Pradere¹, Jonathan Hall¹



Martina Roos, de l'Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich, a reçu lors du Swiss Pharma Science Day 2014 le 3^e prix pour son poster «Development of a FRET-based HTS for the Identification of Lin28/pre-let-7 Interaction Antagonists». La société pharmaceutique zurichoise PharmGZ a sponsorisé ce prix.

Des chercheurs de l'ETH Zurich ont développé un test de criblage à haut débit (High-Throughput-Screening, HTS), basé sur le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), et à haute sensibilité pour l'identification d'antagonistes de Lin28/pre-let-7. Ce travail de recherche est très prometteur pour le développement de médicaments dirigés contre diverses tumeurs.

Pour divers types de cancers, il a été observé une dysrégulation des micro-ARN courts non codants. Les micro-ARN constituent donc une nouvelle cible extrêmement intéressante pour le développement de médicaments antitumoraux.

En se liant à une structure connue du micro-ARN, appelée «pre-let-7», la protéine Lin28 inhibe la poursuite de la maturation et entraîne de ce fait une déplétion en micro-ARN let-7 mature. Ce mécanisme a déjà pu être démontré dans plus de 15% des tumeurs humaines à l'histologie la plus diverse. On sait en outre que l'activation de Lin28 est directement associée à une forte métastatisation des cancers et à de mauvais pronostics de guérison.

Sur la base des faits énoncés ci-dessus, un test de criblage à haut débit (High-Throughput-Screening, HTS) et à haute sensibilité a été développé, basé sur le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). L'objectif était d'identifier des antagonistes de Lin28/pre-let-7.

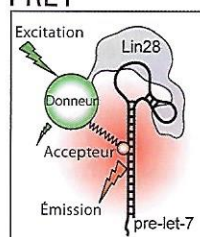
Méthodes

Dans le transfert d'énergie par résonance de type Förster, l'énergie d'un fluorophore excité, appelé aussi donneur, est transmise à un second fluorophore (accepteur). Dans notre test, une protéine Lin28 fluorescente verte sert de donneur et un micro-ARN let-7 portant un fluorophore fluorescent orange sert d'accepteur [1].

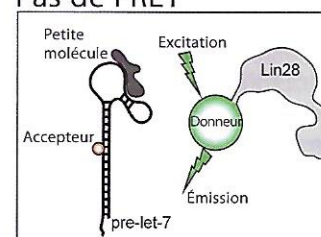
Résultats

Si un FRET a lieu entre donneur et accepteur, il est possible de mesurer un signal d'émission de l'accepteur. En présence d'un antagoniste du système, il n'y a pas de transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur et l'émission de l'accepteur disparaît (voir illustration).

FRET



Pas de FRET



En présence d'un antagoniste du système, il n'y a pas de transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur.

Grâce à des approches d'optimisation et de miniaturisation très diverses, un test HTS hautement sensible a été développé, avec un excellent degré de signification statistique [2]. Cela a permis le criblage complet d'une bibliothèque de 16000 petites molécules aux propriétés structurales les plus diverses, comme source d'antagonistes potentiels de Lin28/pre-let-7. Après identification et réévaluation des hits, les 14 molécules restantes sont actuellement soumises à des tests cellulaires.

Conclusion

Les antagonistes potentiels du système Lin28/let-7 représentent une approche prometteuse pour le contrôle des taux endogènes de let-7 dans des cellules cancéreuses qui dépendent de Lin28. Ils pourraient de ce fait aboutir à un progrès thérapeutique dans la prise en charge de types de cancers très divers. ■

Littérature

[1] Pradere U, Roos M, et al, *Angew Chem* 2013; 52: 12028–12032

[2] Roos M, Pradere U, Hall J, *Europäisches Patentamt* Nr. 1404, ausgestellt im April 2013

Adresse de correspondance

Martina Roos

E-mail: martina.roos@pharma.ethz.ch

¹ Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich, 8093 Zurich