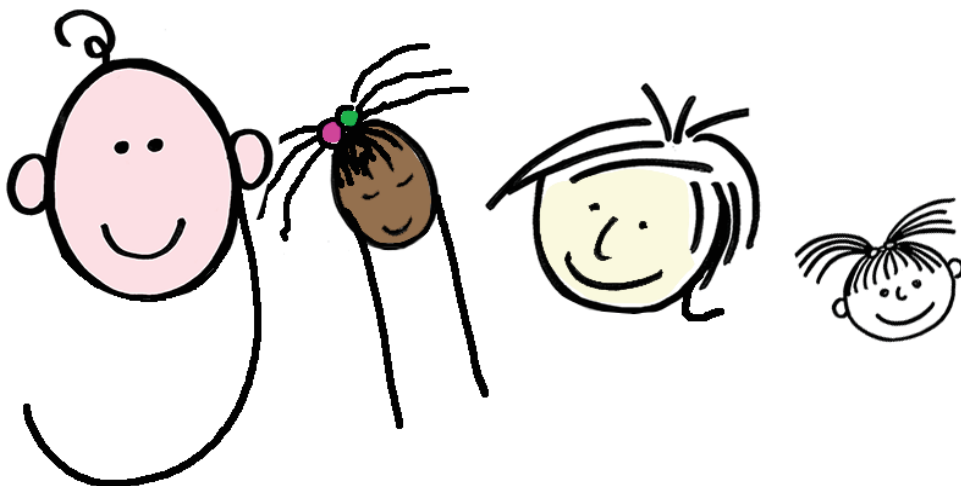




ONDERZOEK IN LEIDEN



Voorwoord

Sinds iets meer dan 1 jaar zijn wij in Leiden met een klein team vol enthousiasme bezig met wetenschappelijk onderzoek naar GNAO1. Dit onderzoek wordt mogelijk gemaakt door de GNAO1stichting.NL en de ForWis(h)dom foundation. Om iedereen een kijkje te geven in onze GNAO1 'labkeuken' hebben we dit boekje over het in Leiden uitgevoerde GNAO1 onderzoek laten maken. Wij hopen dat dit meer inzicht geeft in de toch vaak ingewikkelde wereld van het wetenschappelijke onderzoek en laat zien wat er met de subsidies wordt gedaan. Mocht je na het lezen van dit boekje nog vragen hebben of ideeën hoe we het GNAO1 onderzoek nog meer armslag kunnen geven schroom dan niet om contact met ons op te nemen!

Hartelijke groet,

Frank Baas & Harald Mikkers

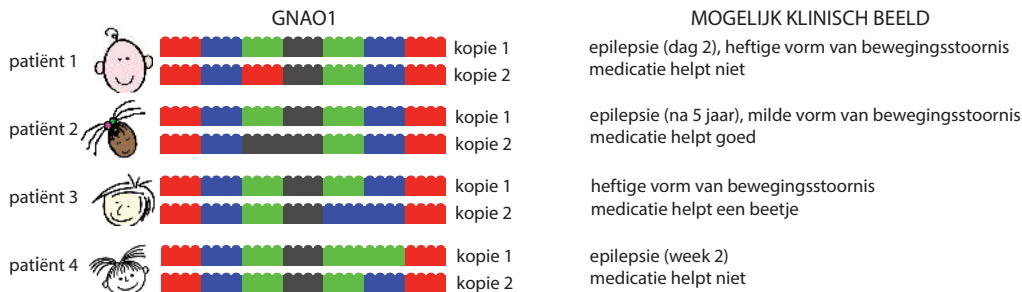
Prof. Frank Baas (f.baas@lumc.nl)

Dr. Harald Mikkers (h.mikkers@lumc.nl)



Introductie

GNAO1 is een aandoening die ontstaat doordat er een verkeerd bouwsteentje (=mutatie) in het GNAO1 gen is ingebouwd. Iedereen heeft 2 kopieën, maar bij GNAO1 patiënten is er een normale en een variante kopie. De variante kopie is dominant over de normale kopie, waardoor patiënten een bepaald klinisch beeld laten zien. Het rare is dat het klinische beeld heel erg kan verschillen tussen de patiënten. Zo heeft het ene kind al direct na de geboorte last van epileptische aanvallen, terwijl het andere kind pas na langere tijd bewegingsstoornissen ontwikkelt. Ook zijn er GNAO1 kinderen die beide symptomen krijgen. Daarnaast is er een groot verschil in de hevigheid van het ziektebeeld, in de frequentie van epileptische of bewegingsaanvallen en of de medicatie aanslaat. Wij onderzoeken de oorzaak van deze verschillen, zodat we de aandoening beter begrijpen en er betere (of groepsgebonden) medicatie kan worden ontwikkeld.



Er bestaan grote variaties in het klinische beeld tussen GNAO1 patiënten. Hier wordt alleen een voorbeeld gegeven van verschillen a.h.v. epilepsie en bewegingsstoornis.



Onze doelstellingen

Het begrijpen van de GNAO1 aandoening.

Hoe ontstaan welke symptomen?

Waardoor is er zoveel variatie in het ziektebeeld?



Om te komen tot een betere behandeling.

Ontdekken van nieuwe/ betere medicijnen

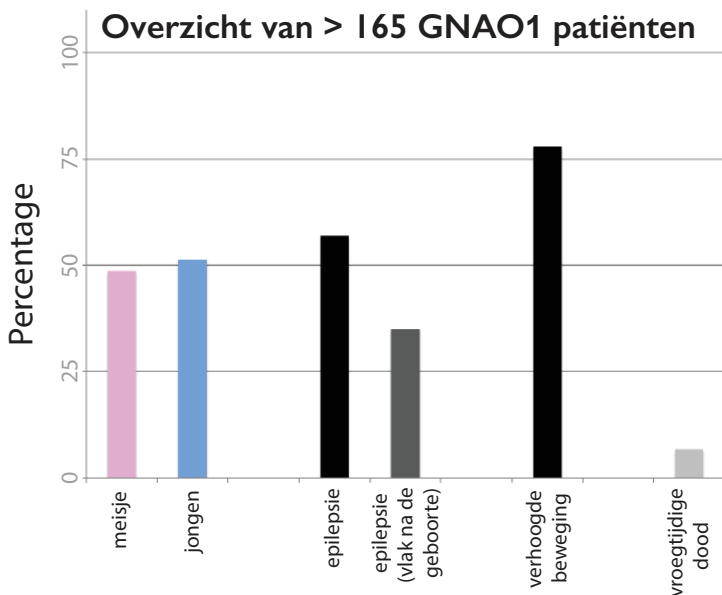
Ontwikkelen van voorspelbaar behandel-effect





Inventarisatie van GNAO1 patiënten

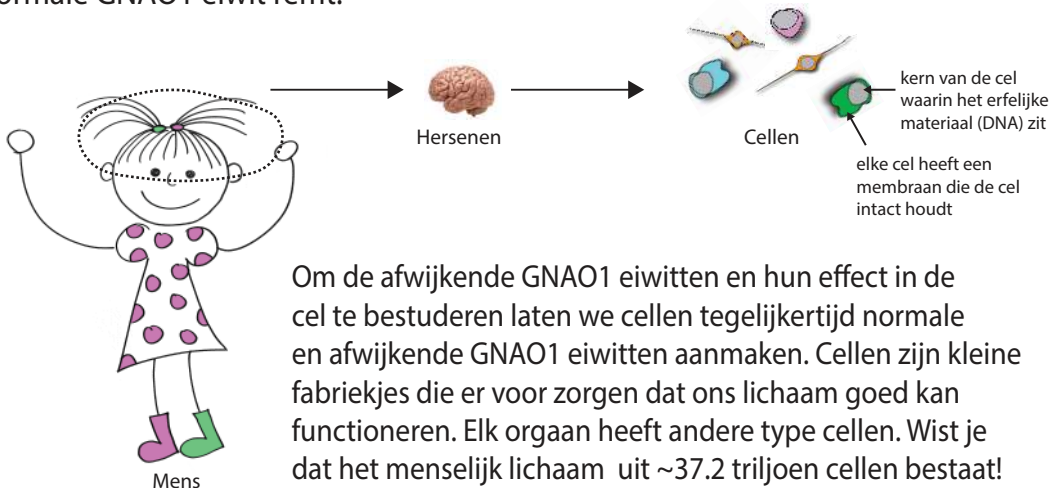
Om een beter overzicht te krijgen in de variaties van het klinische beeld hebben wij de gegevens van alle patiënten beschreven in de wetenschappelijk literatuur verzameld. Met de hulp van de Spaanse en Nederlandse GNAO1 stichtingen hebben we deze lijst nog kunnen aanvullen met niet eerder gepubliceerde data. Onze lijst bestaat nu uit 170 GNAO1 patiënten. Analyse van de klinische kenmerken hebben de grote diversiteit onderschreven; naast de GNAO1 variant lijkt ook de genetische achtergrond (=de DNA sequentie buiten het GNAO1 gen) het klinische beeld te beïnvloeden.





Wat doet het variante GNAO1?

Om nieuwe en betere medicijnen te vinden is het belangrijk dat we eerst meer te weten komen over de ziekte-veroorzakende GNAO1 eiwitten. Eiwitten zijn het eindresultaat van de bouwsteencode van het GNAO1 gen die eerst gelezen wordt via een boodschapper molekuul (het mRNA) en vervolgens wordt vertaald naar een GNAO1 eiwit. Een variant in het GNAO1 gen zal uiteindelijk leiden tot een afwijkend GNAO1 eiwit. Wij bestuderen enerzijds of er verschillen zijn tussen de varianten en anderzijds of er een effect is van de GNAO1 varianten op de localisatie en functie van het eiwit afkomstig van de niet aangedane GNAO1 kopie. Dit is van belang omdat het afwijkende GNAO1 eiwit een dominant effect heeft en de functie van het normale GNAO1 eiwit remt.

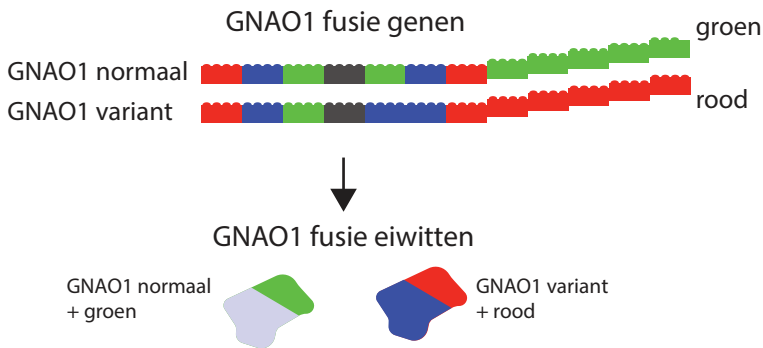




Waar zit het afwijkende GNAO1 eiwit in de cel?

Om het effect van de afwijkende GNAO1 eiwitten in de cel te bestuderen laten we cellen tegelijkertijd normale en afwijkende GNAO1 eiwitten aanmaken. Het normale eiwit is gefuseerd met een fluorescerend groen eiwit (afkomstig uit de kwal) terwijl het variante eiwit is gekoppeld aan een rood fluorescerend eiwit (afkomstig uit koraal). Daardoor kunnen we met een bepaalde microscoop deze GNAO1 eiwitten zichtbaar maken, kwantificeren en vastleggen.

patiënt 3



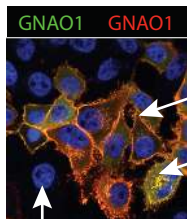
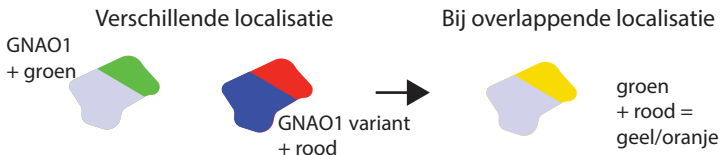
Waar zit het in de cel?



Verschillen tussen verschillende GNAO1 varianten

Het GNAO1 eiwit zit normaal gesproken aan de membranen in de cel: het celmembraan dat rondom de cel zit en ervoor zorgt dat de cel niet leegloopt en kan 'praten' met omliggende cellen, en de membranen van transportblaasjes.

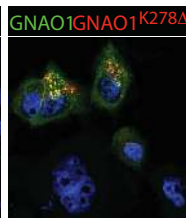
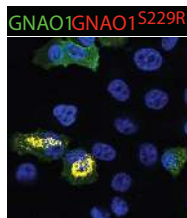
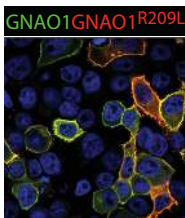
HET EXPERIMENT



celmembraan

transportblaasjes

celkern is blauw door aangekleurd DNA

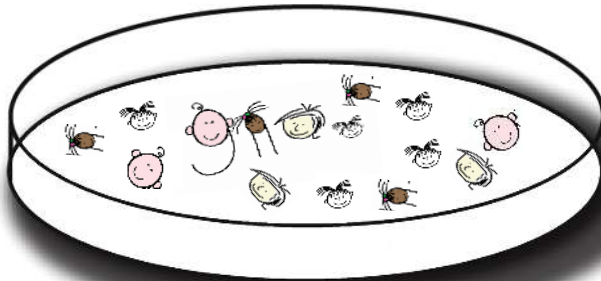


Onze eerste resultaten laten zien dat GNAO1 varianten op basis van localisatie en het effect op het normale GNAO1 eiwit in verschillende groepen onderverdeeld kunnen worden. Bepaalde varianten (zoals R209L) worden normaal aangemaakt en lijken geen effect op het normale GNAO1 eiwit te hebben. Andere varianten lijken snel te worden afgebroken en de localisatie van het normale GNAO1 eiwit te beïnvloeden. Dit geldt met name voor de varianten in patiënten met epilepsie vlak na de geboorte. Dit heeft tot een hypothese geleid die we in de toekomst, indien er voldoende financiering is, willen testen in een specifiek muizenmodel.



Geïnduceerde pluripotente stamcellen

Om het effect van de variante GNAO1 eiwitten te bestuderen zijn cellen die fluorescerende GNAO1 eiwitten aanmaken niet voldoende. Zo is de hoeveelheid GNAO1 in de patiënt lager en zijn de in de patiënt aangedane cellen van een heel andere soort, namelijk hersenzenuwcellen. De gedane bevindingen wil je dan ook liever in een meer relevant celsysteem, lees patiënt-afgeleide zenuwcellen, checken. Dankzij de uitvinding van de Japanner Yamanaka, waarvoor hij in 2012 de Nobelprijs heeft gekregen, kan dat gelukkig. Via zijn uitvinding kunnen we met enkele trucjes zogenaamde geïnduceerde pluripotente stamcellen uit patiëntenweefsel maken. Deze stamcellen zijn vergelijkbaar met de stamcellen in een heel vroeg embryo waaruit uiteindelijk alle weefsels en organen van het menselijk lichaam worden gevormd. In theorie kunnen de Yamanaka cellen elk celtype (>220 celsoorten) van ons lichaam in een kweek schaalteje maken. Dit biedt ongekennde mogelijkheden!



De GNAO1 patiënt in een kweekschaltee

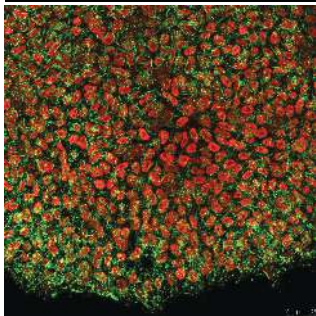


Een NL panel van GNAO1 geïnduceerde pluripotente stamcellen

Inmiddels hebben wij geïnduceerde pluripotente stamcellen van 6 GNAO1 varianten gemaakt. Omdat het belangrijk is dat de juiste controles worden gebruikt -de klinische symptomen verschillen immers sterk per patiënt- hebben wij de varianten in het GNAO1 gen gerepareerd door het te vervangen met een stukje van het normaal GNAO1.

Het panel bevat de volgende GNAO1 varianten: R209L (m= mannelijk), R209H (m), S229R (m), E246K (v) en 2x K278del (v). Alle cellen hebben we getest op hun pluripotente eigenschappen o.a. het vormen van hersencellen en zijn goed gekeurd voor het maken van GNAO1 relevante cellen.

Groen en rood: 2 eiwitten die laten zien dat het geïnduceerde pluripotente stamcellen zijn (rood kleurt celkern)

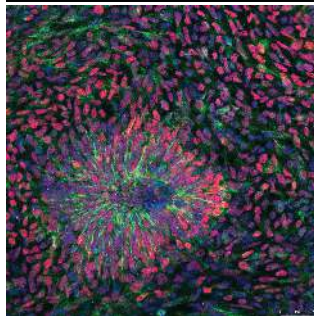


Allemaal GNAO1^{R209L} geïnduceerde pluripotente stamcellen bij elkaar (rood is 1 cel).

specialisatie naar
hersencellen



Groen en rood: 2 eiwitten die laten zien dat het hersenvoorlopercellen zijn. Blauw = DNA (celkern)



Hersenvoorlopercellen uit GNAO1 geïnduceerde pluripotente stamcellen.



GNAO1 geïnduceerde pluripotente stamcellen

De gemaakte patient-specifieke GNAO1 geïnduceerde pluripotente stamcellen kunnen we gebruiken om ziekte-specifieke hersencellen te maken. Kortom:

GNAO1 geïnduceerde pluripotente stamcellen

1) maken ons onderzoek naar het ontstaan van de GNAO1 symptomen veel beter mogelijk, omdat we hiermee dichterbij de patiënt kunnen komen.



2) bieden ons de mogelijkheid om 'patiënt-specifiek' nieuwe medicijnen te testen.



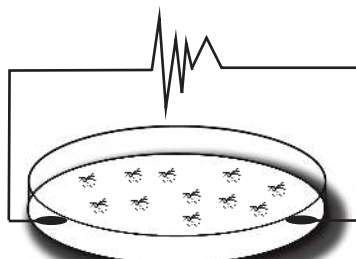
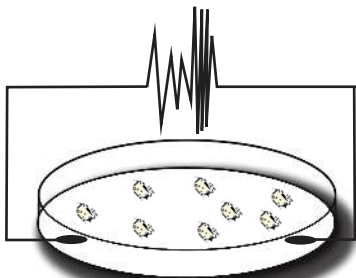
3) bieden de mogelijkheid om celprofielen te maken van wat er mis is in patiënten. Hiermee hopen we beter te kunnen voorspellen hoe een patiënt of patiënten-groep op een bepaald medicijn reageert.





Huidig onderzoek met GNAO1 geïnduceerde pluripotente stamcellen

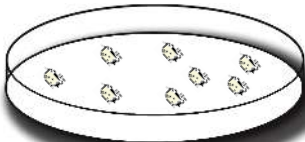
Bestuderen van de activiteit van GNAO1 hersenzenuwcellen



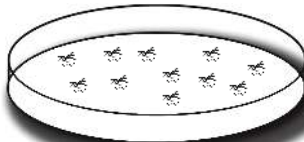
Identificatie van het eiwitprofiel van GNAO1 hersenzenuwcellen en hun voorlopers



GNAO1 R209L



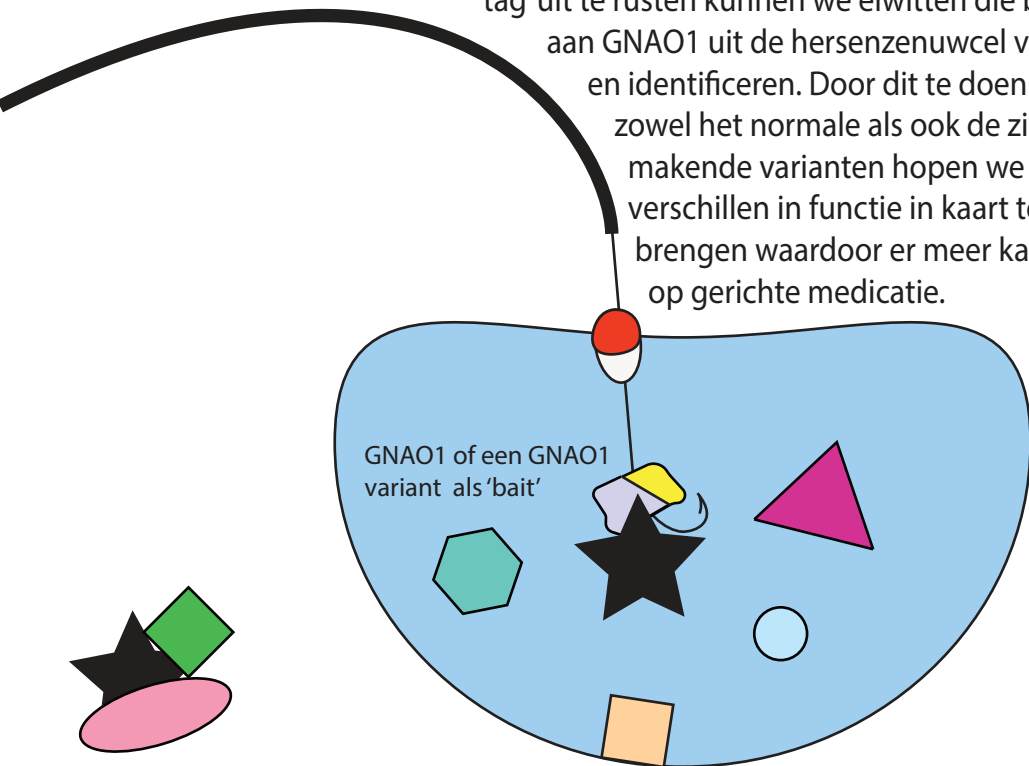
GNAO1 S229R





Zoektocht naar de rol van GNAO1 en de afwijkende rol van de varianten

Door GNAO1 niet met een rood eiwit te fuseren maar met een bepaalde 'tag' uit te rusten kunnen we eiwitten die binden aan GNAO1 uit de hersenzenuwcel vissen en identificeren. Door dit te doen voor zowel het normale als ook de ziek makende varianten hopen we de verschillen in functie in kaart te brengen waardoor er meer kans is op gerichte medicatie.





The GNAO1 team



