



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Segmental duplications as a source of innovation in brain development

Lodewijk, G.A.

Publication date

2021

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Lodewijk, G. A. (2021). *Segmental duplications as a source of innovation in brain development*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Chapter 7

Nederlandse Samenvatting

Hoofdstuk 1: Inleiding

Het menselijk brein staat bekend om zijn toename in grootte in de recente evolutie, wat in verband is gebracht met verbeterde cognitieve vaardigheden. De exacte genetische veranderingen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling, grootte en complexiteit van het menselijk brein zijn echter lang onbekend geweest. Om te begrijpen hoe onze hersenen zijn opgebouwd en hoe genetische afwijkingen tot hersenziektes kunnen leiden, hebben we een beter begrip van genetisch materiaal betrokken bij evolutie en hersenontwikkeling in de mens. In dit proefschrift richten we ons specifiek op enkele van de meest recente structurele variatie in ons genoom, wat heeft geleid tot een groot deel van evolutionaire nieuwe DNA-sequenties in het genoom van de mens. Met behulp van verschillende experimentele technieken heb ik hun rol in de normale ontwikkeling van het menselijk brein onderzocht om hun bijdrage aan de evolutionaire toename in grootte en complexiteit van het menselijk brein te onderzoeken. Als rode lijn in dit proefschrift is steeds te zien dat het gunstige effect van structurele genomische aanpassingen een prijs heeft: De gunstige evolutionaire aanpassingen leiden vaak ook tot een toename van de genomische instabiliteit. Dit leidt tot een hogere kans op nieuwe veranderingen in het DNA, die verhoogde kwetsbaarheid tot genetische afwijkingen en ziektes kan veroorzaken. De balans tussen gunstige en nadelige effecten van structurele DNA variatie lijkt dus onlosmakelijk aan elkaar verbonden en dit heeft in de mens heeft dit een centrale rol gespeeld in evolutionaire aanpassingen. Ook in de toekomst zal het zijn weerslag blijven hebben op evolutie en ontwikkeling van de mens.

1.1: Een kort historisch overzicht van de mens

De moderne mens heeft zich in de afgelopen ~50,000 jaar verspreid over de hele wereld. Het wordt algemeen verondersteld dat de toename in cognitieve capaciteit heeft bijgedragen aan deze ontwikkeling. In vergelijking met evolutionair dichtbij staande soorten, zoals de chimpansee, zijn er duidelijke verschillen te zien in hersenstructuur op verschillende niveaus. Een van de meest voor de hand liggende eigenschappen is de grootte van de menselijke hersenen, die drievoudig is toegenomen in vergelijking met de chimpanzee. Verder zijn er bijvoorbeeld verschillen in opbouw van connecties tussen hersengebieden, en de kenmerken van hersencellen zelf, zoals de eigenschappen van axonen en dendrieten. Het is interessant dat de toename in hersengrootte ongeveer 2 miljoen jaar geleden is begonnen, ten tijde dat eerste mens-achtige soorten zich verspreiden over wereld. Deze soorten zijn bijvoorbeeld de Homo heidelbergensis en Homo erectus, maar hebben een kleiner hersenvolume dan de moderne mens. De oudst bekende fossielen duiden er op dat zij zeker 1-2 miljoen jaar geleden al in Afrika en delen van Europa en Azië leefden. Recentere mens-achtige soorten, zoals de Neanderthaler en Denisova-mens, lijken dezelfde hersengrootte te hebben als de moderne mens. Deze soorten zijn zo'n 600,000 jaar geleden van onze gezamenlijke voorouder afgesplitst en leefden voornamelijk in Europa en Azië. Ook anatomisch moderne mensen zijn zo'n 200,000-300,000 jaar geleden vanuit Afrika richting Europa en Azië getrokken, maar zijn niet in staat geweest een stabiele populatie te beginnen. Pas zo'n 50,000 jaar geleden begon de tweede, succesvolle migratie van de moderne mens. Kort hierna zijn vrijwel alle andere mens-achtige soorten uitgestorven. Hoe deze curieuze samenloop van omstandigheden heeft plaatsgevonden, blijft vooralsnog speculatief.

1.2: Innovaties in ontwikkeling van de hersenen in de mens

De toename in hersengrootte van de mens is te verklaren door aangepaste kenmerken van neuronale stamcellen gedurende de embryonale ontwikkeling, voornamelijk in de grote hersenen, ook wel neocortex genoemd, is hier veel onderzoek naar gedaan. Neurale stamcellen kunnen zich gedurende ontwikkeling delen in twee nieuwe stamcellen, of ze kunnen specifieke hersencellen vormen, zoals neuronen. Als een stamcel zich differentieert tot neuron, kan deze echter geen nieuwe cellen meer vormen via celdeling. Er is dus een balans tussen het vergroten van de stamcelpopulatie via celdelingen en het maken van neuronen en andere celtypes. Laatstgenoemde zijn nodig voor uitvoering van hersenfuncties,

maar putten de stamcelpopulatie uit tijdens de ontwikkeling. In vergelijking met chimpansee en andere primaten, is in de ontwikkeling van de menselijke hersenen een enorme uitbreiding van neurale stamcellen te zien. Als deze zich eenmaal differentiëren naar andere celtypes, hebben ze dus een veel grotere capaciteit opgebouwd in het aantal cellen die gevormd kunnen worden. Veel onderzoek, zoals bijvoorbeeld in muizen, is gedaan naar een bepaald type neurale stamcel, de radiale gliacel. Deze cellen hebben een basale en apicale uitloper, waarmee ze zich aan de grenzen van de hersenen verankeren om zo de vroege structuur van de hersenen te vormen. Het cellichaam bevindt zich in de ventriculaire zone, waar de radiale glia onder andere via specifieke cel-cel communicatie zelfvernieuwende delingen ondergaan. In de afgelopen 10 jaar is er ook veel aandacht uitgegaan naar een subtype radiale gliacel, de basale radiale gliacel. Deze heeft alleen een uitloper naar de basale lamina van de hersenen en het cellichaam bevindt zich buiten de ventriculaire zone, maar heeft nog steeds de zelfvernieuwing en celdeling capaciteiten zoals de klassieke radiale gliacel. Doordat de basale radiale gliacellen de cel-celcontacten zoals in de ventriculaire zone missen, hebben ze een uniek genexpressiepatroon wat hun stamcel eigenschappen stimuleert. Ze lijken vooral extra beïnvloed te worden door uitgescheiden signaalmoleculen, waarmee ze over grotere afstanden bepaalde groeisignalen kunnen ontvangen. Juist deze celpopulatie is enorm toegenomen in de ontwikkelende hersenen van de mens in vergelijking met bijvoorbeeld chimpansees, waardoor gedacht wordt dat de basale radiale gliacellen een groot aandeel hebben gehad in de vergroting van hersenvolume in de mens.

1.3: NOTCH activiteit in de ontwikkelende grote hersenen

De NOTCH signaalroute is geconserveerd in dieren en is betrokken bij de organisatie van cellen en hun regulatie in zelfvernieuwing en differentiatie. In zoogdieren zijn er 4 receptoren bekend (NOTCH1-4) en 5 klassieke liganden bekend (DLL1, DLL3, DLL4, JAG1, JAG2). Er zijn ook veel andere liganden bekend die NOTCH activiteit kunnen beïnvloeden. de NOTCH signaalroute staat bekend om dat het een relatief simpel basismechanisme heeft. Een receptor wordt geactiveerd door trans-interactie met een ligand, waarna de receptor gesplitst wordt. Een intracellulair onderdeel van de receptor verplaatst zich naar de celkern en kan tot expressie van een selecte groep genen aanzetten. In de ventriculaire zone van de hersenen is dit ook een belangrijke signaalroute die voor uitbreiding van de populatie radiale gliacellen zorgt. Activatie van NOTCH receptoren leidt

bijvoorbeeld tot expressie van het gen HES1. Dit gen is essentieel voor de balans tussen zelfvernieuwing en differentiatie van radiale glia. Een belangrijke functie van HES1 hierin is de remming van pro-neurale eiwitten zoals NGN2. Dit hele proces wordt weer in toom gehouden door feedback van NOTCH signalen via cel-celcontracten tussen cellen (laterale inhibitie), waarbij de expressie van HES1 en NGN2 oscilleren in een tegenovergestelde fase. Zo lang deze status quo in stand gehouden wordt, blijven radiale gliacellen zelfvernieuwende delingen ondergaan. Wordt de oscillatie verbroken en blijft NGN2 expressie continu op hoog niveau, zorgt dit voor differentiatie van radiale gliacellen. Dit is dus een goed beschreven mechanisme in radiale gliacellen die zich in de ventriculaire zone bevinden. Het is dan interessant te zien dat basale radiale glia, die niet gebruik kunnen maken van deze specifieke NOTCH feedbacksystemen in de ventriculaire zone, toch dezelfde zelfvernieuwende capaciteiten behouden. Ook is het bekend dat HES1, een gen onder invloed van NOTCH, actief is in de basale radiale gliacellen. Dit suggereert dat de NOTCH signaalroute actief is in de basale radiale gliacellen, maar het is nog onbekend of laterale inhibitie en HES1 - NGN2 oscillaties ook hier aanwezig zijn. Omdat veel van deze studies in muizen gedaan zijn, waarin de basale radiale gliacellen veel minder voorkomen, is er nog weinig bekend over al deze eigenschappen van de NOTCH signaalroute in basale radiale glia en in het algemeen tijdens hersenontwikkeling van de mens.

1.4 Genduplicaties als een bron van innovaties in evolutie

Ondanks technologische vooruitgang, zijn bepaalde delen van het DNA moeilijk in kaart te brengen. Deze bevatten veel repetitieve of homologe DNA sequenties. Kort gezegd, er kunnen twee of meerdere stukken DNA in het genoom aanwezig zijn, die zoveel op elkaar lijken, dat tijdens het in kaart brengen van het genoom ze niet gemakkelijk uit elkaar te houden zijn. Hierdoor zijn deze regio's in het genoom minder bestudeerd dan de rest, maar kunnen ze wel veel relevante informatie bevatten over de evolutie van de mens. Een deel van deze regio's zijn ontstaan via genduplicaties. In dit onderzoek hebben we ons voornamelijk gericht op het bestuderen van een aantal genen die ontstaan zijn via dit proces. Voor ons zijn genduplicaties interessant, doordat ze via een relatief snel proces voor evolutionaire aanpassingen kunnen zorgen. Daarnaast kunnen genduplicaties in sommige gevallen ook genetische hersenafwijkingen veroorzaken. Via analyse van de gecombineerde informatie over evolutie van genduplicaties en eventuele associaties met hersenafwijkingen, proberen we relevante nieuwe genetische

regio's op te sporen in de mens. Genduplicaties ontstaan vaak via fouten in de celdeling, voornamelijk bij de vorming van geslachtscellen en tijdens de eerste celdelingen van de bevruchte eicel. Tijdens de celdeling kan DNA uit verschillende gebieden foutief met elkaar hybridiseren. Uiteraard zijn er reparatiemechanismen in de cel die deze kruisingse DNA interacties herstellen, maar soms wordt dit niet correct gedaan. Hierdoor kan een deel van het DNA, en alle genen die hierin aanwezig zijn, overgeplaatst worden van de ene streng DNA naar de andere. Als dit gebeurt in geslachtscellen, kan dit doorgegeven worden in het nageslacht, waardoor dat specifieke individu extra kopieën van een bestaand gen kan hebben. Meestal heeft dit geen effect, aangezien het gen reeds aanwezig is in het genoom. Soms kan het zelfs tot genetische afwijkingen leiden, wanneer bepaalde genen meerdere malen aanwezig zijn. Echter, in sommige gevallen kan het voordeel opleveren. De extra genkopieën kunnen namelijk ook aangepast worden, zodat deze een nieuwe functie kunnen krijgen. Daarnaast zijn er, naast genduplicaties, meer vormen van structurele variatie mogelijk, zoals deleties, inversies, genconversie, en andere complexe DNA recombinaties. Al deze processen dragen bij aan het ontstaan van genetische variatie, die kan bijdragen aan het ontstaan van aanpassingen in evolutie.

1.5: Duplicaties van KRAB zink-vinger gene in de evolutie van primaten

Zink-vinger genen zijn de meest voorkomende eukaryotische transcriptiefactoren, die bij allerlei genregulatie processen betrokken zijn. Hun naam stamt af van het zink ion dat essentieel is in de structuur van het eiwit. Er zijn verschillende types zink-vinger eiwitten, waarvan het type C2H2 het meest bekend is. In dit geval wordt het zink ion gestabiliseerd door interacties met 2 cysteine en 2 histidine residuen. Een enkel zink-vinger domein kan een stuk DNA van 3 specifieke nucleotiden herkennen via de contact-residuen in het zink-vinger domein. Door meerdere zink-vinger domeinen sequentieel achter elkaar te zetten in één eiwit, kan een DNA sequentie met een veelvoud van 3 nucleotides worden herkend. Variatie in de contact-residuen en het aantal zink-vinger domeinen leidt tot een breed scala aan potentiële sequenties die door zink-vinger eiwitten herkend kunnen worden. Dit is dan ook uitgebuit voor snelle evolutionaire aanpassingen in evolutie van de mens. We hebben dit onderzocht voor een subklasse C2H2 zink-vinger eiwitten, de KRAB zink-vingers. Deze bevatten een extra domein aan de N-terminus, het KRAB domein. Dit domein kan extra factoren rekruteren, zoals KAP1, die H3K9me3 en DNA methylatie induceren in het lokale epigenetische landschap. Hiermee wordt

lokaal de activiteit van genen of andere regulatoire elementen stilgezet. In de mens zijn ongeveer 350 KRAB zink-vinger genen in het genoom te vinden, waarvan er zo'n 170 nieuw gevormd zijn tijdens de evolutie van primaten. De snelle expansie van deze genen is voortgekomen uit genduplicaties. Veel KRAB zink-vinger genen zijn dan ook in clusters te vinden in het genoom. Deze zijn door hun onderlinge homologie en door omliggende repetitieve DNA elementen zoals satelliet DNA, zeer gevoelig zijn voor recombinaties. In de afgelopen jaren is er meer bekend geworden over de achterliggende redenen voor de eigenaardige toename in KRAB zink-vinger genen. Er is steeds meer bewijs dat KRAB zink-vinger genduplicaties een gevolg zijn van een reactie tegen retrotransposon invasies, om zo de integriteit van het genoom te waarborgen. Retrotransposons zijn de overblijfselen van geïntegreerde virussen die geslachtscellen hebben geïnfecteerd en kunnen overgedragen worden op de volgende generatie. Retrotransposons kunnen via een kopieer-en-plak (type I) or knip-en-plak (type II) mechanisme zichzelf vermeerderen of verplaatsen in het genoom, met alle mogelijke negatieve effecten van dien. Recente studies laten zien dat KRAB zink-vinger genen voornamelijk DNA sequenties in retrotransposons herkennen en via de plaatsing van heterochromatine de activiteit van retrotransposons tegengaan. Door deze doelgerichte aanpak van KRAB zink-vingers en door erosie van retrotransposon sequenties over miljoenen jaren, zijn er slechts enkele types retrotransposons bekend die nu nog actief zijn. De continue strijd tussen KRAB zink-vingers en retrotransposons heeft ook de potentie gehad nieuwe genetische variatie te introduceren tijdens evolutie. Zo zijn bepaalde retrotransposons omgevormd tot regulatoire sequenties die bijdragen aan endogene genexpressie in verschillende omstandigheden. Ook is er bewijs dat de KRAB zink-vingers zelf zijn aangepast om genen uit het eigen genoom te reguleren, door binding aan genpromoters. Door de omvang van retrotransposons en KRAB zink-vinger genen in het genoom heeft dit een groot reservoir aan nieuw DNA aangeleverd, die opnieuw gebruikt kon worden voor evolutionaire aanpassingen.

1.6: Organoïden als nieuwe techniek voor onderzoek naar ontwikkeling van de mens

De studie van hersenontwikkeling in de mens is logischerwijs bemoeilijkt door de beperkte mogelijkheden dit te doen. Veel van de fundamentele kennis over hersenontwikkeling is daardoor opgedaan door studies die gebruik maken van modelsoorten, zoals de muis, zebrafis en fruitvlieg. Alhoewel deze studies tot vele

inzichten hebben geleid, kan de genetische achtergrond van de mens soms belangrijk zijn voor de interpretatie van experimentele data. Recent is hiervoor een oplossing gekomen in de vorm van een nieuw modelsysteem. Hierin worden humane embryonale stamcellen (ESCs) gekweekt, die in principe elke cel van het lichaam kunnen vormen, en gevormd tot een bepaalde hersenstructuur na toevoeging van specifieke signaalmoleculen. Deze zogenaamde organoïden (mini-organen in een kweekschaal) volgen in het algemeen de ontwikkelingskenmerken van het embryo en zijn meestal zo'n 1-2 mm diameter in grootte. Via deze techniek kunnen veel studies worden uitgevoerd in een model met menselijke achtergrond, met als voordeel dat ze een toegankelijke bron zijn voor allerlei experimentele methodes. Daarnaast zijn er 2 nieuwe ontwikkelingen geweest die het gebruik van stamcellen en organoïden verder hebben uitgebreid. Ten eerste de geïnduceerde pluripotente stamcel (iPSC) techniek. Door toevoeging van specifieke transcriptiefactoren kunnen somatische cellen, bijvoorbeeld fibroblasten of witte bloedcellen, een herprogrammatie naar stamcel ondergaan. Deze iPSCs hebben grotendeels dezelfde eigenschappen als ESCs. Een voordeel van de iPSCs is dat ze de genetische informatie bevatten van het individu waaruit de somatische cellen van zijn verkregen. Hierdoor kan men inzicht krijgen in de genetische achtergrond van een individu en welke biologische effecten dit heeft. Met name bij vragen over genetische afwijkingen en ziektes is dit een veelbelovende methode. De cellen en/of organoïden van een ziek persoon kunnen worden vergeleken met gezonde controles, om zo meer te weten over het ziektebeeld. De tweede ontwikkeling is het gebruik van CRISPR-Cas9. Dit is een van oorsprong bacterieel endonucleases - RNA complex, dat specifieke DNA sequenties kan herkennen en middels het nuclease domein DNA schade induceert (dubbel-strengs DNA breuk). Het RNA molecuul bepaald welke DNA sequentie wordt herkend. Dit werkt door RNA-DNA hybride basenparen, die echter wel de traditionele base-paring regels volgen. Hierdoor is het eenvoudig het RNA molecuul aan te passen, zodat CRISPR-Cas9 naar vrijwel elke sequentie in het genoom kan worden gestuurd. De lokale DNA schade zal DNA-reparatie processen aanzetten, welke opnieuw gemanipuleerd kunnen worden om dit gericht te laten gebeuren. Ook zijn er aangepaste Cas9 eiwitten te gebruiken die zonder DNA schade een tijdelijke functie uitvoeren, zoals het beïnvloeden van de lokale epigenetische samenstelling. Met de verschillende CRISPR-Cas9 is het dus mogelijk de functie vrijwel elk stukje DNA in het genoom te bestuderen. In

combinatie organoïden en iPSC technieken is het nu dus mogelijk een nieuwe inzichten te krijgen in de ontwikkeling van de mens.

1.7: De fossiel DNA revolutie

In de reconstructie van genoom evolutie wordt het DNA van verschillende soorten met elkaar vergeleken om uitspraken te doen over aanpassingen in het genoom die in het verleden plaatsvonden. Zo kan er bijvoorbeeld een inschatting gemaakt worden wanneer 2 soorten van elkaar afgesplitst zijn van een gemeenschappelijke voorouder. Door de technologische vooruitgangen in het verzamelen van DNA informatie (sequencing), is dit een zeer efficiënte mogelijkheid gebleken. Ondanks deze vooruitgang blijft het lastig om bijvoorbeeld de precieze tijdlijn van veranderingen in het humane genome in kaart te brengen, nadat de mens van de gezamenlijke voorouder met chimpansees is afgesplitst zo'n 6 miljoen jaar geleden. Een compleet nieuw inzicht in de recente evolutie begon toen DNA voor het eerst werd geïsoleerd uit fossielen van Neanderthalers in 1997. Later is fossiel Neanderthaler DNA met nieuwe technieken in kaart gebracht. Hierdoor zijn grote delen van het genoom bekend van de moderne mens, Neanderthalers en Denisova-mensen, die zo'n 30,000-150,000 jaar geleden leefden. Deze informatie geeft een objectieve historische blik op veranderingen in het genoom ten opzichte van voorouderlijke soorten die vroeger leefden. De fysieke eigenschappen van Neanderthalers zijn namelijk redelijk goed beschreven door vele fossiele vondsten. Zo heeft de schedel van Neanderthalers een langere, ovalere vorm vergeleken met de moderne mens. Fossielen van de Denisova-mens zijn zeer schaars en omvatten tot nu toe enkele vingerbotjes, tanden en kleine delen kaak en schedel. Door DNA uit deze fossielen te isoleren, kan er onderzocht worden of specifieke delen van het genoom betrokken zijn bij verschillen in fysieke eigenschappen tussen de moderne mens, Neanderthaler en Denisova-mens. Ook is het bekend deze 3 soorten gezamenlijk nageslacht hebben gekregen, waardoor er vandaag de dag nog steeds delen Neanderthaler en Denisova-mens DNA in ons genoom zit. Een deel hiervan is betrokken bij genetische aanpassingen die het immuunsysteem en metabolisme beïnvloeden. Genetische analyse van DNA uit fossielen van de moderne mens hebben ook nieuwe informatie blootgelegd over de verspreiding van de mens in de afgelopen ~50,000 jaar en recentere verschuivingen in populatiedynamica over de verschillende continenten.

Hoofdstuk 2

ESCRT-III eiwit CHMP1A is betrokken bij uitscheiding van SHH via een specifiek type extracellulaire blaasjes

In het laatste experimentele hoofdstuk analyseren we, in samenwerking met andere labs, de functie van het gen *CHMP1A*. Wij hebben onze expertise in gekweekte hersenstructuren gebruikt om meer te weten te komen over hersenafwijkingen na een mutatie in dit gen. Door deze mutatie verliest het *CHMP1A* gen zijn functie en veroorzaakt onder andere microcephalie (groeidefect grote hersenen), pontocerebellaire hypoplasie (groeidefect pons en kleine hersenen), en een klein postuur. In eerdere studies, waarin zebrafissen en muizen zijn gebruikt als modelorganismen, is de functie van de homologe *CHMP1A* genen uitgezocht. Hieruit bleek dat *CHMP1A* nodig is in cellen voor het uitscheiden van verschillende signaaleiwitten, via extracellulaire blaasjes. Het eiwit Sonic Hedgehog (SHH) wordt via deze extracellulaire blaasjes getransporteerd, en de mutatie in *CHMP1A* zorgt ervoor dat minder SHH beschikbaar is door defecten in de vorming van extracellulaire blaasjes. Waarschijnlijk is SHH tekort een van de kenmerken in de eerder genoemde hersenafwijkingen. Om dit verder te onderzoeken, is de *CHMP1A* mutatie nagebootst in gekweekte humane embryonale stamcellen via CRISPR-Cas9. Vervolgens zijn deze weer tot neocorticale hersenstructuren gekweekt. Analyse van deze structuren gaf aan dat ook in dit model de *CHMP1A* mutatie tot microcephalie leidt. We probeerden dit te herstellen door tijdens de kweek SHH extra te activeren door toevoeging van een extra signaalmolecuul. Echter, dit had in zowel de controle als de *CHMP1A*-mutanten kweken grote algemene effecten. Wel was het interessant te zien dat in de controles, genen die indicatief zijn voor celdeling van neuronale stamcellen een sterk verhoogde expressie lieten zien. In de mutanten was dit effect veel minder aanwezig. Samengevat blijkt hieruit dat *CHMP1A* nodig is voor de juiste balans tussen celdeling en differentiatie in neuronale stamcellen.

Hoofdstuk 3

Het mens-specifieke gencluster *NOTCH2NL* beïnvloedt corticogenese

Hier beschrijven we de ontdekking van een mens-specifiek gencluster, de *NOTCH2NL* genen. Deze zijn ontstaan na meerdere duplicaties en recombinaties in de gemeenschappelijke voorouder van de mens, chimpansee en gorilla, maar intacte *NOTCH2NL* genen zijn alleen te vinden in de mens. In een specifiek gebied van het genoom, de *1q21.1* locus, bevinden zich 3 van deze genen. De *1q21.1* regio staat bekend door zijn associatie met hersenafwijkingen. Bijvoorbeeld, mensen met een duplicatie van de *1q21.1* regio hebben vaak te grote hersenen (macrocephalie) en autisme, terwijl mensen met een deletie van de regio vaak te kleine hersenen hebben (microcephalie) en schizofrenie. Om de functie van *NOTCH2NL* genen en hun mogelijke associatie met hersenafwijkingen te bestuderen, hebben we met CRISPR-Cas9 de *NOTCH2NL* genen verwijderd uit het genoom van gekweekte humane embryonale stamcellen. Deze zijn vervolgens tot hersenstructuren gekweekt die lijken op de neocortex. Deze zijn vergeleken met dezelfde structuren verkregen uit controle cellen. Hieruit bleek dat *NOTCH2NL* nodig is voor het in stand houden van de neuronale stamcelpopulatie. Verwijderen van *NOTCH2NL* leidde tot vervroegde differentiatie, en te vroege uitputting van de neuronale stamcelpopulatie. In hierop volgende experimenten vinden we dat het effect waarschijnlijk optreedt via veranderde activiteit van het NOTCH2 eiwit, dat essentieel is voor signaalmechanismen in neuronale stamcellen. Als laatste vinden we dat in bepaalde gevallen met een *1q21.1* genetische afwijking, de *NOTCH2NL* genen zelf de breekpunten in het DNA zijn geweest. Dit suggereert een evolutionaire afweging op moleculair niveau. Aan de ene kant helpen *NOTCH2NL* genen bij de ontwikkeling van het brein, maar ze hebben ook tot grotere instabiliteit van de *1q21* regio geleid.

Hoofdstuk 4

***NOTCH2NL* eiwit expressie is afgenomen in recente evolutie**

De evolutie van *NOTCH2NL* genen in recente evolutie wordt hier verder behandeld. We vergelijken DNA informatie van de moderne mens met DNA informatie uit fossielen van voorouderlijke mensen, Neanderthalers en Denisovas, die tot 30-100 duizend jaar geleden leefden. Relatief veel Neanderthalers hebben een extra kopie van een *NOTCH2NL* gen. Ook vinden we specifieke genvarianten, die uniek in Neanderthalers en Denisovas te vinden zijn, die de structuur of functie van *NOTCH2NL* eiwit lijken te beïnvloeden. Verder heeft het Denisova genoom een zeer ongebruikelijke samenstelling van *NOTCH2NL* genen, die we in geen enkele moderne mens gevonden hebben. Hierdoor lijkt dit Denisova individu een zeer lage hoeveelheid *NOTCH2NL* eiwit te produceren. Uit analyse van 279 genoom datasets en 49,599 exoom datasets vinden we een aantal *NOTCH2NL* genvarianten die de functie van het eiwit verstoren, of het eiwit expressie niveau verminderen. Deze komen echter veel vaker voor dan eerst gedacht. De gecombineerde distributie van de varianten geeft aan dat deze synergistisch en coöperatief de functionele *NOTCH2NL* eiwit dosis verlagen. Uit de verschillende analyses in dit hoofdstuk blijkt dus dat de configuratie van *NOTCH2NL* genen zeer variabel was in recente evolutie, en dat deze genen nog steeds onder selectie staan vandaag de dag. Dit zien we terug in het DNA van een aantal eeneiige tweelingen die we hebben geanalyseerd, waar er soms een verschil was in de aanwezigheid van *NOTCH2NL* genvarianten. Dit heeft onder andere consequenties voor de analyse van *1q21* gerelateerde neuronale afwijkingen, waarin *NOTCH2NL* genen betrokken zijn. Niet alleen is het aantal *NOTCH2NL* genen belangrijk, die kunnen immers variëren via genduplicates of deleties. Ook de aanwezigheid van de verschillende genvarianten is bepalend voor de hoeveelheid *NOTCH2NL* eiwit die gemaakt wordt. In klinisch genetische studies over *1q21* zullen deze twee factoren dus beide bekeken moeten worden, voor een nauwkeurige inschatting over de mogelijke rol van *NOTCH2NL* genen in neuronale afwijkingen.

Hoofdstuk 5

Een KRAB zink vinger gen heeft de balans van HES1 autoregulatie veranderd in de evolutie van primaten

In dit hoofdstuk onderzoeken we een specifiek gen uit de KRAB zinkvinger genfamilie, *ZNF675*. Tijdens de evolutie van primaten, is deze genfamilie enorm vergroot via genduplicaties. Daardoor zijn er nu ongeveer 350 KRAB zinkvinger genen in het genoom van de mens aanwezig, waarvan er ongeveer 170 uniek in primaten te vinden zijn. Deze expansie is te verklaren door de rol van KRAB zinkvingers bij de remming van retrotransposon activiteit. Retrotransposons zijn afgeleid van virus DNA en kunnen zich via verschillende mechanismen vermeerderen en verspreiden in het genoom. Dit is veelvuldig gebeurd in evolutie van primaten, waarbij duplicaties en aanpassingen van nieuwe KRAB zinkvinger genen hebben geholpen tegen verdere verspreiding van retrotransposons. Uit eerder gepubliceerde data, vinden we dat *ZNF675*, in overeenkomst met het model, de activiteit van een bepaalde groep retrotransposons kan afremmen. *ZNF675* is voor het eerst ontstaan in de gemeenschappelijke voorouder van apen uit de Nieuwe Wereld en de mens, zo'n 35-45 miljoen jaar geleden. Verder vonden we dat duplicaties en deleties van de *19p12* locus, die *ZNF675* omvat, aanwezig zijn in een aantal mensen met neuronale afwijkingen. Om het mogelijke verband tussen *ZNF675* en hersenontwikkeling bloot te leggen, hebben we met CRISPR-Cas9 *ZNF675* verwijderd uit het genoom van gekweekte humane embryonale stamcellen. Door deze tot hersenstructuren te differentiëren, verkregen we inzicht in het effect van de *ZNF675* deletie tijdens de ontwikkeling. Tot onze verrassing vonden we geen sterke associatie tussen retrotransposons en het verlies van *ZNF675* in de gekweekte hersenstructuren. Uit nadere inspectie van *ZNF675* data vonden we dat *ZNF675* ook aan promoters bindt van genen. Eén van deze was de *HES1* promotor, een essentieel gen in de ontwikkeling van het brein en onderdeel van de NOTCH signaalroute. In vervolggexperimenten laten we zien dat *ZNF675* de expressiedynamiek van *HES1* heeft veranderd. Dit geeft aan dat *ZNF675* de activiteit van genen kan reguleren, wat wellicht een belangrijke verklaring kan zijn voor neuronale afwijkingen in mensen met een duplicatie of deletie van *ZNF675*. In een andere studie vinden we aanwijzingen dat meerdere KRAB zink-vinger genen een zelfde patroon volgen als *ZNF675* en genpromoters mogelijk reguleren. De KRAB zinkvinger genfamilie lijkt dus een belangrijke factor te zijn geweest in

evolutie van primaten en de mens, voor zowel de bescherming tegen retrotransposons en evolutionaire aanpassingen van genregulatie.

Hoofdstuk 6

Discussie

Anatomische veranderingen van het menselijke brein tijdens de evolutie zijn lang bekend, maar onderliggende genetische veranderingen zijn pas sinds kort gevonden. In dit proefschrift hebben we ons gericht op de bijdrage van genduplicaties aan evolutie van de mens. In hoofdstuk 2 gebruiken we het organoïde model van hersenen om het effect van *CHMP1A* mutaties in te zien. De resultaten laten zien dat organoïden de vroege ontwikkeling van de hersenen kunnen nabootsen en ook informatie kunnen geven over genetische hersenafwijkingen. In hoofdstuk 3 beschrijven we de mens-specifieke *NOTCH2NL* genen en vinden we bewijs voor een rol voor deze genen in hersenontwikkeling. Naast *NOTCH2NL* genen zijn er ook andere mens-specifieke genen ontdekt met vergelijkbare eigenschappen, zoals *TBC1D3*, *ARHGAP11B*, *TMEM14B* en *SRGAP2*. In hoofdstuk 4 vinden we dat *NOTCH2NL* configuraties zeer variabel zijn in de moderne mens, wat aangeeft dat ze hedendaags nog onder selectiedruk staan om de optimale dosis te vinden. In hoofdstuk 5 richten we ons op één gen uit de KRAB zink-vinger genfamilie, *ZNF675*. Structurele varianten van de *ZNF675* locus zijn gerapporteerd in een aantal individuen met neurologische afwijkingen en we hebben onderzocht wat hieraan ten grondslag ligt. De resultaten in dit proefschrift beschreven geven nieuwe inzichten in het genetische en moleculaire profiel in de evolutie van het menselijke brein.

6.1: Organoïden om aspecten van neurale stamcellen te onderzoeken

Om de functie van nieuwe DNA elementen te bestuderen in de mens hebben we gebruikt gemaakt van hersenorganoïden. Om beter inzicht te krijgen in dit model hebben we samengewerkt om de functie van het *CHMP1A* gen te achterhalen. Mutaties in dit gen leiden tot gebreken in ontwikkeling van de grote hersenen en kleine hersenen. Ook in het organoïdenmodel konden we soortgelijke gebreken zien in cellen met de *CHMP1A* mutatie. De achterliggende reden lijkt een gebrek aan SHH uitscheiding en activiteit te zijn. Daarom hebben we de organoïden behandeld met een molecuul dat de SHH-signalroute kan activeren. Dit had verrassend weinig effect in de *CHMP1A* mutant organoïden, terwijl in de controles dit duidelijk leidde tot verhoogde expressie van neurale stamcelgenen. De mutatie lijkt dus ook een blijvend effect te hebben op de eigenschappen van neurale stamcellen. Opvallend is dat in een muismodel met de *CHMP1A* mutatie, de kleine

hersenen veel minder aangedaan zijn dan in de mens. Dit suggereert dat *CHMP1A* verschillende functies kan hebben in verschillende soorten. Dit zou verder uitgezocht kunnen worden door organoïdemodellen van verschillende soorten met elkaar te vergelijken en deze onder verschillende condities te behandelen, bijvoorbeeld met activators van de SHH-signaalroute. Organoïden zijn dus interessante modellen die veel nieuwe inzichten kunnen geven in normale ontwikkeling en ziektes. Veel onderzoek is momenteel gaande om deze modellen toe te passen en te verbeteren, zodat verschillende aspecten van ontwikkeling bekeken kunnen worden.

6.2: Evolutie van *NOTCH2NL* genen en het ontstaan van mens-specifieke herseneigenschappen

NOTCH2NL genen zijn mens-specifiek en zijn onderdeel van een groep recent ontstane genen in de evolutie die betrokken zijn bij hersenontwikkeling. *NOTCH2NL* kan de activiteit van de NOTCH-signaalroute verhogen en hiermee zelfvernieuwing van neurale stamcellen stimuleren. Dit zou één van de effecten kunnen zijn die bijgedragen hebben aan evolutionaire vergroting van de menselijke hersenen. Het is namelijk bekend dat NOTCH activiteit belangrijk is voor uitbreiding van de radiale gliacelpopulatie. Ook is er expressie van *NOTCH2NL* in de basale radiale gliacellen. Wellicht dat *NOTCH2NL* hier extra bijdraagt aan activatie van de NOTCH-signaalroute en expressie van *HES1*. In een opvolgende studie vinden we dat de genetische configuratie van *NOTCH2NL* genen sterk varieert per individu en effect heeft op de hoeveelheid NOTCH2NL eiwit die wordt geproduceerd. Dit geeft aan dat er mogelijk selectiedruk is op *NOTCH2NL* genen om de optimale genconfiguratie te vinden. Ook is het interessant in *1q21.1* ziektebeelden, waar *NOTCH2NL* genen ook bij betrokken kunnen zijn. Door duplicatie of deletie van specifieke *NOTCH2NL* genvarianten die verschillende hoeveelheid eiwit produceren, zou dit bepalend kunnen zijn hoe het ziektebeeld per individu verschillend is. Ook deze effecten kunnen met organoïdemodellen onderzocht kunnen worden. Doordat de *1q21.1* locus erg instabiel is, zal een beter begrip van variatie in de *1q21.1* variatie ook meer inzicht geven in het ziektebeeld. Alhoewel *NOTCH2NL* genen sterke kandidaten zijn die bijdragen aan het ziektebeeld, zijn er misschien ook andere genen of regulatoire elementen die nog niet in hiermee in verband gebracht zijn. Daarnaast is er steeds meer data beschikbaar in zogenaamde biobanken. Hierin wordt van een groot aantal mensen DNA informatie in kaart gebracht. Ook wordt allerlei biologische, fysiologische en

medische data verzameld van de individuen, die dus weer gekoppeld kan worden aan individuele genoomconfiguraties. Met deze verschillende experimentele technieken en databanken is het dus mogelijk een steeds beter inzicht te krijgen in hoe DNA variatie de biologie van de mens beïnvloed.

6.3: KRAB zink-vinger genen als nieuwe regulatoire factoren in evolutie van primaten

De KRAB zink-vinger genfamilie is één van de grootste in het humane genoom. Deze zijn ontstaan door vele genduplicaties recent in evolutie. Doordat KRAB zink-vinger genclusters genetisch instabiel zijn, hebben duplicaties snel kunnen plaatsvinden om zo adaptaties in gang te zetten. Echter, kan hier ook een risico aan verbonden zijn, doordat de instabiliteit voor genetische afwijkingen kan zorgen en tot ziektes kan leiden vandaag de dag. KRAB zink-vinger eiwitten zijn voornamelijk bekend door hun functie om retrotransposon activiteit tegen te gaan. Daarnaast is zijn er al langere tijd hypothesen dat KRAB zink-vinger eiwitten ook bij andere processen in de cel een rol spelen. Dit is al wel bekend voor een handje vol KRAB zink-vinger genen die al lang geleden zijn ontstaan. Voor recente KRAB zink-vinger genen is dit weinig onderzocht. Wij hebben hiernaar gekeken en vonden bijvoorbeeld dat 26% van alle genen een primaat-specifieke KRAB zink-vinger bindingspositie in hun promotor hebben. Dit is waarschijnlijk een onderschatting, aangezien van nog niet alle KRAB zink-vinger deze data beschikbaar is. Wij hebben *ZNF675* als specifiek voorbeeld verder onderzocht, aangezien de locus waarin deze op het genoom ligt bekend is bij een aantal individuen met neurologische afwijkingen. Hier vonden we dat *ZNF675* de expressie van *HES1* beïnvloed, een belangrijk gen in de ontwikkeling van de hersenen, door regulatoire processen in de *HES1* promotor te moduleren. Dit geeft dus aan dat recente KRAB zink-vingers ook bij endogene genregulatie betrokken kunnen worden. Dit kan ook nieuwe ideeën over de evolutionaire wapenwedloop tussen retrotransposons en KRAB zink-vinger genen aanleveren. Zo zal in de evolutie en optimalisering van KRAB zink-vinger genen rekening moeten worden gehouden met de effecten op het endogene DNA: Het tegengaan van retrotransposon activiteit moet niet ten koste gaan van verstoring van de eigen genregulatie. Hier is dus een samenspel van meerdere parameters, die nieuwe variatie in het DNA tot gevolg hebben. Deze variatie kan negatief zijn, maar kan ook uitgebuit worden voor evolutionaire aanpassingen in het genoom.

6.4: De toekomst van het ontdekken en interpreteren van structurele variatie in het genoom

Het ontdekken en annoteren van complexe stukken DNA in het genoom is en blijft lastig. Dit komt met name doordat de technieken om dit in kaart te brengen de informatie halen uit kleine stukken DNA. Met nieuwe technieken kan er uit grotere stukken DNA informatie gehaald worden, waardoor delen van het genoom die hoge homologie of veel repetitieve sequenties hebben, zoals regio's met veel recente genduplicaties. Dit maakt het mogelijk een beter beeld te krijgen van complexe delen van het genoom. Zo is er recent een compleet X-chromosoom geannoteerd, door DNA informatie uit alle verschillende onderzoeken en technieken te combineren. Dit laat zien dat met de huidige technieken het mogelijk is om het DNA van de mens compleet in te zien. Deze technieken zijn ook gebruikt om variatie tussen individuen te onderzoeken. Zo zijn uit het DNA van 15 individuen uit verschillende populaties 100,000 nieuwe structurele varianten ontdekt ten opzichte van het referentiegenoom hg38. Het ontdekken van deze informatie is essentieel voor verdere interpretatie van DNA informatie. Deze variatie kan worden meegenomen in analyses van DNA informatie in biobanken, welke veelal nog de oudere DNA technieken gebruiken, simpelweg om praktische redenen als geld, beschikbaarheid van apparatuur en duur van analyses. Een bekende biobank is de UK biobank, waar DNA informatie van genen van 150,000 individuen binnenkort beschikbaar is. Door toevoeging van alle bekende DNA variatie in analyses kunnen betere associaties gemaakt worden tussen het genoom van een individu en biologische eigenschappen. Er zijn collectieve inspanningen om genoomanalyses te verbeteren, DNA informatie uit diverse populaties te verkrijgen en het aantal beschikbare datasets te verhogen. Hiermee is het nu mogelijk humane genetica tot in ongekend detail te onderzoeken. De tijd zal uitwijzen of dit genoeg is de wisselwerking tussen DNA en biologie per individu te begrijpen.

6.5: Evolutionaire genetica en systeembio

De genetische componenten die betrokken zijn bij evolutie van de mens worden langzaam maar zeker gevonden. Met name veranderingen in de hersenen, het metabolisme en het immuunsysteem lijken in evolutie van de mens te zijn opgetreden. Een openstaande vraag is hoe verschillende genetische veranderingen samen hebben bijgedragen aan deze biologische systemen. Deze zijn deels te beantwoorden door experimentele vergelijkingen, waarbij middels

organoïden, quantitative beeldvormende technieken en CRISPR-Cas9 screenings deze processen kunnen inzien. Hiermee kunnen verschillen in ontwikkelingspatronen van de mens en andere soorten inzien. Een interessant voorbeeld is de vorming van somieten in het embryo. Dit proces verloopt in de muis twee keer zo snel als in de mens. Recent is gevonden dat een gen dat essentieel is voor de ontwikkeling van somieten, *HES7*, hierbij van invloed is. Dit gen heeft een oscillerend expressiepatroon met een periode van 2 uur in de muis. In de mens is deze periode 4 uur gebleken. De oscillerende expressie van *HES7* is in beide soorten gecorreleerd aan de vorming van individuele somieten, die ook weer respectievelijk 2 en 4 uur duurt per somiet in muis en mens. Een ander voorbeeld is een onderzoek naar de eigenschappen van neurale stamcellen in de mens en de rhesusaap. Neurale stamcellen van de mens ondergaan relatief meer zelfvernieuwende delingen voordat ze differentiëren in neuronen en anders celtypes, in vergelijking met neurale stamcellen uit de rhesusaap. Door een klein aantal neurale stamcellen van de mens in de kweek van de rhesusaap toe voegen, en vice versa, werd onderzocht of deze eigenschappen vastlagen in de individuele cellen of dat deze beïnvloed werden door externe signalen. In de gemengde neurale stamcelkweken lieten de cellen echter hun eigen, soort-specifieke eigenschappen zien. Dit geeft aan dat in deze omstandigheden de intrinsieke eigenschappen van de neurale stamcellen belangrijker zijn dan externe signalen. Een interessante vervolgvraag op deze studies is of *HES1* en *HES5* ook soort-specifieke eigenschappen hebben in het ontwikkelende brein. Deze bevindingen leiden tot de hypothese dat cel-intrinsieke en cel-extrinsieke parameters in een ontwikkelingssysteem aangepast worden in de evolutie om evolutionaire veranderingen in gang te zetten. Begrijpen hoe deze parameters werken en wat hun effect is op biologische systemen, zoals hersengrootte en hersenstructuur in de mens, is wellicht essentieel om het begrijpen hoe dit gestuurd wordt tijdens evolutie.

6.6: Genconversie en genetische variaties in de vroegste stadia van het leven

Onze observaties in de genetische samenstelling van *NOTCH2NL* genen leiden tot vragen over de frequentie van genconversie in het genoom van de mens. De frequentie van genconversie is in een aantal studies waargenomen, maar blijkt zeer variabel per studie en per regio in het genoom. Genconversie is betrokken bij genetische afwijking die tot ziektes leiden, bijvoorbeeld spinale musculaire atrofie. Ook kan genconversie voor veranderingen zorgen in repetitieve stukken DNA,

waarbij na DNA schade en reparatieprocessen, de lengte van dit repetitieve DNA veranderd kan zijn. Verlengde delen repetitief DNA zijn veroorzaken bijvoorbeeld de ziekte van Huntington en het fragiele X-syndroom. Kortgeleden is ook in meerdere studies een verlengd repetitief DNA fragment in *NOTCH2NLC* bij een neurodegeneratieve ziekte gevonden. Door de instabiliteit van *NOTCH2NL* genen is het mogelijk dat dit veroorzaakt wordt tijdens genconversie met *NOTCH2NLC*. Variatie in repetitief DNA in het complete genoom is recent ook gekoppeld aan veranderingen in genexpressie tussen individuen. Genconversie zou dus een belangrijk mechanisme kunnen zijn dat het humane genoom gevormd heeft in de evolutie. Aangezien genconversie voornamelijk actief is in geslachtscellen en gedurende de eerste celdelingen in het embryo, zou het ook hedendaags kunnen bijdragen aan nieuwe genetische variatie. Via dit proces kan ook niet-Mendeliaanse overerving plaatsvinden. Zo komt het voor dat er plekken in het DNA van een kind niet overeenkomen met de mogelijk overerving die van de ouders af kan komen. Posities die inconsistent zijn met Mendeliaanse overerving zijn relatief vaak te vinden in instabiele genetische regio's en repetitief DNA. Of genconversie hier een rol in speelt en hoe frequent dit gebeurd is nog onbekend. Dit is bijvoorbeeld te onderzoeken door te kijken naar het DNA van eenige tweelingen of door het DNA van individuele cellen in kaart te brengen en met elkaar te vergelijken. Ook zouden celkweekmodellen inzicht kunnen geven in de mechanismen achter genconversie, bijvoorbeeld in embryonale stamcellen. Door het systematisch aanbrengen van schade in repetitief DNA met CRISPR-Cas9, zou gekeken kunnen worden of genconversie betrokken is bij reparatie van de DNA schade. Het is echter nog niet helemaal bekend hoe embryonale stamcellen in kweek functioneren in vergelijking met het embryo in de mens. Nieuwe ontwikkelingen hierin kunnen gebruikt worden om functies van genconversie in evolutie van de mens te onderzoeken, alsmede het effect of hedendaagse genetische variatie.

Conclusie

Vragen over de oorsprong van de mensheid hebben tot verwondering geleid in generatie op generatie. Met de nieuwe inzichten uit genomonderzoeken is er nu een veel beter beeld van de geschiedenis van de mens en functie van mens-specifieke DNA sequenties. Grootschalige structurele variatie, zoals genduplicaties en recombinaties, evenals kleinere structurele variatie, zoals repetitief DNA en retrotransposon inserties, zijn van grote invloed geweest op het

humane genoom. Het ontstaan van deze nieuwe sequenties zijn geassocieerd met instabiele regio's van het genoom, die door hun instabiliteit duplicaties en herorganisaties zijn ondergaan. Hierdoor zijn snelle evolutionaire aanpassingen mogelijk geworden, door grote veranderingen in genetische configuraties door duplicaties, deleties, inversies, enzovoorts. Inherent aan deze strategie is dat de nieuw gevormde regio's in het genoom, die bijgedragen hebben aan evolutie van de mens, nog steeds gevoelig zijn voor recombinaties. Hierdoor ontstaat er nieuwe genetische variatie in de mens vandaag de dag, die soms ook tot genetische afwijkingen en ziektes kan leiden. Het lijkt er op dat er een balans is tussen innovatie en stabiliteit van het genoom middels structurele variatie, een tweesnijdend zwaard in evolutionaire aanpassingen. Waar de eerste mijlpalen gezet zijn in onderzoek naar structurele variatie, blijft het een uitdaging om het complete genoom van de mens in kaart te brengen. Door de steeds toenemende stroom aan data, wordt langzaam maar zeker het volledige spectrum van individuele genetische variatie blootgelegd. Door nieuwe technieken en de enorme toestroom aan data zijn er nu al vele nieuwe regio's ontdekt die variëren in de populatie. Het toepassen van modelsystemen en technieken als organoïden, iPSCs, en CRISPR-Cas9 leveren nieuwe mogelijkheden de functies van deze variatie te bestuderen, betrokken bij normale ontwikkelingen of in de context van bepaalde ziektebeelden. Het staat buiten kijf dat structurele variatie in het genoom een grote rol heeft gespeeld in evolutie van de mens. We staan aan het begin de invloeden te begrijpen die het heeft op de onze biologie hedendaags