



**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN**

**FACULTEIT GENEESKUNDE**

**DEPT. MONDGEZONDHEIDSWETENSCHAPPEN**

**Het *CRISPLD2*-gen en zijn rol in orofaciale  
schisis: een literatuurstudie**

Promotor  
Prof dr Carine Carels  
Afdeling orthodontie

Masterproef ingediend tot het  
behalen van het diploma van  
Master in de Tandheelkunde

**Line ETIENNOT**

**Leuven academiejaar 2018 - 2019**





**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN**  
**FACULTEIT GENEESKUNDE**  
**DEPT. MONDGEZONDHEIDSWETENSCHAPPEN**

**Het *CRISPLD2*-gen en zijn rol in orofaciale  
schisis: een literatuurstudie**

Promotor  
Prof dr Carine Carels  
Afdeling orthodontie

Masterproef ingediend tot het  
behalen van het diploma van  
Master in de Tandheelkunde

**Line ETIENNOT**

**Leuven academiejaar 2018 - 2019**

*Na een schrijfproces van twee jaar leg ik de laatste hand aan mijn Masterthesis met dit dankwoord. Vooraleerst dank aan mijn promotor Prof dr Carine Carels voor de uitstekende begeleiding. Eveneens dank aan mijn grootouders, Mevrouw Lucienne Vanhoorde en de Heer Franz Jansens, en mijn vriend, de Heer Victor Jaecques, voor hun steun en goede adviezen tijdens deze periode. Ook wens ik Dr Ir Siegfried Jaecques te bedanken voor het grondige nalezen van mijn Masterthesis.*

# INHOUDSOPGAVE

1. INLEIDING .....	11
1.1 OBJECTIEVEN .....	11
1.2 MATERIAAL EN METHODE .....	11
2. SCHISIS .....	13
2.1 INLEIDING .....	13
2.2 WAT IS SCHISIS?.....	13
2.2.1 Prevalentie.....	13
2.2.2 Etiologie .....	14
2.2.2.1 Het genetisch aspect.....	14
2.2.2.2 Omgevingsfactoren .....	14
2.2.2.3 Teratogenen en andere factoren .....	15
2.3 DE CLASSIFICATIE VAN SCHISIS .....	15
2.3.1 Classificatie op basis van het fenotype .....	15
2.3.1.1 Subklinisch fenotype .....	15
2.3.2 Fenotypes .....	17
2.3.2.1 De lipspleet.....	17
2.3.2.2 De palatumspleet .....	18
2.3.2.3 De lipspleet met of zonder gehemelsespleet.....	18
2.3.3 Verschillende aandoeningen?.....	18
2.4 HET ONTSTAAN VAN SCHISIS .....	18
2.4.1 Ontwikkeling aangezicht.....	19
2.4.1.1 Ontstaan palatumspleten .....	20
2.4.1.2 Ontstaan lipspleten .....	21
2.5 HET BELANG VAN SCHISIS ONDERZOEK.....	22
2.5.1 Gevolgen van schisis.....	22

2.5.1.1 Algemene gevolgen.....	22
2.5.2 Belang van onderzoek .....	22
3. GENETISCH ONDERZOEK VAN <i>CRISPLD2</i> IN SCHISIS .....	24
3.1 INLEIDING .....	24
3.2 WAAROM IS GENETISCH ONDERZOEK VAN BELANG? .....	24
3.3 ONDERZOEKSMETHODES .....	24
3.3.1 Basisprincipes van genetica .....	24
3.3.2 Genetische merkers .....	25
3.3.3 Whole exome en genome sequencing .....	26
3.3.4 De locus van het oorzakelijk gen .....	26
3.3.4.1 Hoe werd het locus van het <i>CRISPLD2</i> -gen gevonden?.....	27
3.3.5 Genexpressie studies en dierexperimenteel onderzoek .....	27
3.3.5.1 Genexpressie studies .....	27
3.3.5.2 Dierexperimenteel onderzoek .....	28
4. HET <i>CRISPLD2</i> -GEN EN EIWIT .....	29
4.1 INLEIDING .....	29
4.2 WAT IS HET <i>CRISPLD2</i> -GEN? .....	29
4.2.1 Lokalisatie in het genoom .....	29
4.3 HET <i>CRISPLD2</i> -EIWIT .....	29
4.3.1 De CAP superfamilie .....	29
4.3.1.1 Structuur van het <i>CRISPLD2</i> -eiwit .....	32
4.3.1.2 <i>CRISPLD2</i> proteïne expressie .....	32
4.4 DE MOLECULAIRE EN BIOLOGISCHE FUNCTIES VAN HET <i>CRISPLD2</i> -EIWIT .....	33
4.4.1 De moleculaire interacties van het <i>CRISPLD2</i> -eiwit .....	33
4.4.2 De biologische functies van het <i>CRISPLD2</i> -eiwit.....	33
4.4.2.1 Het <i>CRISPLD2</i> -eiwit in de longontwikkeling .....	33

4.4.2.2 Het CRISPLD2-eiwit in de nierontwikkeling .....	34
4.4.2.3 Het CRISPLD2-eiwit in het immuunsysteem .....	34
4.4.2.4 Het CRISPLD2-eiwit in de craniofaciale ontwikkeling.....	35
4.4.3 De <i>CRISPLD2</i> modulatoren .....	36
5. DE ROL VAN HET <i>CRISPLD2</i> -GEN IN SCHISIS EN ANDERE AANDOENINGEN....	38
5.1 INLEIDING .....	38
5.2 ANDERE AANDOENINGEN WAARIN <i>CRISPLD2</i> MOGELIJKS EEN ROL SPEELT .....	38
5.3 HET <i>CRISPLD2</i> -GEN EN ZIJN ROL IN SCHISIS .....	38
5.4 OVERZICHT VAN DE LITERATUUR OMTRENT DE LINK TUSSEN <i>CRISPLD2</i> EN SCHISIS.....	39
6. DISCUSSIE.....	42
7. CONCLUSIE .....	45
8. REFERENTIELIJSTEN.....	46
8.1 ARTIKELS.....	46
8.2 BOEKEN.....	50
8.3 INTERNET BRONNEN .....	50
8.4 BROCHURES .....	52
8.5 AFBEELDINGEN .....	52

## AFKORTINGEN

- 3'-UTR: *Three prime untranslated region*
- BPD: Bronchopulmonaire Dysplasie
- CAP: *Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and pathogenesis-related 1 Proteins*
- COPD: *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*
- CRISPLD2: *cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2 gene*
- DNA: Desoxyribonucleïnezuur
- GAG: Glycosaminoglycanen
- GS: Gehemeltespleet
- GWA: *Genome-Wide Association*
- HRQoL: *Health Related Quality of Life* = Gezondheidsgerelateerde kwaliteit van het leven
- LGL1: *Late Gestation Lung 1*
- LPS: Lipopolysachariden
- LS(G): Lipspleet met of zonder gehemeltespleet
- MKA: Mond-, kaak- en aangezichtschirurgie
- NKO: Neus-, keel- en oorziekten
- SNP: *Single-Nucleotide Polymorphism*
- SNV: *Single-Nucleotide Variant*
- STR: *Short Tandem Repeat*
- z.j.: zonder jaar



## SAMENVATTING

Schisis is een ernstige congenitale aandoening met belangrijke gevolgen voor de ontwikkeling van het kind en zijn omgeving. Het heeft een wereldwijde prevalentie van 1 op 700 geboortes. Het niet fuseren van faciale structuren tijdens de embryonale ontwikkeling staat aan de basis van schisis. In de complexe etiologie spelen genen, omgevingsfactoren en teratogenen een rol. Moderne onderzoeksmethoden zoals *whole exome/genome sequencing* en associatiestudies maken het mogelijk kandidaat genen op te sporen. Vervolgens kunnen ze functioneel bevestigd worden aan de hand van onder andere genexpressie studies en dierexperimenteel onderzoek. Op deze manier werd het *CRISPLD2*-gen als kandidaat gen voorgesteld door Chiquet et al. (2007). Het codeert voor een gesecreteerd glucocorticoïd eiwit dat deel uitmaakt van de CAP Superfamilie. Het zou een functie hebben in de long- en nierontwikkeling, het aangeboren immuunsysteem en de craniofaciale ontwikkeling. Eveneens speelt het een belangrijke rol in mesenchymale-epitheliale interacties en in neurale lijst cel overleving, migratie en differentiatie. Deze beide processen zijn noodzakelijk voor de craniofaciale ontwikkeling. Tot op heden werd associatie met schisis gevonden in de Noord- en Noordwest Chinese, Braziliaanse, Turkse, Kaukasische en Latijns-Amerikaanse populatie.

Orofacial clefts are a severe congenital disorder with important consequences for the development of the child and his environment. It has a worldwide prevalence of 1 in 700 births. The non-fusion of facial structures during embryonic development is the basis for orofacial clefts. Genes, environmental factors and teratogens play a role in the complex etiology. Modern research methods such as whole exome / genome sequencing and association studies make it possible to discover candidate genes. These can then be functionally confirmed e.g. with gene expression studies and experimental animal research. In this way, the *CRISPLD2*-gene was presented as a candidate gene by Chiquet et al. (2007). It encodes a secreted glucocorticoid protein that is part of the CAP Superfamily. It has been shown to have a function in lung and kidney development, the innate immune system and craniofacial development. It also plays an important role in mesenchymal-epithelial interactions and in neural crest cell survival, migration and differentiation. Both these processes are necessary for craniofacial development. As of present, association of the *CRISPLD2*-gene with orofacial clefts was found in the North and North-West Chinese, Brazilian, Turkish, Caucasian and Hispanic populations.

# **1. INLEIDING**

Schisis is een veelvoorkomende orofaciale aandoening met belangrijke gevolgen op fysisch, psychologisch en socio-economisch vlak voor zowel patiënten als hun omgeving. Voor een optimale preventie en behandeling van deze aandoening wordt ernaar gestreefd de complexe etiologie te begrijpen. Moderne onderzoekstechnieken maken het mogelijk de onderliggende genetische factoren van deze aandoening te identificeren en te onderzoeken. Het *CRISPLD2*-gen werd als mogelijk kandidaat gen voor schisis gepubliceerd door Chiquet et al. (2007). Over dit gen bestaat tot op heden een beperkte kennis, maar er wordt meer en meer onderzoek naar uitgevoerd. Om op termijn de oorzakelijke rol van het *CRISPLD2*-gen in schisis te achterhalen en hiermee de huidige preventie en behandelingen te verbeteren, door onder andere aan precisie geneeskunde te doen, tracht deze Masterthesis de lezer een overzicht te geven van de bestaande kennis van het *CRISPLD2*-gen.

## **1.1 OBJECTIEVEN**

Recent werd variatie in het *CRISPLD2*-gen geassocieerd met het voorkomen van orofaciale schisis in een familie met verschillende aangedane individuen (niet-gepubliceerd). Met deze literatuurstudie wordt gepeild naar de huidige stand van zaken met betrekking tot de kennis over de rol van het *CRISPLD2*-gen bij het ontstaan van schisis. Hiervoor zal eerst de fenotypische variatie en epidemiologie van schisis worden belicht. Vervolgens worden recente methoden van genetisch en genomisch onderzoek uiteengezet. Tenslotte zal de reeds gekende literatuur over de rol van het *CRISPLD2*-gen besproken worden. Indien de tijd het zou toegelaten hebben zou nog getoetst zijn of er in de coderende sequentiedata van het *CRISPLD2*-gen in een groot cohort van schisispatiënten veranderingen worden aangetroffen die niet voorkomen in populatiecontroles.

## **1.2 MATERIAAL EN METHODE**

Voor het opzoeken van literatuur over het *CRISPLD2*-gen werden de databanken PubMed en Embase doorzocht. Een lijst van trefwoorden werd systematisch overlopen. Vervolgens werden deze trefwoorden in paren opgezocht en telkens ingegeven met “AND/OR”. Uit de PubMed database werden 41 artikels gevonden, voor de Embase database waren het er 25. Al deze artikels werden samengevoegd en de duplicaten werden verwijderd, waardoor 32 artikels overbleven. Na het toepassen van de inclusie- en exclusiecriteria bleven er nog 23 artikels over. De inclusiecriteria waren “artikels gaande over het *CRISPLD2*-gen of eiwit” en

“klinische studies, reviews, systematische reviews en meta-analyses waarin *CRISPLD2* voorkomt”. De exclusiecriteria waren “artikels die niet over het *CRISPLD2*-gen of eiwit handelden”(6 artikels), “het bespreken van andere CAP-familie eiwitten ”(2 artikels) en “studies waarbij het onduidelijk was welk SNP onderzocht werd en/of tot welk gen het behoorde” (1 artikel). Uiteindelijk werden effectief 21 artikels gebruikt bij het schrijven van de Masterthesis. De 2 geselecteerde, maar niet-gebruikte artikels handelden over andere aspecten van het *CRISPLD2*-gen waarbij bespreking ervan niet in het kader van deze Masterthesis paste. Eveneens werden op systematische wijze het web en kennisdatabases zoals Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] (2019), GeneCards (2018), UniProt (2019), Gene Ontology and GO Annotations [QuickGO] (2018), U.S. National Library of Medicine [NLM-NIH] (2019) en The Human Protein Atlas (2019) gebruikt. Alle overige geraadpleegde artikels, boeken en online informatie werd in aparte zoekopdrachten opgezocht in het kader van het verstrekken van achtergrond informatie voor het schrijven van deze Masterthesis. Op deze manier werd een bredere context geschetst rond schisis, onderzoeksmethoden en andere embryologische processen zoals longontwikkeling.

## **2. SCHISIS**

### **2.1 INLEIDING**

In dit hoofdstuk zal worden ingegaan op de epidemiologie en fenotypische variatie van schisis. Eveneens wordt kort het belang van onderzoek in dit domein besproken.

### **2.2 WAT IS SCHISIS?**

Schisis is een overkoepelende term voor lip-, kaak- en/of gehemelte spleten. De publiek meest gekende fenotypes van deze groep congenitale aandoeningen zijn de lipspleet met of zonder gehemeltespleet (LS(G)) en de gehemeltespleet (GS) (Shkoukani, Chen & Vong, 2013).

Schisis patiënten kunnen problemen ondervinden bij het eten, spreken en horen, wat sociale integratie bemoeilijkt. De behandeling vergt een multidisciplinaire aanpak middels plastische, MKA en/of NKO chirurgie, diverse tandheelkundige behandelingen (zoals orthodontie, restauratieve) en logopedische therapie. Evenzeer zullen eventuele psychologische en socio-economische problemen voor patiënt en familie aangepakt moeten worden. Hiervoor worden schisispatiënten vanaf de geboorte tot en met volwassen leeftijd opgevolgd door een multidisciplinair schisisteam (Dixon et al., 2011; UZ Leuven [1], 2018).

#### **2.2.1 Prevalentie**

Schisis komt wereldwijd gemiddeld voor bij 1 op de 700 geboortes (Mossey & Castilla, 2001). Algemeen hebben de Aziatische en Amerindiaanse populatie de hoogste prevalentie, namelijk 1 op 500 geboortes. Daartegenover staat de Afrikaanse populatie met de laagste prevalentie van 1 op 2500 geboortes. De Europese populatie heeft een intermediaire prevalentie van 1 op 1000 geboortes (Dixon et al., 2011; Mossey & Castilla, 2001).

Volgens een onderzoek van Mossey & Castilla (2001) is de wereldwijde prevalentie van geïsoleerde GS 5 op 10 000 geboortes. Echter is er variatie tussen verschillende populaties, waarbij Canada en Finland de hoogste cijfers hebben en Cuba, Colombia en Zuid-Afrika de laagste. Daartegenover worden wereldwijd 7.9 op de 10 000 baby's geboren met LS(G). Eveneens variëren de waarden tussen populaties. Japan, China en Zuid-Amerika hebben de hoogste cijfers en Israël, Zuid-Afrika en Zuid-Europa de laagste.

### **2.2.2 Etiologie**

De etiologie van niet-syndromale schisis omvat zowel genetische factoren als omgevingsfactoren en/of teratogenen tijdens de embryonale aangezichtsontwikkeling (Böhmer et al., 2018; Shkoukani, Chen & Vong, 2013; Murray & Schutte, 2004).

#### **2.2.2.1 Het genetisch aspect**

Een aantal genen die aanleiding geven tot syndromale vormen van schisis, waarbij de spleet samen voorkomt met andere anomalieën, zijn reeds gekend. Het gaat hier meestal om monogene overerving. Het meest bekende voorbeeld is het Van der Woude syndroom, met *IRF6* als oorzakelijk gen (Dixon et al., 2011). Algemeen is 30% van schisis syndromaal en 70% niet-syndromaal (Mossey & Castilla, 2001). Niet-syndromale schisis kan zowel van monogene als van complexe multifactoriële oorsprong zijn. Zo vonden Cox et al. (2018) in hun studie van 72 multiplex families mutaties in vijf genen (*CTNND1*, *PLEKHA7*, *PLEKHA5*, *ESRP2* en *CDH1*) die een monogene, autosomaal dominante Mendeliaanse overerving vertonen van het schisisfenotype.

#### **2.2.2.2 Omgevingsfactoren**

Het identificeren van omgevingsfactoren en hun interactie met genen is een belangrijk domein in het verdere oorzakelijk onderzoek naar schisis (Dixon et al., 2011). Zo verhoogt roken van de moeder het risico op schisis met 30%. Echter zijn de onderliggende mechanismen nog niet volledig bekend (Dixon et al., 2011; Lie et al., 2008; Little, Cardy & Munger, 2004; Sabbagh et al., 2015). Eveneens is bewezen dat passief roken een verhoogd risico inhoudt op het ontwikkelen van schisis bij het kind (Sabbagh et al., 2015). Alcoholconsumptie tijdens de zwangerschap is geen bewezen risicofactor voor schisis. Echter vinden roken en alcoholgebruik vaak gelijktijdig plaats en is verder onderzoek nodig om het effect van beiden apart te evalueren (Dixon et al., 2011; Little, Cardy & Munger, 2004; Shkoukani, Chen & Vong, 2013). Eveneens verhoogt het risico op schisis bij het kind bij een leeftijd hoger of gelijk aan 40 jaar bij één of beide ouders. Een mogelijke verklaring is de cumulatieve veranderingen in de gameten doorheen de jaren (Herkrath et al., 2012; Shkoukani, Chen & Vong, 2013).

Twee recente meta-analyses van Millacura et al. (2017) en Jahanbin et al. (2018) concludeerden eveneens dat foliumzuur supplementen tijdens de zwangerschap het risico op niet-syndromale LS(G) verlaagt.

### 2.2.2.3 Teratogenen en andere factoren

Valproïnezuur, fenytoïne en pesticiden worden gezien als potentiële teratogenen verantwoordelijk voor schisis (Jackson et al., 2015; Murray & Schutte, 2004; Shkoukani, Chen & Vong, 2013). Andere mogelijke risicofactoren zijn hyperthermie, obesitas, stress, ioniserende straling en infecties bij de moeder (Dixon et al., 2011; Murray & Schutte, 2004; Shkoukani, Chen & Vong, 2013).

## 2.3 DE CLASSIFICATIE VAN SCHISIS

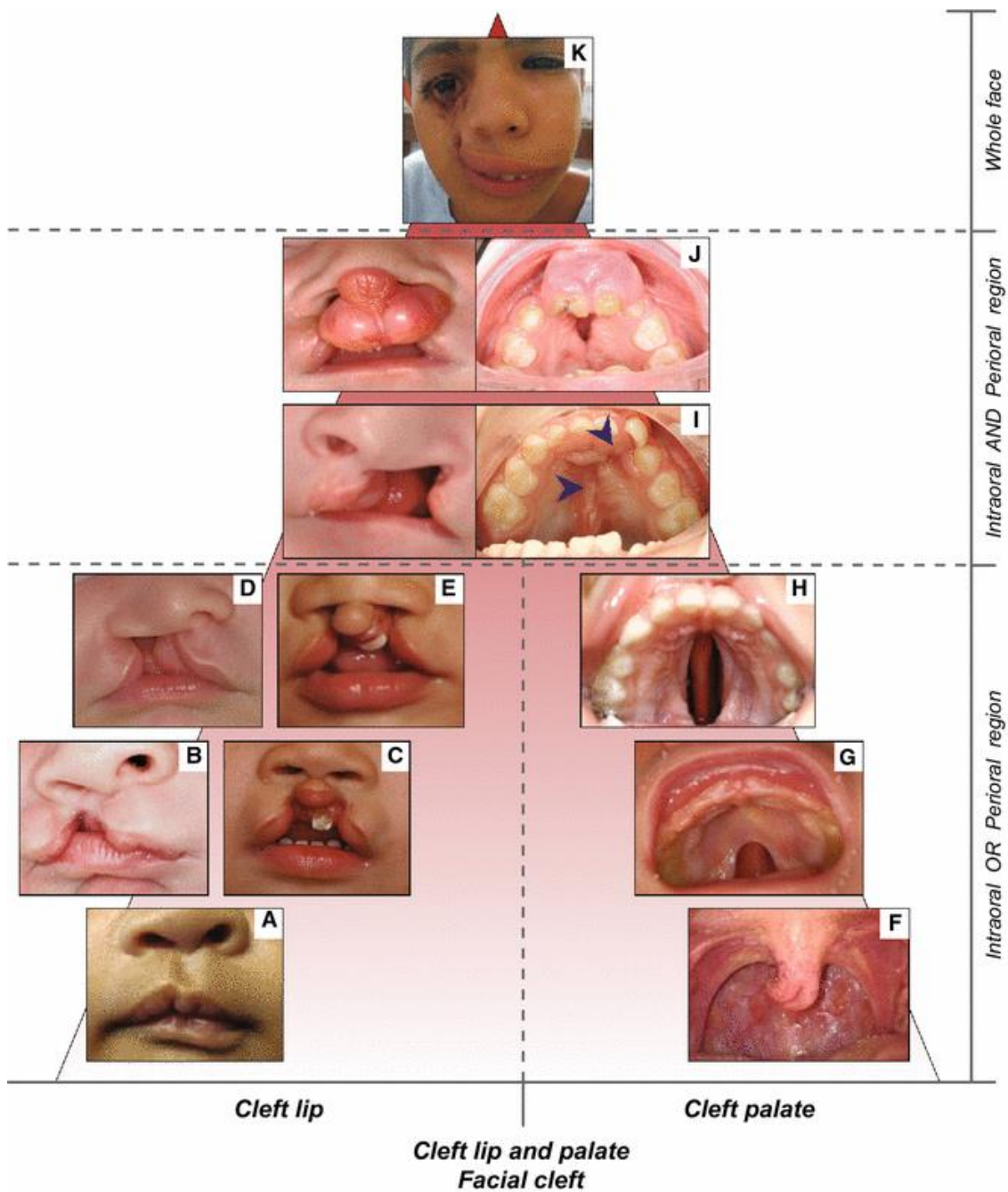
### **2.3.1 Classificatie op basis van het fenotype**

Schisis wordt onderverdeeld op basis van het fenotype. Hierbij wordt aandacht besteed aan de anatomische positie en de uitgebreidheid van de spleet (Phan et al., 2016). Algemeen stelt men dat een accurate classificatie cruciaal is om de epidemiologie en etiologie van een congenitale aandoening te begrijpen. Wanneer deze classificatie wordt herleid tot het simplistisch wel of niet aanwezig zijn van de aandoening, leidt dit tot het verlies van belangrijke informatie (Dixon et al., 2011).

#### 2.3.1.1 Subklinisch fenotype

Onder subklinische fenotypes of microvormen worden lip-/ tandanomalieën en abnormale faciale afmetingen verstaan (Dixon et al., 2011; Shkoukani, Chen & Vong, 2013). Defecten van de *orbicularis oris* spier in afwezigheid van een spleet zijn tot nu toe het best onderzocht aan de hand van echografie (Smarius et al., 2017; Shkoukani, Chen & Vong, 2013).

Voorbeelden van subklinische fenotypes van palatumspleten zijn een bifiede uvula (**Figuur 2.1 (F)**) en een submucosale gehemeltespleet (Dixon et al., 2011).



**Figuur 2.1** Classificatie schisis op basis van het fenotype (figuur overgenomen uit Phan et al. (2016) met toestemming voor uitsluitend gebruik in Master thesis van Carels CEL)

(A) Microvorm lipspleet; (B) Incomplete unilaterale lipspleet; (C) Incomplete bilaterale lipspleet; (D) Complete unilaterale lipspleet; (E) Complete bilaterale lipspleet; (F) Bifide uvula; (G) zachte verhemelte spleet; (H) Zachte en harde verhemelte spleet; (I) Unilaterale lipspleet met alveolaire kam- en palatumspleet; (J) Bilaterale lipspleet met alveolaire kam- en palatumspleet; (K) Faciale spleet

### **2.3.2 Fenotypes**

De drie grote schisis-fenotypes (**Figuur 2.1**) zijn de lipspleet, de palatumspleet en de lipspleet met of zonder gehemeltespleet (Phan et al., 2016).

#### **2.3.2.1 De lipspleet**

Lipspletten zijn spleten die zich beperken tot de bovenlip met een onderbreking van de *orbicularis oris* spier (**Figuur 2.1 (A, B, C, D en E)**). De ernst van de aandoening varieert tussen een microvorm, een incomplete of complete uni- of bilaterale lipspleet (Phan et al., 2016). Een complete lipspleet duidt op het feit dat de volledige hoogte van de lip gespleten is. Een incomplete lip daarentegen wordt nog door een kleine hoeveelheid weefsel verbonden. Dit is onder andere het geval bij een zogenaamde bandje van Simonart (Shkougani, Chen & Vong, 2013).

Een unilaterale lipspleet (**Figuur 2.2**) gaat gepaard met misvormingen van het gelaat veroorzaakt door asymmetrische krachten op de groeiende premaxilla (Shkougani, Chen & Vong, 2013). Hierdoor ontstaat een distorsie van het lippenrood en verdwijnt het philtrum. De neusmisvorming wordt veroorzaakt door een laterale, dorsale en caudale verplaatsing van het ipsilaterale *crus laterale* van het *cartilago alaris major*. Bijgevolg is de top van de neus afgevlakt en buigt hij weg van de spleet. Eveneens kunnen de neuskraakbeenderen misvormingen vertonen (Shkougani, Chen & Vong, 2013; Walker, Podda & StatPearls, 2018).

Bij de bilaterale lipspleet (**Figuur 2.3**) daarentegen groeit de premaxilla onafhankelijk van de maxilla. Een afgevlakte neus en verlies van het philtrum zijn typische kenmerken (Shkougani, Chen & Vong, 2013).



**Figuur 2.2** Unilaterale lipspletten (Figuur overgenomen uit Shkougani, Chen & Vong (2013), open-access artikel)

- (A) Microvorm (B) Incomplete lipspleet  
(C) Complete lipspleet



### 2.3.2.2 De palatumspleet

Een palatumspleet is een spleet in het anterieure harde gehemelte en/of het posterieure zachte gehemelte (**Figuur 2.1 (F, G en H)**). De ernst varieert tussen een bifide uvula, een spleet van het zachte verhemelte en een spleet



**Figuur 2.3 Bilaterale lipspeten** (Figuur overgenomen uit Shkougani, Chen & Vong (2013), open-access artikel)

(A) Incomplete lippleet (B) Complete lippleet

van het harde en zachte verhemelte (Phan et al., 2016). GS heeft een 50% hoger risico om syndroomaal voor te komen (Mossey & Castilla, 2001).

### 2.3.2.3 De lippleet met of zonder gehemeltespleet

De LS(G) is een combinatie van de reeds beschreven fenotypes (**Figuur 2.1 (I en J)**). Ze worden onderverdeeld in enerzijds de incomplete LS(G) waarbij de bovenlip, de alveolaire kam en een deel van het harde gehemelte betrokken zijn. Anderzijds een complete LS(G) waarbij de spleet loopt van de lip, inclusief de neusvleugel en -bodem, het primaire gehemelte en het harde gehemelte tot de huid (Phan et al., 2016).

### 2.3.3 Verschillende aandoeningen?

Ondanks gelijkaardige kenmerken wordt verondersteld dat de lippleet, de palatumspleet en de LS(G) verschillende aandoeningen zijn. Voor elke fenotype vindt het niet fuseren plaats tijdens verschillende stadia van de embryologische ontwikkeling (Phan et al., 2016). Eveneens hebben ze elk hun eigen epidemiologie en genetische eigenschappen (Shkougani, Chen & Vong, 2013). De algemene observatie dat de palatumspleet en LS(G) niet in eenzelfde familie voorkomen versterkt deze stelling (Dixon et al., 2011).

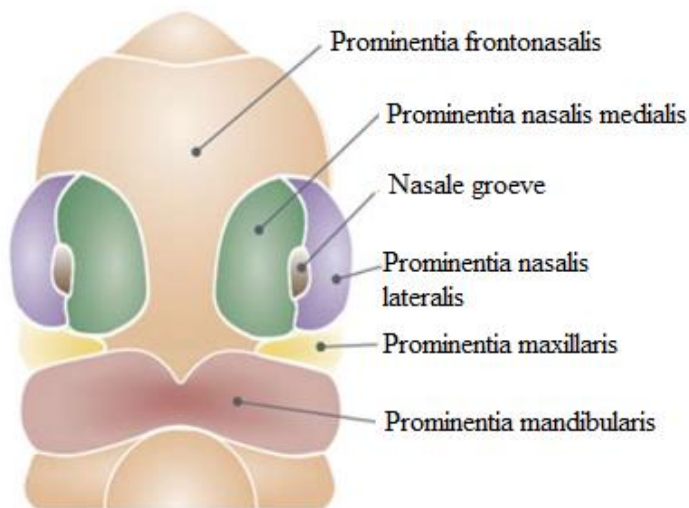
## 2.4 HET ONTSTAAN VAN SCHISIS

Schisis ontstaat door het niet fuseren van faciale structuren tijdens de embryonale ontwikkeling. Kennis van deze ontwikkeling is hierbij dus onontbeerlijk (Smarius et al., 2017).

### 2.4.1 Ontwikkeling aangezicht

Algemeen ontwikkelt de basis morfologie van het aangezicht zich tussen de 4<sup>de</sup> en 10<sup>de</sup> week na conceptie door de ontwikkeling van vijf *prominentiae* (**Figuur 2.4**), namelijk de *prominentia frontonasalis*, twee *prominentiae maxillares* en twee *prominentiae mandibulares* (Schoenwolf et al. [1], 2009). Deze ontstaan uit neurale lijstcellen, gemigreerd uit de eerste kieuwboog (Shkoukani, Chen & Vong, 2013; Smarius et al., 2017).

Tegen het einde van de vierde week zijn deze verhevenheden gevormd en omringen ze het stomodeum (Schoenwolf et al. [1], 2009). Tijdens de vijfde week ontstaan twee *placoda nasalis* op de *prominentia frontonasalis*. Deze placodes invagineren en vormen nasale groeven. Ze verdelen eveneens de *prominentia frontonasalis* in twee *prominentiae nasalis medialis* en *lateralis* (**Figuur 2.4**).



**Figuur 2.4** Embryo 5de week na conceptie (Figuur overgenomen uit Smarius et al. (2017), open-access artikel)

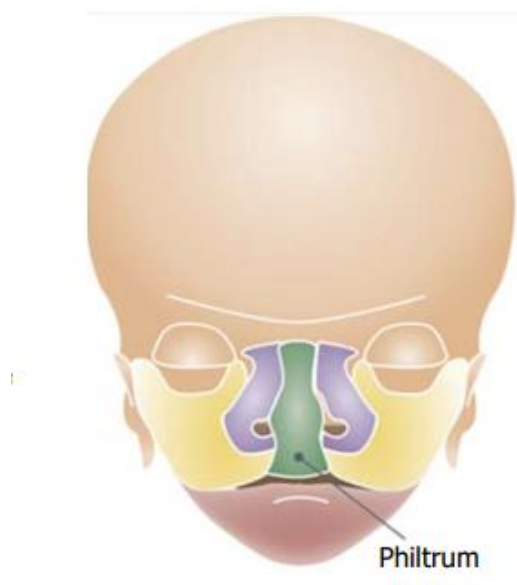
Tijdens de zesde week fuseren de twee *prominentiae nasalis medialis* en vormen de *processus intermaxillaris* (**Figuur 2.5**) (Smarius et al., 2017). Deze vormt de middellijn van de neus en de premaxilla, waaronder het voorste deel van de bovenlip met het philtrum, de maxillaire alveolaire kam met vier snijtanden en het primaire gehemelte. Eveneens tijdens de zesde week is er een ventrale

groei van de *prominentiae maxillaris* en fuseren ze met de *prominentiae nasalis medialis*. Zo wordt de rest van de bovenlip, de maxilla en het secundair palatum gevormd. Daartegenover vormen de *prominentiae mandibularis* samen de mandibula en onderlip (Shkoukani, Chen & Vong, 2013; Smarius et al., 2017). Tijdens de tweede maand fuseren de *prominentiae maxillares* en *prominentiae mandibulares* met elkaar (**Figuur 2.6**), waardoor de orale caviteit zijn finale breedte bereikt (Schoenwolf et al. [1], 2009; Smarius et al., 2017).

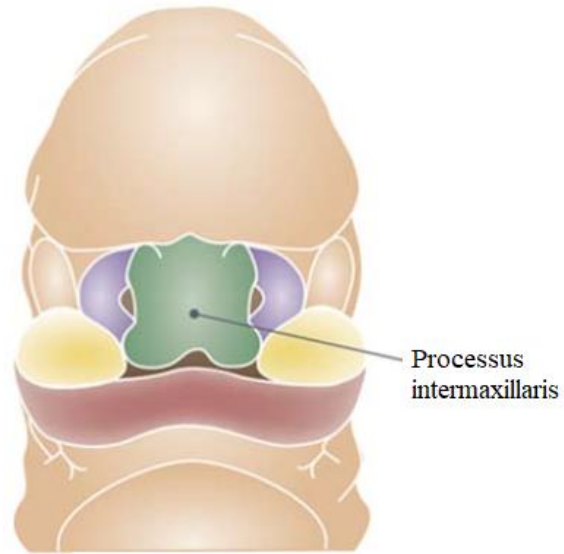
### 2.4.1.1 Ontstaan palatumspleten

Het palatum is volledig afgevormd in de 12<sup>de</sup> week na conceptie en bestaat uit twee delen, namelijk het primaire en het secundaire gehemelte (Smarius et al., 2017). Na de ontwikkeling van het primaire gehemelte in de 7<sup>de</sup> week bestaat er een vrije doorgang tussen de nasale en orale caviteit (Schoenwolf et al. [1], 2009). De scheiding zal pas ontstaan tijdens de 7<sup>de</sup> en 8<sup>ste</sup> week na de ontwikkeling van de *processus palatini*, fijne uitstulpingen van de *prominentiae maxillaris* (**Figuur 2.7**).

Aanvankelijk groeien deze *processus palatini* naar caudaal, dus verticaal naast de zijkanten van de tong. Echter op het einde van de 7<sup>de</sup> week roteren ze in een horizontale positie nadat de tong is ingedaald door de caudale en ventrale groei van de mandibula (Smarius et al., 2017). Ze fuseren dan met het primaire gehemelte en vervolgens met elkaar. Op deze manier vormen ze het secundair gehemelte. Op de plaats waar het primair en secundair palatum fuseren ontstaat het *foramen incisivum* (**Figuur 2.8**) (Schoenwolf et al. [1], 2009). De fusie van de



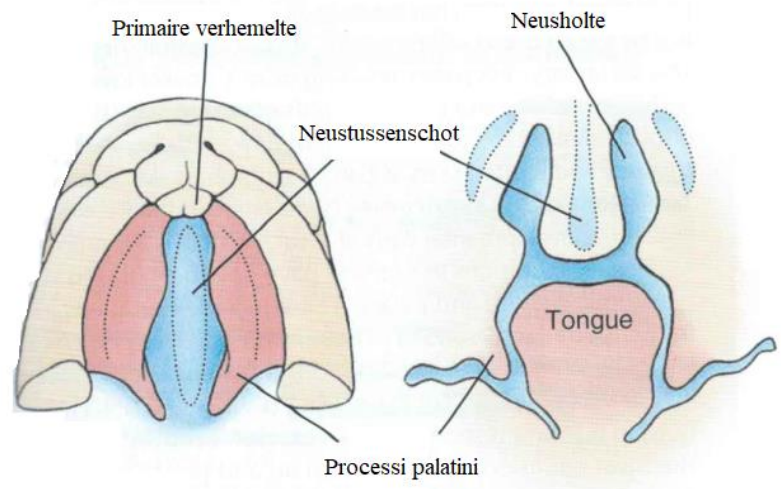
**Figuur 2.6** 2de maand na conceptie (Figuur overgenomen uit Smarius et al. (2017), open-access artikel)



**Figuur 2.5** 6de week na conceptie (Figuur overgenomen uit Smarius et al. (2017), open-access artikel)

*processus palatini* start vlak achter het foramen en sluit progressief in dorsale richting. Het niet fuseren van de *prominentiae maxillares* met elkaar is één van de oorzaken van een palatumspleet. Een andere oorzaak is te vinden in de hypoplastische groei van de mandibula. Hierdoor zal de tong niet inzakken en blijft het tussen de twee *processus palatini* zitten die bijgevolg verhinderd worden in hun fusie (Schoenwolf et al. [1], 2009; Smarius et al., 2017). Door de dorsale sluitrichting van het palatum is enkel

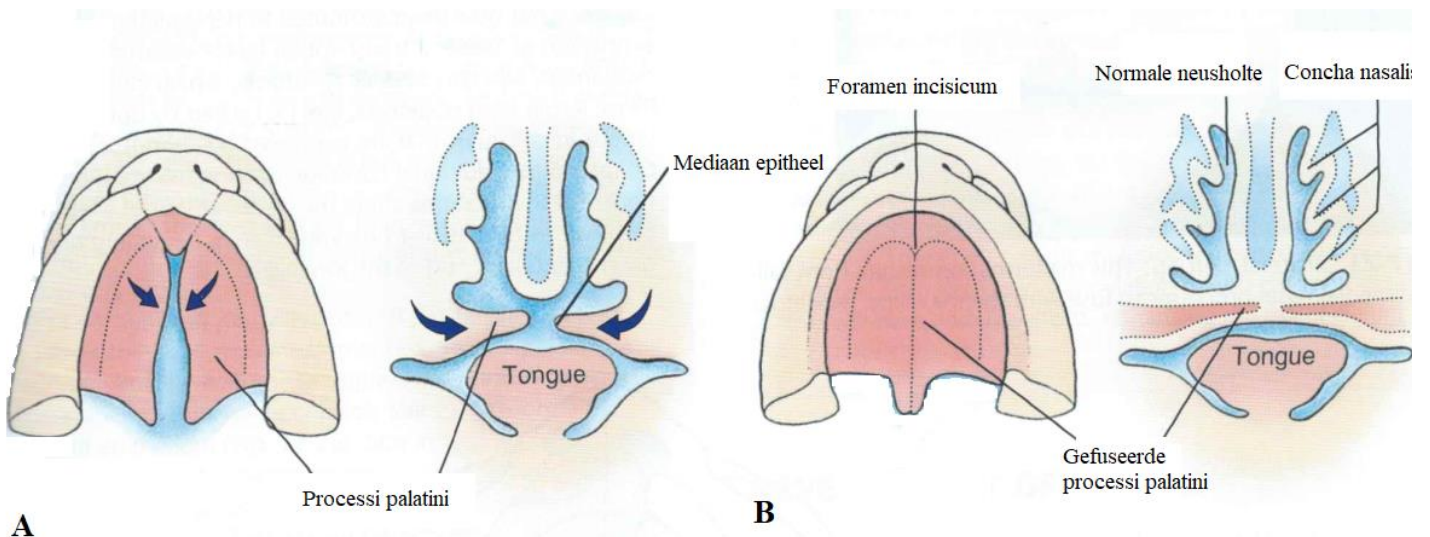
een spleet in het harde gehemelte niet mogelijk. Wanneer het initiële fusieproces verstoord wordt, zal verdere fusie niet plaatsvinden. Op diagnostisch vlak impliceert dit dat de aanwezigheid van een intact zacht gehemelte samengaat met een intact hard gehemelte (Smarius et al., 2017). Wel kan een defect in de intramembraneuze ossificatie van het harde gehemelte aanleiding geven tot een submucosale GS enkel in het harde verhemelte (Schoenwolf et al. [1], 2009).



**Figuur 2.7 Ontwikkeling palatum 7de week** (Figuur overgenomen van Schoenwolf et al. (2009). Aanvraag gestuurd naar ELSEVIER op 10 februari 2019, tot op heden geen antwoord)

#### 2.4.1.2 Ontstaan lipspleten

Lipspleten worden veroorzaakt door een falen van de fusie tussen de *prominentiae nasales mediales* en *prominentiae maxillares* tijdens de zesde week (**Figuur 2.4**). Deze fusie start



**Figuur 2.8 Ontwikkeling palatum** (Figuur overgenomen van Schoenwolf et al. (2009). Aanvraag gestuurd naar ELSEVIER op 10 februari 2019, tot op heden geen antwoord)

(A) 7 weken na conceptie (B) 10 weken na conceptie

craniaal en sluit naar caudaal (Smarius et al., 2017). De ontwikkeling van lip en palatum vindt plaats in opeenvolgende fases. Dit verklaart waarom spleten van de lip, alveolaire kam en palatum geassocieerd kunnen voorkomen. De periode juist voor de vorming van de premaxilla is een zeer kritische periode. De *prominentiae nasales mediales* ondergaan een belangrijke mitotische groei en zijn bijgevolg zeer gevoelig voor genetische en teratogene invloeden (Shkoukani, Chen & Vong, 2013).

## 2.5 HET BELANG VAN SCHISIS ONDERZOEK

### 2.5.1 Gevolgen van schisis

#### 2.5.1.1 Algemene gevolgen

Bij een uni- of bilaterale LS(G) en GS kan een adequate zuigfunctie niet bereikt worden tijdens borst- of flesvoeding. Hierdoor zal het kind minder drinken, sneller moe worden en veel lucht opnemen. Een ander gevolg van schisis is de vochttopstapeling in het middenoor. De gegenereerde krachten van de gespleten palatumspieren zijn te zwak om de buis van Eustachius te openen. Hierdoor neemt de gehoorfunctie van het kind af, wat op jonge leeftijd leidt tot een vertraging van de ontwikkeling van spraak en taal. Afhankelijk van de soort en grootte van de spleet kunnen er ook articulatieproblemen, hypernasaliteit of resonantieproblemen zijn (UZ Leuven [2]&[3], 2018).

Algemeen stelt de meta-analyse van Queiroz Herkrath et al. (2015) dat schisis de gezondheid gerelateerde kwaliteit van leven (Health Related quality of Life (HRQoL)) negatief beïnvloedt bij volwassenen. De psychologische gezondheid is het meest verstoorde aspect van de HRQoL voor kinderen en volwassenen met schisis. Eveneens werd gesteld dat volwassenen een hoger risico lopen op gedragsproblemen, ontevredenheid over hun aangezicht en problemen in hun sociale interacties.

### 2.5.2 Belang van onderzoek

Ondanks de lage mortaliteit heeft schisis belangrijke gevolgen voor de ontwikkeling en het welzijn van de patiënt. Daarenboven komt deze aandoening frequent voor, heeft ze een hoge socio-economische kost alsook een niet te onderschatten impact op de gezondheid gerelateerde levenskwaliteit. Een adequate behandeling is in onze maatschappij dus onontbeerlijk.

Onderzoek geeft inzicht in de onderliggende mechanismen en genetische factoren die tot op

heden onvoldoende gekend zijn. Deze kennis kan uitzichten bieden voor de preventie en behandeling van schisis (Dixon et al., 2011).

### **3. GENETISCH ONDERZOEK VAN *CRISPLD2* IN SCHISIS**

#### **3.1 INLEIDING**

In dit hoofdstuk zal het belang van genetisch onderzoek belicht worden. Eveneens zullen kort de huidige onderzoeksmethoden, onder andere in het *CRISPLD2*-onderzoek, besproken worden.

#### **3.2 WAAROM IS GENETISCH ONDERZOEK VAN BELANG?**

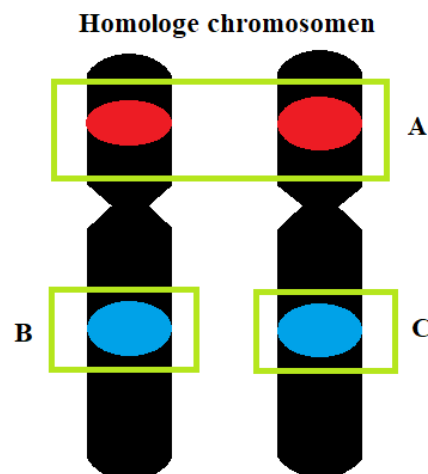
Een goede kennis van de genetische risicofactoren en van oorzakelijke gen varianten van een aandoening kunnen in de toekomst bijdragen tot de diagnose, de preventie en de behandeling ervan. In het geval van schisis zal door de klinische geneticus onderzocht worden of de patiënt lijdt aan een syndromale- dan wel niet-syndromale vorm. Wanneer schisis in het kader van een syndroom wordt gediagnosticeerd, moet er ook aandacht besteed worden aan de andere medische problemen. In de meeste gevallen worden syndromen primair gediagnosticeerd op basis van hun klinische kenmerken. Echter, soms kan een genetische test, bij vermoeden van een oorzakelijke genetische afwijking, uitsluitsel bieden over de diagnose (Yoon, Pham & Dipple, 2016).

#### **3.3 ONDERZOEKSMETHODES**

##### **3.3.1 Basisprincipes van genetica**

De polynucleotide desoxyribonucleïnezuur, afgekort DNA, is de drager van erfelijke informatie. Een nucleotide bestaat uit een suikermolecule, desoxyribose genoemd, een fosfaatgroep en een van de vier mogelijke basen, namelijk adenine, guanine, thymine of cytosine (D'Haeninck et al., 2009; Glasser, 2008).

Een gen omvat twee allelen (**Figuur 3.1**) (D'Haeninck et al., 2009). Het genotype zijn de genen die verantwoordelijk zijn voor een bepaald kenmerk, terwijl het fenotype het waarneembare kenmerk is (D'Haeninck et al., 2009).



**Figuur 3.1** Schema chromosomen  
(A) Het gen voor eigenschap X  
(B) Het allel voor eigenschap Y van de vader  
(C) Het allel voor eigenschap Y van de moeder



Een polymorfisme is een variatie in de DNA-sequentie die in minimum 1% van de populatie terug te vinden is. Daartegenover staat een mutatie, zowel positief als negatief, die in minder dan 1% van de populatie voorkomt (Glasser, 2008).

### 3.3.2 Genetische merkers

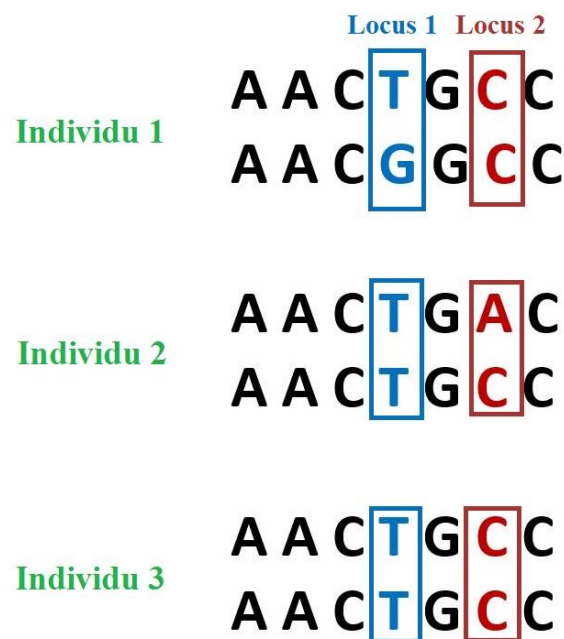
Genetische merkers zijn DNA-segmenten met een gekende locatie in het genoom en een herkenbare overerving (Glasser, 2008). Deze DNA-segmenten zijn eveneens onderhevig aan polymorfismen/ andere variaties/ mutaties. Op deze manier kunnen ze bijvoorbeeld tussen verschillende individuen vergeleken worden. De positie en het overervingspatroon van genen die zich in de buurt bevinden van een

bepaalde genetische merker kunnen op deze manier opgespoord worden (Encyclopaedia Britannica, 2019). Ze kunnen als referentiepunten gebruikt worden in genetische studies (Encyclopaedia Britannica, 2019; Glasser, 2008).

STR staat voor *Short Tandem Repeat*.

Hierbij wordt een sequentie van twee tot zeven basenparen telkens opnieuw en achtereenvolgend herhaald. Een voorbeeld is ACCGT ACCGT ACCGT enz. (Glasser, 2008). STR-polymorfisme bestaat erin dat het aantal herhalingen tussen individuen kan variëren (Encyclopaedia Britannica, 2019; Glasser, 2008). Ze komen verspreid voor in het menselijk genoom en hebben meestal een Mendeliaanse overerving (Glasser, 2008).

SNPs of *Single Nucleotide Polymorphisms* zijn variaties van één enkele nucleotide in het genoom (**Figuur 3.2**). Ze komen heel vaak voor in het menselijk genoom en worden veelvuldig ontdekt bij genetische studies (Glasser, 2008). Elke SNP heeft een unieke referentie SNP ID nummer en bestaat uit verschillende varianten (NLM-NIH [1], 2019).



**Figuur 3.2** Fictief SNP voorbeeld (figuur gebaseerd op informatie uit Glasser (2008))

- In locus 1:
  - individu 1 is TG heterozygoot
  - SNP rs9634819 (fictief) met allelen T > G
- In locus 2:
  - individu 2 is AC heterozygoot
  - SNP rs2571663 (fictief) met allelen C > A



### **3.3.3 Whole exome en genome sequencing**

Een eerste manier om genetische variaties te identificeren is via *DNA sequencing* (*sequencing*), waarvoor er twee methoden bestaan. Bij de eerste methode worden enkel de DNA onderdelen die instaan voor eiwitcodering, exonen genaamd, gesequenced. Deze techniek is dan ook gekend onder de naam *whole exome sequencing*. Echter kunnen DNA variaties buiten de exonen ook een invloed hebben op de gen activiteit en eiwit productie. Hiervoor kan de tweede techniek gebruikt worden, namelijk *whole genome sequencing*. Hierbij wordt de volgorde van alle nucleotiden over heel het DNA van een individu bepaald. Met deze twee technieken kunnen veel genetische variaties opgespoord worden. Echter is het op deze manier niet altijd gemakkelijk te bepalen in welke mate een variatie ook effectief een rol speelt in een bepaalde aandoening (NLM-NIH [2], 2019). Om dit uit te zoeken is gaandeweg een nieuwe discipline ontstaan, met name de bioinformatica, waarin principes uit de informatica, de statistiek en de biologie worden gecombineerd en meestal uitgevoerd door bioinformatici (ScienceDaily, 2019).

### **3.3.4 De locus van het oorzakelijk gen**

Om de locus van een oorzakelijk gen te bepalen kunnen twee methodes gebruikt worden, namelijk genetische koppelingsanalyse en associatiestudies (Glasser, 2008).

Aan de hand van de eerste methode wordt de locatie van een gen op een chromosoom geïdentificeerd. Deze statistische techniek berust op het principe dat genen op hetzelfde chromosoom, die fysiek in elkaars buurt liggen, een grotere kans hebben om samen overgeërfd te worden (Stefan, 1999). Tijdens genetische koppelingsanalyse wordt nagegaan of bepaalde genetische merkers, die doorgegeven worden in een familie, vaker voorkomen bij individuen met de aandoening dan bij de controle individuen uit de familie. Als dit het geval is, betekent dit dat de merker zich in de buurt van het causale gen bevindt (Glasser, 2008; Bender, 2000). Echter, kleiner wordende families en daardoor eveneens het klein aantal aangedane familieleden met eenzelfde aandoening, vormen een beperking voor het gebruik van de koppelingsanalyse (Bender, 2000).

De tweede methode is een recente techniek waarbij variaties (SNVs: SNPs en/of mutaties) in het genoom gezocht worden die vaker voorkomen bij een bepaalde aandoening, vergeleken met niet aangedane individuen (NLM-NIH [3], 2019). Associatiestudies kunnen op twee manieren toegepast worden. Bij de eerste manier wordt onderzocht of een reeds gekende SNP, die bijvoorbeeld een verandering in eiwitstructuur veroorzaakt, ook een link heeft met een

bepaalde aandoening. Bij de tweede manier wordt gezocht naar de causale mutatie, die in de buurt ligt van een reeds eerder gevonden merker (Glasser, 2008). Het voordeel van associatiestudies is dat de onderzoeker niet beperkt wordt in het aantal te onderzoeken casussen, aangezien ze niet familiaal moeten voorkomen (Bender, 2000). Associatie kan enerzijds toegepast worden op enkel kandidaat genen, of anderzijds op het hele genoom. Dit laatste wordt *genome-wide association* (GWA) genoemd (Glasser, 2008; Amos, Driscoll & Hoffman, 2011).

#### 3.3.4.1 Hoe werd het locus van het *CRISPLD2*-gen gevonden?

In 2000 voerden Prescott en collega's een GWA studie uit bij tweelingen met schisis. Hierop volgde een follow-up studie door Chiquet et al. (2007) waarbij 37 STRs in 47 multiplex LS(G) families nagekeken werden. Een multiplex familie is een familie waarbij meerdere individuen een bepaalde aandoening hebben (The Free Dictionary by Farlex, 2012). Op basis van deze resultaten werd de chromosomale locus 16q24.1 significant gelinkt aan schisis. Van de 35 aanwezige genen in de regio werden er twee verder onderzocht, namelijk *IRF8* en *CRISPLD2*. Hiervoor werden 18 *CRISPLD2* SNPs gegenotypeerd in multiplex *ouders-kind trio*'s van verschillende etniciteit (Chiquet et al., 2007). In een *ouders-kind trio* familie hebben beide ouders en minimum één kind eenzelfde aandoening (The Free Dictionary by Farlex, 2012). Onder andere de SNPs die significant waren in de studie van Chiquet et al. (2007) werden in latere studies als basis gebruikt voor verder functioneel onderzoek naar de mogelijke rol van het *CRISPLD2*-gen in het ontstaan van schisis.

### **3.3.5 Genexpressie studies en dierexperimenteel onderzoek**

Eenmaal een kandidaat gen geïdentificeerd is, kunnen genexpressie studies en dierexperimenteel onderzoek uitgevoerd worden om het causaal verband verder te begrijpen en te bewijzen (Glasser, 2008).

#### 3.3.5.1 Genexpressie studies

In genexpressie studies wordt de productie van het genproduct, zowel eiwit als mRNA, bestudeerd. Echter zal in het lichaam van een organisme een verandering in genexpressie een invloed hebben op een biologisch proces (Bioline Meridian Bioscience, 2019).

### 3.3.5.2 Dierexperimenteel onderzoek

Hoewel het menselijk embryo het enige perfecte organisme is om de ontwikkeling van de mens te bestuderen bestaan hiertegen vele ethische bezwaren en hindernissen, waardoor er meestal met diermodellen wordt gewerkt. Afhankelijk van het type diermodel zijn ze relatief makkelijk te verkrijgen, te gebruiken en te onderhouden in een laboratorium (Schoenwolf et al. [2], 2009).

Traditioneel worden vaak muizen gebruikt (Dixon et al., 2011). Voordelen zijn de snelle voortplanting en groei, alsook het feit dat het zoals de mens zoogdieren zijn. Eveneens kunnen transgene muizen gecreëerd worden aan de hand van homologe recombinatie. Het is hierdoor mogelijk om een muizen-gen te inactiveren (knock-out) of te vervangen (knock-in) door een ander gen (Schoenwolf et al. [2], 2009). Transgene muizen met schisis worden gecreëerd door kandidaat genen in te voegen. Eveneens kunnen ze gebruikt worden om omgevingsfactoren te onderzoeken (Bender, 2000). Een recente vooruitgang in dit domein is de ontdekking van de CRISPR/Cas9 technologie, een methode waarmee DNA gemodificeerd kan worden. Samen met een RNA streng, dat de sequentie van het doelwit DNA bevat, kan het selectief binden aan een bepaalde DNA sequentie. Met deze methode kan op een zeer precieze manier aan recombinatie gedaan worden (Doudna & Charpentier, 2014).

Ook worden zebrafissen als diermodellen gebruikt in onderzoek naar schisis. Een groot voordeel van zebrafis embryo's is dat ze doorzichtig zijn en zich snel ontwikkelen. Transgene zebrafissen kunnen bekomen worden door het gewenste DNA te injecteren in een vroeg delingsstadium van de blastomeren. Anderzijds kunnen de blastomeren ingespoten worden met morfolino's (gestabiliseerd antisense RNA) dat gericht genexpressie zal inactiveren (Schoenwolf et al. [2], 2009). In schisis onderzoek worden zebrafissen het meest gebruikt om de normale functie van kandidaat genen te onderzoeken door deze genen selectief te inactiveren. Een tweede toepassing is om te onderzoeken of een bepaalde genvariant schisis kan induceren, zoals in de studie van Yuan et al. (2012), die later nog besproken zal worden (Duncan et al., 2017).

## **4. HET CRISPLD2-GEN EN EIWIT**

### **4.1 INLEIDING**

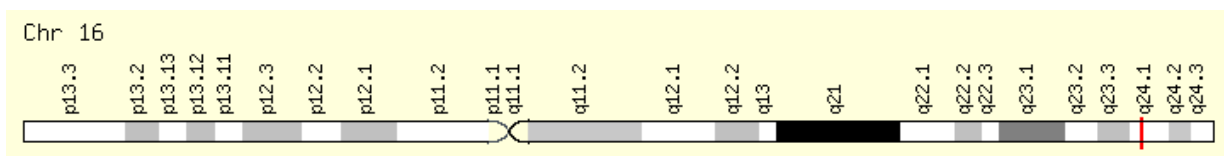
In dit hoofdstuk wordt uitgelegd wat het *CRISPLD2*-gen is en waar het zich lokaliseert in het genoom. Verder wordt besproken voor welk eiwit het gen codeert, wat zijn structuur is en waar het tot expressie komt.

### **4.2 WAT IS HET CRISPLD2-GEN?**

*CRISPLD2* is een humaan eiwit coderend gen en de afkorting staat voor *cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2 gene* (GeneCards, 2018; OMIM, 2019). Vaak voorkomende synoniemen zijn *Late Gestation Lung 1 (LGL1)*, *CRISP11* en *LCRISP2* (GeneCards, 2018; HUGO Gene Nomenclature Committee [HGNC], 2018; NLM-NIH [4], 2019).

#### **4.2.1 Lokalisatie in het genoom**

Het humaan *CRISPLD2*-gen heeft een cytogenetische locatie 16q24.1 (GeneCards, 2018). Het gen bevindt zich dus op de lange arm van chromosoom 16, op locatie 24.1 na kleuring (**Figuur 4.1**).



**Figuur 4.1** Lokalisatie *CRISPLD2*-gen op chromosoom 16 (figuur overgenomen van GeneCards (2018), open-access database)

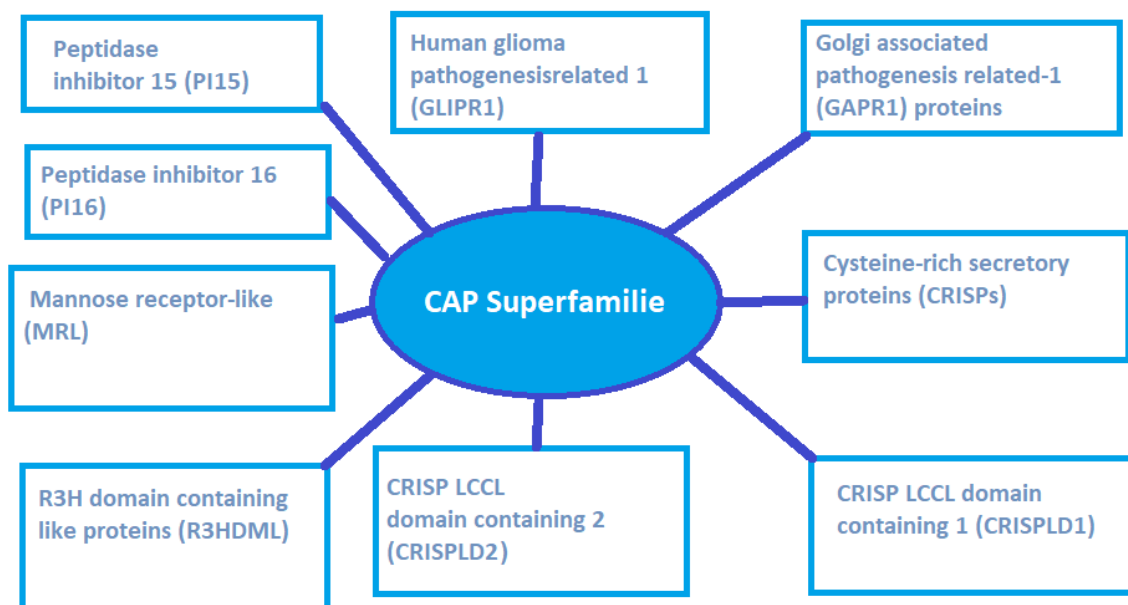
### **4.3 HET CRISPLD2-EIWIT**

Het *CRISPLD2*-gen codeert bij de mens voor het *Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2* eiwit. Het maakt deel uit van de CAP Superfamilie (GeneCards, 2018; HGNC, 2018).

#### **4.3.1 De CAP superfamilie**

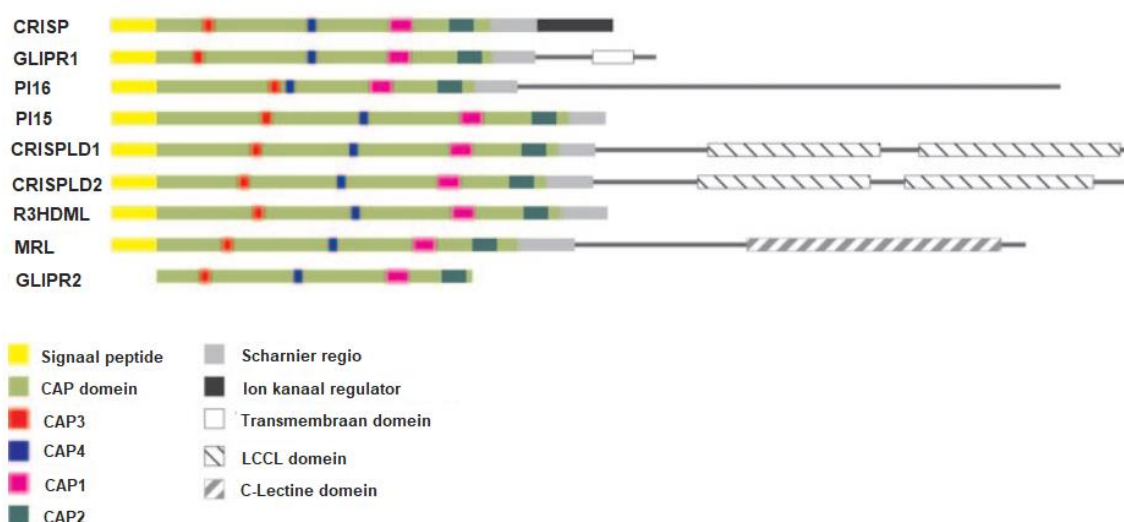
De CAP Superfamilie staat voor *cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins* (GeneCards, 2018). Deze eiwitten komen voor bij een groot aantal organismen en worden meestal extracellulair gesecreteerd. De CAP Superfamilie wordt

onderverdeeld in 9 subfamilies. Deze zijn de GLIPR1-, GAPR1-, PI15-, PI16-, CRISPs-, CRISPLD1- en CRISPLD2-, MRL en de R3HDML proteïnen (**Figuur 4.2**) (HGNC, 2018; Gibbs, Roelants & O'Bryan, 2008).



**Figuur 4.2** De CAP Superfamilie en zijn negen subfamilies (eigen figuur gebaseerd op informatie uit (Gibbs, Roelants & O'Bryan, 2008))

De CAP Superfamilie wordt gekarakteriseerd door vier terugkomende signatuur sequenties, namelijk CAP1, CAP2, CAP3 en CAP4. Deze CAP-motieven komen voor in een 17- tot 21-kilodalton domein, dat het CAP-domein genoemd wordt. Sommige eiwitten bezitten naast een

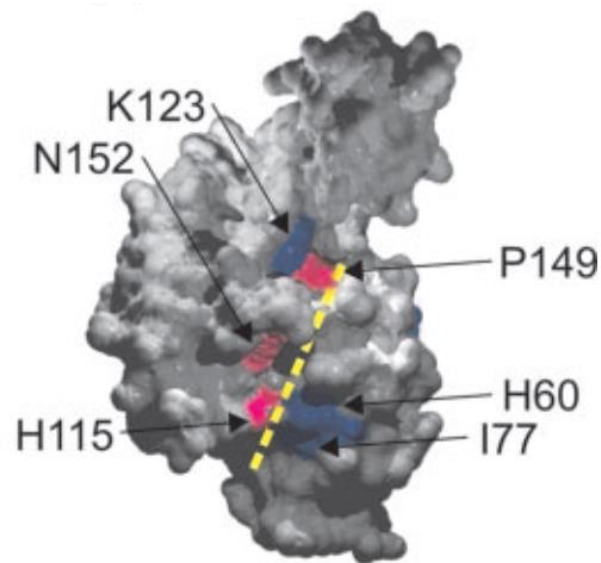


**Figuur 4.3** Schematische 2D voorstelling van de CAP Superfamilie (figuur overgenomen van Gibbs, Roelants & O'Bryan (2008). Aanvraag gestuurd op 10 februari 2019, tot op heden geen antwoord)

CAP-domein bijkomend carboxylterminus extensies die verschillend zijn voor elke CAP-subfamilie (**Figuur 4.3**) (Gibbs, Roelants & O'Bryan, 2008).

Algemeen bestaat de tertiaire structuur van het CAP-domein uit dertig aminozuren met een unieke helix-draai-helix structuur, gestabiliseerd door waterstofbindingen en meestal disulfide bindingen. Deze eigenschappen komen overeen met de vereisten van een extracellulair werkend eiwit.

Zeven van deze dertig aminozuren bezitten zijketens die in contact staan met de buitenwereld en dus voor interacties met andere moleculen kunnen zorgen. Verder worden zes van de zeven aminozuren aangetroffen in een groeve dat door de tertiaire structuur van het eiwit gevormd wordt. Deze groeve zou een mogelijk actief centrum kunnen zijn (**Figuur 4.4**) (Gibbs, Roelants & O'Bryan, 2008).



**Figuur 4.4** Voorbeeldillustratie van tertiaire structuur eiwit Triflin (CRISP subfamilie).

De groeve waar zes van de zeven aminozuren in contact staan met de buitenwereld is in gele stippellijn aangeduid. (figuur overgenomen van Gibbs, Roelants & O'Bryan (2008). Aanvraag gestuurd op 10 februari 2019, tot op heden geen antwoord)

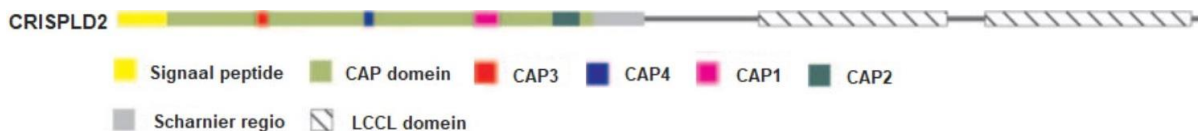
Enerzijds hebben de terugkomende signatuur sequenties van de CAP Superfamilie ervoor gezorgd dat de tertiaire structuur van de eiwitten geconserveerd is gebleven doorheen de evolutie. Anderzijds worden de functies van elk eiwit sterk beïnvloed door de carboxylterminus extensies.

Onderzoek wijst er op dat de CAP Superfamilie eiwitten een belangrijke rol spelen in de voortplanting, het immuunsysteem en de embryologische ontwikkeling, maar ook in ontwikkeling en progressie van kanker en bij verschillende chronische aandoeningen. Algemeen zijn tot op heden drie rollen gekend voor de CAP Superfamilie eiwitten. Ten eerste als normale cel- en weefselcomponenten, ten tweede als reactief toenemend eiwit bij ziekte en

ten derde in het gif van bepaalde diersoorten, zoals slangen (Gibbs, Roelants & O'Bryan, 2008).

#### 4.3.1.1 Structuur van het CRISPLD2-eiwit

Het CRISPLD2-eiwit is een gesecreteerd glucocorticoid eiwit (Gibbs, Roelants & O'Bryan, 2008). Het heeft een lengte van ongeveer 500 aminozuren en een moleculaire massa van 55920 Dalton (GeneCards, 2018; OMIM, 2019). Elk eiwit bevat een CAP-domein, dat afgesloten wordt door een PY (Proline-Tyrosine) dipeptide. Hierop volgt een lange extensie van ongeveer 260 aminozuren. Deze begint met een regio van vier cysteïnen dat “de Scharnierregio” genoemd wordt. Vervolgens komen twee LCCL domeinen, waarvoor een andere naam *factor C homology domain* is (**Figuur 4.5**) (Gibbs, Roelants & O'Bryan, 2008). Echter is er heden heel weinig geweten over de functie van LCCL domeinen (Vásárhelyi, Trexler & Patthy, 2014). Meestal komen ze voor in multidomein eiwitten met uiteenlopende functies waaronder celadhesie en aangeboren immuniteit (Gibbs, Roelants & O'Bryan, 2008). Aangezien celadhesie sowieso van primordiaal belang is bij de fusie van zowel de lip als van het gehemelte, schuilt hierin een mogelijke rol van de twee LCCL domeinen in het CRISPLD2-eiwit en zouden genetische fouten hierin het ontstaan van schisis kunnen verklaren.



**Figuur 4.5** Schematische 2D voorstelling van het CRISPLD2-eiwit (figuur gebaseerd op Gibbs, Roelants & O'Bryan (2008). Aanvraag gestuurd op 10 februari 2019, tot op heden geen antwoord)

#### 4.3.1.2 CRISPLD2 proteïne expressie

Zoals reeds vermeld wordt het CRISPLD2-eiwit extracellulair gesecreteerd (OMIM, 2019). Chiquet et al. (2007) toonden aan dat er *crispld2* expressie is in mandibula, palatum, orofarynx, nasofarynx en neuskraakbeen op kritieke momenten van de palatale ontwikkeling bij muisembryo's. Eveneens toonden Yuan et al. (2012) de expressie van CRISPLD2-eiwit aan in de vroege embryonale ontwikkeling van zebrafish embryo's. De expressie is gelokaliseerd in het anterieure deel, onder andere in de craniofaciale regio. In de studie van Oyewumi et al. (2003) werd gevonden dat het *crispld2*-eiwit vanaf dag 18 na conceptie tot expressie komt in de longen van prenatale ratten. Over de postnatale CRISPLD2-eiwit

expressie bestaat er onenigheid tussen de verschillende databases (GeneCards, 2018; UniProt, 2019; The Human Protein Atlas, (2019)).

#### 4.4 DE MOLECULAIRE EN BIOLOGISCHE FUNCTIES VAN HET CRISPLD2-EIWIT

##### 4.4.1 De moleculaire interacties van het CRISPLD2-eiwit

Zich baserend op de huidige kennis van de structuur van het CRISPLD2-eiwit, wordt ervan uitgegaan dat het met heparansulfaten bindt (UniProt, 2002-2019). Heparansulfaten zijn een groep van glycosaminoglycanen (GAG's) (QuickGO, 2018). Ze reguleren verschillende functies zoals celgroei, -adhesie, -migratie en -differentiatie, angiogenese en anticoagulatie. Eveneens kunnen ze de extracellulaire matrix aanpassen door ofwel regulerende factoren te beïnvloeden of door zelf te interageren met de extracellulaire matrix (Malavaki et al., 2011). Het exacte werkingsmechanisme van CRISPLD2 binding met heparansulfaten is niet gekend. Echter op basis van deze binding zou het CRISPLD2-eiwit eveneens een rol spelen in de extracellulaire matrix.

Ook hebben knock-out experimenten uitgewezen dat afwezigheid van CRISPLD2 in muisembryo's niet leefbaar is (Yuan et al., 2012).

##### 4.4.2 De biologische functies van het CRISPLD2-eiwit

CRISPLD2 speelt een rol in verschillende biologische functies, echter, het exacte werkingsmechanisme is nog niet gekend.

###### 4.4.2.1 Het CRISPLD2-eiwit in de longontwikkeling

Ongeveer vijf weken na conceptie ontstaan respiratoire divertikels uit de ventrale zijde van het voordarm endoderm. Tijdens de pseudo-glandulaire- en kanaalfase worden de primitieve longen vertakt. Tijdens de sacculaire en de alveolaire fase worden de longalveolen gevormd (**Figuur 4.6**) (Schoenwolf et al. [3], 2009). Deze ontwikkeling is een samenspel van cel proliferatie, -migratie en -differentiatie (Oyewumi, Kaplan & Sweezey, 2003). Complexe mesenchymale-epitheliale interacties reguleren long vertakking en alveole vorming (Zhang, Sweezey & Kaplan, 2015). Longfibroblasten (mesenchym) secreteren het CRISPLD2-eiwit met een piek tijdens de sacculaire fase, waarna het opgenomen wordt door aangrenzende epitheliale cellen. Deze epitheliale cellen zullen hierdoor differentiëren en vertakken (Oyewumi, Kaplan & Sweezey, 2003; Zhang, Sweezey & Kaplan, 2015). Het CRISPLD2-



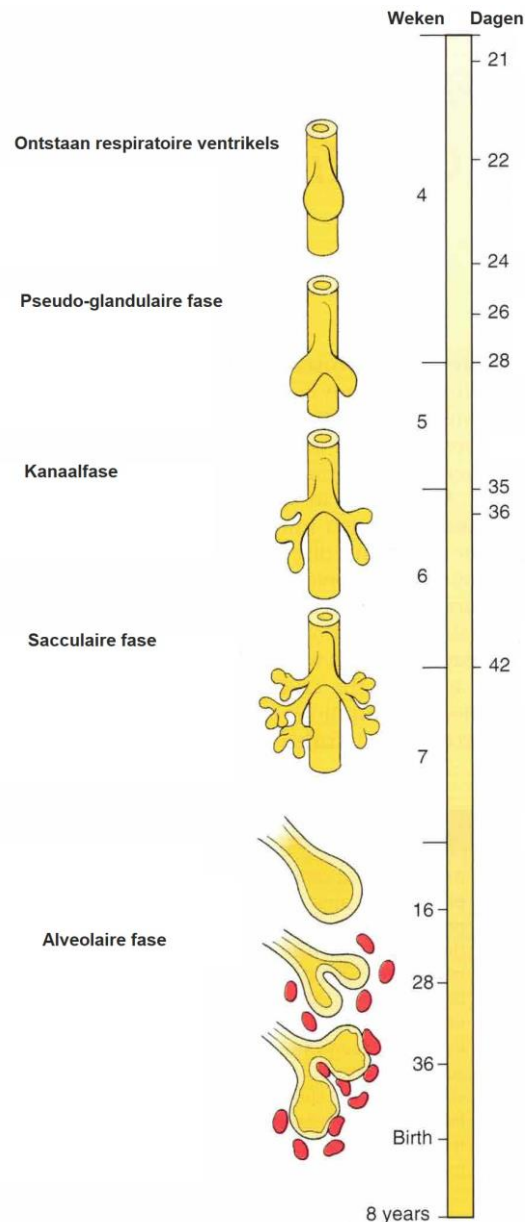
eiwit speelt dus een rol als mediator in de mesenchymale-epitheliale interacties van de longontwikkeling (Oyewumi, Kaplan & Swezey, 2003). In hun *in vitro* onderzoek bestudeerden Zhang, Swezey & Kaplan (2015) humane foetale long fibroblasten met knock-out van het *CRISPLD2*-gen. Resultaten tonen aan dat een tekort aan *CRISPLD2*-eiwit de celgroei vermindert en cel apoptose vermeerdert vergeleken met de controlegroep. Samengevat veroorzaakt een tekort aan *CRISPLD2*-eiwit secretie tijdens de sacculaire fase een vertraagde longontwikkeling.

#### 4.4.2.2 Het *CRISPLD2*-eiwit in de nierontwikkeling

Het *CRISPLD2*-gen zou een rol spelen in de nierontwikkeling (Swindell et al., 2015). Dit is een proces van herhaalde vertakkingen, zoals de longontwikkeling. Op dezelfde manier gaan Quinlan et al. (2007) ervan uit dat *CRISPLD2* een mediator zou zijn bij mesenchymale-epitheliale interacties. De resultaten van hun studie tonen aan dat *CRISPLD2* mRNA en *CRISPLD2*-eiwit aanwezig zijn in de zich ontwikkelende muizen nier. Eveneens vertonen heterozygote *CRISPLD2* +/- muizen minder nier vertakkingen vergeleken met de controle groep.

#### 4.4.2.3 Het *CRISPLD2*-eiwit in het immuunsysteem

Zoals eerder vermeld hebben LCCL domeinen een lipopolysaccharide-bindende functie en spelen hierbij een rol in de aangeboren immuniteit (Vásárhelyi, Trexler & Patthy, 2014). Lipopolysaccharide (LPS) is opgebouwd uit een lipofiel lipide A en polysacchariden en is de belangrijkste component van de buitenste membraan van Gram-negatieve bacteriën. Voor het



**Figuur 4.6** Schematische voorstelling van de longontwikkeling ((Figuur overgenomen van Schoenwolf et al. (2009). Aanvraag gestuurd naar ELSEVIER op 10 februari 2019, tot op heden geen antwoord)

menselijk immuunsysteem fungeert LPS als een merker van bacteriële invasie. Het lokt een inflammatoire reactie uit en in extreme gevallen een septische shock (Rosenfeld & Shai, 2006). Volgens Trexler, Bányai & Patthy (2000) hebben vier verschillende eiwitten, waaronder CRISPLD2 en de coagulatiefactor C van de degenkrab een gelijkend domein, namelijk LCCL. Coagulatiefactor C bindt met hoge affiniteit aan LPS en activeert hiermee een immunologisch mechanisme dat de degenkrab beschermt tegen bacteriële infecties. Eveneens ontdekten Vászárhelyi, Trexler & Patthy (2014) dat beide LCCL domeinen van het CRISPLD2-eiwit een hoge affiniteit hebben voor lipide A. De studie van Wang et al. (2009) toont aan dat CRISPLD2, door selectief te binden aan LPS, de interactie van LPS met lipopolysacharide-bindende proteïnen vermindert. Deze laatste maken het antigeen herkenbaar voor het immuunsysteem (Wang et al., 2013). Eveneens zou LPS de productie van het CRISPLD2-eiwit verhogen. Kortom zou het CRISPLD2-eiwit niet alleen de immunologische reactie uitgelokt door LPS blokkeren, maar eveneens het risico op septische shock doen dalen in muizen (Wang et al., 2009). In de studie van Wang et al. (2013) werd onderzocht of CRISPLD2 gebruikt kon worden als een biomarker om de prognose van sepsis te voorspellen. De resultaten tonen aan dat patiënten met sepsis een hogere concentratie CRISPLD2 hadden vergeleken met gezonde personen. Daarentegen hadden patiënten met septische shock een verlaagde concentratie aan CRISPLD2. Hierbij is niet geweten of dit te maken heeft met een verhoogd verbruik of een verlaagde productie van het eiwit. Eveneens was er geen verschil in concentratie tussen de genezen en overleden patiënten na sepsis (Wang et al., 2013)

#### 4.4.2.4 Het CRISPLD2-eiwit in de craniofaciale ontwikkeling

Onder de invloed van epitheliale-mesenchymale interacties vertonen neurale lijst cellen een epitheliale-mesenchymale transformatie vooraleer ze de neurale buis verlaten (Schoenwolf et al. [4], 2009). Tijdens deze transformatie verliezen ze hun cel-cel en cel-basale membraan verankering en verhoogt hun mobiliteit (Lamouille, Xu & Derynck, 2014). Hierdoor kunnen ze volgens welbepaalde wegen door het lichaam migreren, om zich uiteindelijk te differentiëren in zeer verschillende structuren van het craniofaciale complex (Schoenwolf et al. [4], 2009). Als CRISPLD2 een (*belangrijke?*) rol speelt bij epitheliale-mesenchymale interacties, is het dus aanneembaar dat het een belangrijke functie heeft in de craniofaciale ontwikkeling (Oyewumi, Kaplan & Swezey, 2003). In de studie van Yuan et al. (2012) werd de rol van *crispld2* onderzocht in zebravissen. In een vroeg ontwikkelingsstadium komt *crispld2* in alle weefsels tot expressie, in een later stadium enkel in de craniofaciale structuren. Hieruit zou kunnen geconcludeerd worden dat *crispld2* een rol speelt bij de ontwikkeling van

neurale lijst cellen alsook bij hun migratie. In de studie van Swindell et al. (2015) werd de invloed van *crispld2* op het migratie patroon van neurale lijst cellen in zebrafissen onderzocht. Wanneer de expressie van *crispld2* werd uitgeschakeld in het embryo werd tijdens de vroege embryonale fase een verminderd aantal neurale lijst cellen en een wanordelijk migratiepatroon waargenomen. Eveneens waren enkele neurale lijstcellen over de middellijn gemigreerd. In een later embryonaal stadium waren de neurale lijstcellen nog meer verminderd in aantal en vertoonden eveneens een abnormale migratie en vorming van kraakbenige structuren van de orofaciale regio. Het onderzoek wees ook uit dat *crispld2* niet noodzakelijk is voor proliferatie van de cellen, maar wel voor cel overleving, differentiatie en migratie. Het is echter niet geweten of gebrek aan *crispld2* een directe rol heeft in de wanordelijke migratie, of dat dit een gevolg is van de verminderde overleving van de neurale lijstcellen.

#### **4.4.3 De CRISPLD2 modulators**

Al zijn de exacte mechanismen nog niet gekend, toch blijken retinoïnezuur, glucocorticoïden en vitamine D een belangrijke rol te spelen in de vertakking van long en nieren tijdens hun ontwikkeling (Malpel, Mendelsohn & Cardoso, 2000; Nadeau et al., 2010; Quinlan et al., 2007). Verschillende studies gaan uit van de hypothese dat de invloed van deze stoffen gemedieerd wordt door het *crispld2*-eiwit (Nadeau et al., 2010; Quinlan et al., 2007). Zowel in de longen als nieren stimuleert retinoïnezuur de initiële vertakking (Quinlan et al., 2007; Malpel, Mendelsohn & Cardoso, 2000). Daartegenover wordt de maturatiefase van de longen beïnvloed door glucocorticoïden (Quinlan et al., 2007).

In de studie van Quinlan et al. (2007) werd vastgesteld dat retinoïnezuur de *crispld2* mRNA productie stimuleert in muizencellen. Volgens hun hypothese zou retinoïnezuur dus, via de tussenkomst van *crispld2*, de snelle initiële vertakking van longen en nieren bevorderen.

In de studie van Rutenstock et al. (2011) werd ondervonden dat ratten met een geïnduceerde alveolarisatiestop een geringere hoeveelheid *crispld2* mRNA bezaten. Wanneer een prenatale retinoïnezuur behandeling werd uitgevoerd waren de mRNA hoeveelheden significant toegenomen in vergelijking tot de niet behandelde groep, zowel bij ratten met alveolarisatiestop als bij de controlegroep.

Nadeau et al. (2010) onderzochten ook de invloed van glucocorticoïden, retinoïnezuur en vitamine D op de secretie van *crispld2*-eiwit uit rat longfibroblasten. Hierbij werd aangetoond dat glucocorticoïden de productie van *crispld2* mRNA altijd stimuleerden terwijl vitamine D de productie van *crispld2* mRNA verminderde. Voor retinoïnezuur werd echter een schijnbaar

contradictorisch resultaat verkregen, vergeleken met de vorige studies. Retinoïnezuur werkte namelijk zwak stimulerend na 24 uur en inhiberend na 48 uur. Het inhibeerde de glucocorticoïd geïnduceerde *crispld2* mRNA niveau vanaf 12 uur. Na 48 uur was de inhibitie het sterkste, maar nog niet voldoende om de glucocorticoïde stimulatie volledig teniet te doen. Daarentegen was er geen inhiberend effect op glucocorticoïd gestimuleerde *crispld2* mRNA hoeveelheden wanneer vitamine D en retinoïnezuur samen voorkwamen.

Deze verschillende studies benadrukken de complexiteit van deze interacties. Meer onderzoek is hier nog vereist.

## **5. DE ROL VAN HET CRISPLD2-GEN IN SCHISIS EN ANDERE AANDOENINGEN**

### **5.1 INLEIDING**

In dit hoofdstuk wordt uitgelicht in welke aandoeningen *CRISPLD2* een rol zou spelen. Eveneens wordt reeds bestaande literatuur over de link tussen *CRISPLD2* en schisis uitgebreider besproken.

### **5.2 ANDERE AANDOENINGEN WAARIN CRISPLD2 MOGELIJKS EEN ROL SPEELT**

Mutaties in het *CRISPLD2*-gen zijn nog niet met zekerheid gelinkt aan welbepaalde aandoeningen. De grootste evidentie bestaat momenteel voor een gespleten lip of palatum (University of Copenhagen, 2019).

Nadeau et al. (2006) signaleerde ook de mogelijkheid dat een deficiëntie van *CRISPLD2* een rol zou spelen in bronchopulmonaire dysplasie (BPD). Meestal is dit een zelflimiterende, doch ernstige, aandoening op kinderleeftijd. Toch bestaat er op volwassen leeftijd een grotere kans om *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD) te ontwikkelen. De huidige behandelingen en preventiemaatregelen voor BPD zijn van matige efficiëntie en hebben vele nevenwerkingen (Zhang et al., 2016). In de studie werd eveneens aangetoond dat een verminderde alveogenese geassocieerd is met *crispld2* deficiëntie in muismodellen.

De cohortstudie van Ambalavanan et al. (2009) toonde aan dat een ontsteking van de longen met hogere concentraties interleukines (van het type IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 en IL-10) en interferon- $\gamma$  een hoge associatie vertoonde met de ontwikkeling van BPD. Deze inflammatie zou dus een oorzaak kunnen zijn van de groeistop van de longen (Zhang et al., 2016). De resultaten van de studie van Zhang et al. (2016) tonen aan dat *CRISPLD2* een anti-inflammatoire rol zou spelen in longfibroblasten en epitheliale cellen via mesenchymale-epitheliale interacties. Hierdoor zou het de groeistop van de longen kunnen tegengaan.

### **5.3 HET CRISPLD2-GEN EN ZIJN ROL IN SCHISIS**

Chiquet et al. (2007) was de eerste die variatie in het *CRISPLD2*-gen in een GWA studie statistisch kon associëren met het voorkomen van niet-syndromale schisis, met name LS(G). Hierdoor werd *CRISPLD2* een kandidaat gen voor schisis. Mutaties in het *CRISPLD2*-gen zouden de concentratie van *CRISPLD2*-eiwit kunnen wijzigen of ook de bindingsplaatsen voor transcriptiefactoren die *CRISPLD2* expressie reguleren, kunnen veranderen. Hierdoor

zou de normale ontwikkeling van de orofaciale regio in het gedrang kunnen komen en er een fenotype van schisis kunnen ontstaan.

De studie van Yuan et al. (2012) onderzocht de rol van *crispld2* in zebravissen door middel van morfolino's. Twee *crispld2* morfolino's, als MO1 en MO2 benoemd in de studie, veroorzaken een abnormale splicing van het *crispld2* gen. Een derde morfolino, MO3 genoemd in de studie, verhindert de transcriptie van *crispld2*. Algemeen hadden de met morfolino's geïnjecteerde embryo's een lagere overleving op dag 1 en 5 na conceptie, vergeleken met de niet-geïnjecteerde embryo's. Eveneens werd een hoger aantal variërende abnormale fenotypes gezien in de geïnjecteerde embryo's. Specifiek voor de kraakbeenstructuren vertoonden MO1 en MO2 geïnjecteerde embryo's een verwijding en misvorming van de onderkaak. Voor MO3 embryo's werd een volledig verlies van de onderkaak gezien en meer uitgesproken craniofaciale misvormingen. Eveneens werd ondervonden dat in MO geïnjecteerde embryo's de neurale lijst cel clusters verschilden van de controle groep (Yuan et al., 2012). In de studie van Swindell et al. (2015) werd via anti-*crispld2* antistoffen het *crispld2*-eiwit gelokaliseerd in de orofarynx van het zebra vis embryo. Echter is niet geweten of het eiwit hier ook gesecreteerd wordt, zoals bijvoorbeeld in de longen. Eveneens is de exacte rol van *crispld2* in epitheliale-mesenchymale interacties en neurale lijst cel differentiatie en migratie die zou kunnen leiden tot schisis nog niet opgehelderd (Yuan et al., 2012; Swindell et al., 2015).

#### 5.4 OVERZICHT VAN DE LITERATUUR OMTRENT DE LINK TUSSEN *CRISPLD2* EN SCHISIS

Zoals reeds vermeld werden in de studie van Chiquet et al. (2007) achttien SNPs van het *CRISPLD2*-gen nagegaan in een Kaukasisch en Latijns-Amerikaans cohort van schisispatiënten. Voor verschillende van hen werden associaties met schisis gevonden. SNPs rs1546124, rs4783099 en rs16974880 zouden voor de Kaukasische populatie een rol kunnen spelen bij het voorkomen van schisis (**Figuur 4.7**). SNP rs1546124, gelokaliseerd in een potentiële promotor regio, zou de expressie van *CRISPLD2*-eiwit mogelijks beïnvloeden. SNPs rs4783099 en rs16974880 bevinden zich in de *three prime untranslated region* (3'-UTR) van het *CRISPLD2*-gen en hebben mogelijks een invloed op regulatoire elementen van de gen expressie. In de Latijns-Amerikaanse populatie werden SNPs rs8061351 en rs2326398 gelinkt aan schisis. SNP rs8061351 zou, ondanks een 'stille mutatie', toch functionele en structurele veranderingen kunnen teweegbrengen in het *CRISPLD2*-eiwit. SNP rs2326398

bevindt zich noch in een *splicing* regio, noch in een coderende regio. Het is niet geweten hoe deze het CRISPLD2-eiwit zou kunnen beïnvloeden. Dit onderstreept het belang van onderzoek naar niet coderende regio's van het menselijk genoom. Eveneens werden verschillende SNPs en hun link met schisis getest in een Colombiaanse populatie. Hierbij werden geen associaties met de variatie in *CRISPLD2* gevonden (Chiquet et al., 2007).

In de studie van Carter et al. (2010) werden 11 kandidaat genen, waaronder *CRISPLD2*, die in vorige studies geassocieerd waren met schisis, geselecteerd. Op basis van deze genen werden SNPs uitgezocht en werd de link met niet-syndromale schisis nagekeken. Voor *CRISPLD2* werd er in deze studie geen link gevonden. Echter werd per gen enkel een beperkt aantal SNPs uitgetest. Eveneens werd statistisch vooral rigoureuus getest om vals-positieve resultaten te beperken, wat de kans op het missen van een associatie vergroot.

Eveneens in 2010 publiceerde Shi et al. (2010) een studie waarbij de link tussen *CRISPLD2* en schisis positief

werd versterkt. De drie causale SNPs uit de Kaukasische populatie van de studie van Chiquet et al. (2007) werden hierbij getoetst in de Noord-Chinese

SNPs	Allelen
rs1546124	G > A / G > C
rs4783099	C > T
rs16974880	T > A / T > G
rs8061351	C > T
rs2326398	A > G

**Figuur 4.7** Overzicht van de reeds gelinkte SNPs aan schisis. (informatie gebaseerd op NLM-NIH (2019))

populatie. Een steekproef van 370 individuen, waarvan 179 schisispatiënten en 191 controle personen werd gebruikt. De schisispatiënten werden onderverdeeld in twee aparte groepen, namelijk LS(G) en GS. Specifiek werd er voor SNP rs1546124 een significante associatie gevonden voor de LS(G) groep. Voor SNP rs4783099 was deze associatie significant voor zowel de LS(G) en de GS groep.

In 2011 werd een gelijkaardige studie opgezet door Shen et al. (2011). Opnieuw werden de drie SNPs rs1546124, rs4783099 en rs16974880 uit de studie van Chiquet et al. (2007) getoetst in de Noordwest Chinese populatie. De steekproef bestond uit 444 schisispatiënten en een controlegroep van 463 patiënten. De schisis groep werd onderverdeeld in 326 patiënten met LS(G) en 118 patiënten met GS. Voor SNP rs1546124 werd, in tegenstelling tot de studie van Shi et al. (2010) een associatie gevonden voor zowel LS(G) als GS. Voor SNP rs4783099

was de link met GS significant. Voor SNP rs16974880 werd geen associatie gevonden met schisis in de Noordwest Chinese populatie.

Eveneens in 2011 werd een grootschalige studie naar de link van *CRISPLD2* met schisis uitgevoerd door Letra et al. (2011) in multiplex families uit Noord-/Zuid-Amerikaanse, Aziatische en Noord-/Oost Europese populaties. Schisispatiënten werden in de aparte groepen LS(G) en GS onderverdeeld. Vier SNPs, namelijk rs1546124, rs8061351, rs2326398 en rs4783099, werden onderzocht. De SNP rs1546124 had een significante associatie voor enerzijds de Braziliaanse en Texiaanse populatie (Kaukasische etniciteit) en anderzijds de Turkse populatie. SNP rs8061351 was op zijn beurt significant voor de Braziliaanse (Kaukasische etniciteit) en Latijns-Amerikaanse populatie van Texas. SNP rs2326398 was enkel significant voor de Latijns-Amerikaanse populatie van Texas en voor SNP rs4783099 werd geen significante link gevonden.

Later onderzocht de studie van Mijiti et al. (2015) de rol van *CRISPLD2* in schisis in de Chinese populatie van Xinjiang Oeigoeren. Achttien SNPs werden nagegaan in een groep van 200 schisispatiënten vergeleken met een controle groep van 180 individuen. Opnieuw werd een significante associatie gevonden voor SNP rs1546124. Echter werd er in deze studie niet gezocht naar de voormalig veelvuldig aangehaalde rs4783099 en rs16974880 SNPs.

De studie van Messetti et al. (2017) onderzocht de link van onder andere *CRISPLD2* met schisis in de Braziliaanse populatie. 549 LS(G) en 236 GS werden vergeleken met een controlegroep van 693 individuen. De vier SNPs rs1546124, rs8061351, rs2326398 en rs4783099 werden onderzocht. Enkel voor SNP rs4783099 werd een significante associatie gevonden met GS.

In de studie van Girardi et al. (2011) werd de *CRISPLD2* locus onderzocht door drie microsatelliet merkers en drie SNPs, namelijk rs1546124, rs721005 en rs16974880, in de Italiaanse populatie. Er werd echter geen associatie gevonden.

Blijkbaar speelt variatie in *CRISPLD2* een rol in schisis die echter afhankelijk is van de etnische groep. Dit is te verklaren doordat elke populatie een verschillende genetische achtergrond heeft, wat de complexe genetische etiologie van schisis benadrukt. De verschillen in de resultaten tussen studies kunnen echter ook verklaard worden door andere factoren, met name 1/de grootte van de steekproef, 2/ een te grote correctie op de statistiek of 3/verschillen in gen-gen/ gen-omgeving interacties (Chiquet et al., 2007; Letra et al., 2011; Messetti et al., 2017; Shi et al., 2010).



## **6. DISCUSSIE**

Vele studies illustreren dat schisis een veelvoorkomende congenitale aandoening met nefaste gevolgen voor de levenskwaliteit is. Behandeling is dus wenselijk in onze moderne maatschappij. Naast omgevings- en teratogene factoren, spelen genen een rol in de complexe etiologie. Chiquet et al. (2007) stelden als eerste het *CRISPLD2*-gen voor als kandidaat gen voor schisis.

Heden wordt vermoed dat *CRISPLD2* een rol speelt bij de long- en nier ontwikkeling, het aangeboren immuunsysteem en de craniofaciale ontwikkeling. Meerdere studies hebben aangetoond dat *crispld2* van belang is bij mesenchymale-epitheliale interacties en neurale lijst cel overleving, differentiatie en migratie. Aangezien deze processen een belangrijke functie hebben in de craniofaciale ontwikkeling, zouden variaties in het *CRISPLD2*-gen deze ontwikkeling nefast kunnen beïnvloeden. Welke deze variaties zijn, en of die zich in het proteïne coderende of het niet-proteïne-coderende (regulatoire) gedeelte van het genoom bevinden is nog niet duidelijk. Ook is niet geweten of mogelijks epigenetische factoren een rol spelen. De biologische processen en de exacte rol tijdens de craniofaciale ontwikkeling zijn dus tot heden nog niet opgehelderd. Meer onderzoek is hiervoor noodzakelijk.

Omtrent de link tussen *CRISPLD2* en schisis brachten associatiestudies aan het licht dat er verschillende SNPs in verschillende populaties significant gelinkt kunnen worden. Algemeen kan opgemerkt worden dat niet alle studies een onderscheid maken tussen LS(G) en GS. Echter heeft dit niet zo'n grote invloed op het vraagstuk naar de rol van het *CRISPLD2*-gen in schisis. Vijf SNPs, waaronder rs1546124, rs4783099, rs16974880, rs8061351 en rs2326398 worden doorheen de studies herhaaldelijk aangehaald. Algemeen werd SNP rs1546124 in aparte studies significant gelinkt aan schisis in de Noord-Chinese, Noordwest Chinese en Turkse populatie. Eveneens werd de link in de Kaukasische populatie vermeld in twee verschillende studies. Voor SNP rs4783099 werd ook een significante link gevonden in de Kaukasische, Noord-Chinese, Noordwest Chinese en Braziliaanse populatie. SNP rs8061351 werd door twee verschillende studies significant gelinkt in de Latijns-Amerikaanse populatie en in één artikel in de Braziliaanse populatie (Kaukasische etniciteit). Op zijn beurt werd SNP rs16974880 significant in de Kaukasische populatie gelinkt. SNP rs2326398 werd in twee studies aan de Latijns-Amerikaanse populatie gelinkt. Alle andere SNPs en populaties werden ofwel niet significant gelinkt, ofwel niet onderzocht. Op basis van deze verschillende resultaten zou de hypothese gesteld kunnen worden dat *CRISPLD2*-gen variaties, afhankelijk

van de populatie, een rol zou spelen in de etiologie van schisis. Verder onderzoek, waaronder meta-analyses, zijn wenselijk om deze hypothese al dan niet te bevestigen.

Eveneens opperde de studie van Nadeau et al. (2006) de mogelijkheid dat deficiënties in het *CRISPLD2*-gen een rol zouden kunnen spelen in BPD. Echter werd heden in de literatuur het samen voorkomen van BPD en schisis nergens vermeld. Ofwel is dit nog niet onderzocht. Ofwel heeft het *CRISPLD2*-gen een onafhankelijke rol in deze verschillende processen. Verder onderzoek is vereist om deze vraag te beantwoorden.

Eenmaal toekomstig onderzoek bovenstaande vragen opgehelderd zal hebben, zal beoordeeld kunnen worden of bepaalde *CRISPLD2*-gen variaties al dan niet een significante rol spelen in het ontstaan van schisis. In het geval dat *CRISPLD2* een belangrijke functie heeft, kan dit tot nieuwe inzichten en mogelijkheden leiden in de preventieve en therapeutische benadering van schisis. Verdere studies zouden er bijvoorbeeld gericht op kunnen zijn een stof te vinden die de werking van *CRISPLD2* bevordert of nabootst, een zogenaamde *biosimilar*. Een illustratie van dit principe wordt gegeven door de studie van Sakai et al. (2016). Deze toonde aan dat antioxidantia supplementatie tijdens de zwangerschap de kans op craniofaciale anomalieën verminderde in muizen met een geïnduceerd Treacher-Collins syndroom. Echter gaat het hier om een *tcofl* geïnduceerd syndroom in muizen en heeft het dus geen link met het *CRISPLD2*-gen. Al is nog heel veel onderzoek noodzakelijk om een mogelijke *biosimilar* van *CRISPLD2* te vinden en dit te testen bij haploïd *crispld2* deficiënte muizenmoeders en - embryo's. Zo zouden muismodellen nuttige toekomstperspectieven kunnen bieden in de verdere zoektocht naar oorzaken van schisis, die tegelijk perspectieven biedt naar preventie van schisis.

Volgens hetzelfde denkpatroon zou onderzocht kunnen worden of andere stoffen met een belangrijke rol in de celadhesie zoals *CRISPLD2*, met name *CTNND1*, *PLEKHA7*, *PLEKHA5*, *ESRP2* en *CDH1* (Cox et al. 2018) kunnen toegediend worden in muizen zwanger van embryo's heterozygoot voor telkens 1 van deze schisis veroorzakende stoffen, inclusief *CRISPLD2*. Zoals bij Sakai et al (2016) kan worden nagegaan of het op basis van genotype verwachte fenotype tijdens de embryonale ontwikkeling moleculair kan "hersteld" worden wanneer de respectievelijke "goede" adhesie-bevorderende moleculen in hoge dosis worden toegediend in het dieet van de zwangere muizen.

Indien de dierexperimentele studies succesvol blijken zonder negatieve gevolgen voor moederhuis en muiskind, kan in een latere fase aan het uitvoeren van een *clinical trial* bij de mens worden gedacht.

Eveneens zou het positief effect op het voorkomen van schisis in de mens van retinoïnezuur en andere stoffen onderzocht kunnen worden. In verschillende studies op muizen en ratten is reeds de mogelijkheid geopperd dat prenatale retinoïnezuur behandeling de *CRISPLD2* mRNA hoeveelheid vermeerdert en de alveolarisatiestop tegengaat (Quinlan et al., 2007; Ruttenstock et al., 2011). Echter benadrukken de schijnbaar tegengestelde resultaten van de studie van Nadeau et al. (2010) dat dit om complexe mechanismen gaat waarbij niet alleen retinoïnezuur, maar ook andere mediators een rol kunnen spelen. Tot slot werd hun onderzoek op ratten modellen omtrent retinoïnezuursupplementatie enkel gericht op het verbeteren van de longontwikkeling. Uiteraard is er nog veel onderzoek nodig om te achterhalen of retinoïnezuur of andere stoffen supplementatie tijdens de zwangerschap een significante verbetering kan brengen in het voorkomen van schisis bij de mens.

## **7. CONCLUSIE**

Op basis van de huidige literatuur kan de hypothese bevestigd worden dat *CRISPLD2*-gen variaties een rol kunnen spelen in de etiologie van schisis, afhankelijk van de populatie. Dier experimenteel onderzoek in muizen en zebrafissen toonde aan dat *crispld2* van belang is bij mesenchymale-epitheliale interacties en neurale lijst cel overleving, migratie en differentiatie. Deze beide processen zijn van belang in de craniofaciale ontwikkeling. Eveneens is aangetoond dat LCCL domeinen, waarvan *CRISPLD2* er twee bezit in zijn carboxylterminus extensie, onder andere een functie hebben in celadhesie. Celadhesiemechanismen spelen een belangrijke rol in het ontstaan van schisis, zoals aangetoond werd in de studie van Cox et al. (2018) waarbij vijf genen (*CTNND1*, *PLEKHA7*, *PLEKHA5*, *ESRP2* en *CDH1*) met een belangrijke rol in celadhesiemechanismen significant gelinkt werden met schisis. Concreet is dus meer onderzoek nodig om de huidige kennis van het *CRISPLD2*-gen en zijn link met schisis te versterken en in een later stadium de eventuele therapeutische mogelijkheden uit te werken.

## **8. REFERENTIELIJSTEN**

### **8.1 ARTIKELS**

- Ambalavanan N, Carlo WA, D'Angio CT, McDonald SA, Das A, Schendel D, Thorsen P, Higgins RD, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics*. 2009 Apr;123(4):1132-41. doi: 10.1542/peds.2008-0526. PubMed PMID: 19336372; PubMed Central PMCID: PMC2903210.
- Amos W, Driscoll E, Hoffman JI. Candidate genes versus genome-wide associations: which are better for detecting genetic susceptibility to infectious disease? *Proc Biol Sci*. 2011 Apr 22; 278(1709): 1183–1188. doi: 10.1098/rspb.2010.1920. Epub 2010 Oct. 6. PubMed PMID: 20926441; PubMed Central PMCID: PMC3049081.
- Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs*. 2000 Aug;15(4):242-9. DOI: 10.1053/jpdn.2000.8148. PubMed PMID: 10969497.
- Böhmer AC, Gözl L, Kreusch T, Kramer FJ, Pöttsch B, Nöthen MM, Jäger A, Mangold E, Knapp M, Ludwig KU. Investigation of dominant and recessive inheritance models in genome-wide association studies data of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res*. 2018 Mar 1;110(4):336-341. doi: 10.1002/bdr2.1144. Epub 2017 Nov 14. PubMed PMID: 29134786.
- Carter TC, Molloy AM, Pangilinan F, Troendle JF, Kirke PN, Conley MR, Orr DJ, Earley M, McKiernan E, Lynn EC, Doyle A, Scott JM, Brody LC, Mills JL. Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010 Feb;88(2):84-93. doi: 10.1002/bdra.20639. PubMed PMID: 19937600; PubMed Central PMCID: PMC3503531.
- Chiquet BT, Lidral AC, Stal S, Mulliken JB, Moreno LM, Arcos-Burgos M, Valencia-Ramirez C, Blanton SH, Hecht JT. CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. *Hum Mol Genet*. 2007 Sep 15;16(18):2241-8. Epub 2007 Jul 5. DOI: 10.1093/hmg/ddm176. PubMed PMID: 17616516; PubMed Central PMCID: PMC3755375.
- Cox LL, Cox TC, Moreno Uribe LM, Zhu Y, Richter CT, Nidey N, Standley JM, Deng M, Blue E, Chong JX, Yang Y, Carstens RP, Anand D, Lachke SA, Smith JD, Dorschner MO, Bedell B, Kirk E, Hing AV, Venselaar H, Valencia-Ramirez LC, Bamshad MJ, Glass IA, Cooper JA, Haan E, Nickerson DA, van Bokhoven H, Zhou H, Krahn KN, Buckley MF, Murray J, Lidral AC, Roscioli T. Mutations in the Epithelial Cadherin-p120-Catenin Complex Cause Mendelian Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate. *Am J Hum Genet*. 2018 Jun 7;102(6):1143-1157. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.04.009. Epub 2018 May 24. PubMed PMID: 29805042; PubMed Central PMCID: PMC5992119.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011 Mar;12(3):167-78. doi: 10.1038/nrg2933. Review. PubMed PMID: 21331089; PubMed Central PMCID: PMC3086810.

- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28;346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096. PubMed PMID: 25430774.
- Duncan KM, Mukherjee K, Cornell RA, Liao EC. Zebrafish models of orofacial clefts. *Dev Dyn*. 2017 Nov;246(11):897-914. doi: 10.1002/dvdy.24566. Epub 2017 Sep 25. PubMed PMID: 28795449; PubMed Central PMCID: PMC5777297.
- Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev*. 2008 Dec;29(7):865-97. doi: 10.1210/er.2008-0032. Epub 2008 Sep 29. PubMed PMID: 18824526.
- Girardi A, Martinelli M, Carinci F, Morselli PG, Caramelli E, Scapoli L. No evidence for a role of CRISPLD2 in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in an Italian population. *Eur J Oral Sci*. 2011 Feb;119(1):102-5. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00801.x. PubMed PMID: 21244519.
- Herkrath AP, Herkrath FJ, Rebelo MA, Vettore MV. Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: a meta-analysis. *J Dent*. 2012 Jan;40(1):3-14. doi: 10.1016/j.jdent.2011.10.002. Epub 2011 Oct 13. PubMed PMID: 22019990.
- Jackson A, Bromley R, Morrow J, Irwin B, Clayton-Smith J. In utero exposure to valproate increases the risk of isolated cleft palate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2016 May;101(3):F207-11. doi: 10.1136/archdischild-2015-308278. Epub 2015 Sep 25. PubMed PMID: 26408639.
- Jahanbin A, Shadkam E, Miri HH, Shirazi AS, Abtahi M. Maternal Folic Acid Supplementation and the Risk of Oral Clefts in Offspring. *J Craniofac Surg*. 2018 Sep;29(6):e534-e541. doi: 10.1097/SCS.0000000000004488. PubMed PMID: 29762322.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Mar;15(3):178-96. doi: 10.1038/nrm3758. PubMed PMID: 24556840; PubMed Central PMCID: PMC4240281.
- Letra A, Menezes R, Cooper ME, Fonseca RF, Tropp S, Govil M, Granjeiro JM, Imoehl SR, Mansilla MA, Murray JC, Castilla EE, Orioli IM, Czeizel AE, Ma L, Chiquet BT, Hecht JT, Vieira AR, Marazita ML. CRISPLD2 variants including a C471T silent mutation may contribute to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011 Jul;48(4):363-70. doi: 10.1597/09-227. Epub 2010 Jul 1. PubMed PMID: 20815724; PubMed Central PMCID: PMC3000893.
- Lie RT, Wilcox AJ, Taylor J, Gjessing HK, Saugstad OD, Aabyholm F, Vindenes H. Maternal smoking and oral clefts. *Epidemiology*. 2008 July ; 19(4): 606–615. doi:10.1097/EDE.0b013e3181690731. PubMed PMID: 18449058; PubMed Central PMCID: PMC5560035.
- Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ*. 2004 Mar;82(3):213-8. Epub 2004 Apr 16. PubMed PMID: 15112010; PubMed PMICID: PMC2585921.
- Malavaki CJ, Theocharis AD, Lamari FN, Kanakis I, Tsegenidis T, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Heparan sulfate: biological significance, tools for biochemical analysis and structural characterization. *Biomed Chromatogr*. 2011 Jan;25(1-2):11-20. doi: 10.1002/bmc.1536. PubMed PMID: 21204109.
- Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development*. 2000 Jul;127(14):3057-67. PubMed PMID: 10862743.

- Messetti AC, Machado RA, de Oliveira CE, Martelli-Júnior H, de Almeida Reis SR, Moreira HS, Persuhn DC, Wu T, Coletta RD. Brazilian multicenter study of association between polymorphisms in CRISPLD2 and JARID2 and non-syndromic oral clefts. *J Oral Pathol Med*. 2017 Mar;46(3):232-239. doi: 10.1111/jop.12470. Epub 2016 Jun 21. PubMed PMID: 27328068.
- Mijiti A, Ling W, Maimaiti A, Tuerdi M, Tuerxun J, Moming A. Preliminary evidence of an interaction between the CRISPLD2 gene and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (nsCL/P) in Xinjiang Uyghur population, China. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015 Feb;79(2):94-100. doi: 10.1016/j.ijporl.2014.10.043. Epub 2014 Nov 11. PubMed PMID: 25496823.
- Millacura N, Pardo R, Cifuentes L, Suazo J. Effects of folic acid fortification on orofacial clefts prevalence: a meta-analysis. *Public Health Nutrition*: 20(12), 2260–2268. doi:10.1017/S1368980017000878. Epub 2017 May 23. PubMed PMID: 28534456.
- Mossey P, Castilla E. Global registry and database on craniofacial anomalies: *Report of a WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies*. World Health Organization, Bauru (Brazil). 2001: 15-33.
- Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest*. 2004 Jun;113(12):1676-8. doi:10.1172/JCI22154. PubMed PMID: 15199400; PubMed Central PMCID: PMC420516.
- Nadeau K, Jankov RP, Tanswell AK, Swezey NB and Kaplan F. Lgl1 is suppressed in oxygen toxicity animal models of bronchopulmonary dysplasia and normalizes during recovery in air. *Pediatr Res*. 2006 Mar;59(3):389-95. PubMed PMID: 16492977.
- Nadeau K, Montermini L, Mandeville I, Xu M, Weiss ST, Swezey NB, Kaplan F. Modulation of Lgl1 by steroid, retinoic acid, and vitamin D models complex transcriptional regulation during alveolarization. *Pediatr Res*. 2010 Apr;67(4):375-81. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181d23656. PubMed PMID: 20057335; PubMed Central PMCID: PMC3104505.
- Oyewumi L, Kaplan F, Gagnon S, Swezey NB. Antisense oligodeoxynucleotides decrease LGL1 mRNA and protein levels and inhibit branching morphogenesis in fetal rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Feb;28(2):232-40. PubMed PMID: 12540491.
- Oyewumi L, Kaplan F, Swezey NB. Lgl1, a mesenchymal modulator of early lung branching morphogenesis, is a secreted glycoprotein imported by late gestation lung epithelial cells. *Biochem J*. 2003 Nov 15;376(Pt 1):61-9. PubMed PMID: 12880386; PubMed Central PMCID: PMC1223741.
- Phan M, Conte F, Khandelwal KD, Ockeloen CW, Bartzela T, Kleefstra T, van Bokhoven H, Rubini M, Zhou H, Carels CE. Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms?. *Hum Genet*. 2016 Dec;135(12):1299-1327. Epub 2016 Oct 3. Review. PubMed PMID: 27699475; PubMed Central PMCID: PMC5065589.
- Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet*. 2000 Mar;106(3):345-50. PubMed PMID: 10798365.
- Queiroz Herkrath AP, Herkrath FJ, Rebelo MA, Vettore MV. Measurement of health-related and oral health-related quality of life among individuals with nonsyndromic orofacial clefts: a systematic review and meta-analysis. *Cleft Palate Craniofac J*. 2015 Mar;52(2):157-72. doi: 10.1597/13-104. Epub 2014 May 7. PubMed PMID: 24805870.

- Quinlan J, Kaplan F, Swezey N, Goodyer P. LGL1, a novel branching morphogen in developing kidney, is induced by retinoic acid. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Oct;293(4):F987-93. Epub 2007 Aug 1. PubMed PMID: 17670908.
- Rosenfeld Y, Shai Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep;1758(9):1513-22. Epub 2006 Jun 2. PubMed PMID: 16854372.
- Rutenstock EM, Doi T, Dingemann J, Puri P. Prenatal retinoic acid treatment upregulates late gestation lung protein 1 in the nitrofen-induced hypoplastic lung in late gestation. *Pediatr Surg Int*. 2011 Feb;27(2):125-9. doi: 10.1007/s00383-010-2783-2. PubMed PMID: 21069352.
- Sabbagh HJ, Hassan MH, Innes NP, Elkodary HM, Little J, Mossey PA. Passive smoking in the etiology of non-syndromic orofacial clefts: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015 Mar 11;10(3):e0116963. doi: 10.1371/journal.pone.0116963. eCollection 2015. PubMed PMID: 25760440; PubMed PMCID: PMC4356514.
- Sakai D, Dixon J, Achilleos A, Dixon M, Trainor PA. Prevention of Treacher Collins syndrome craniofacial anomalies in mouse models via maternal antioxidant supplementation. *Nat Commun*. 2016 Jan 21;7:10328. doi: 10.1038/ncomms10328. PubMed PMID: 26792133; PubMed Central PMCID: PMC4735750.
- Shen X, Liu RM, Yang L, Wu H, Li PQ, Liang YL, Xie XD, Yao T, Zhang TT, Yu M. The CRISPLD2 gene is involved in cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011 Oct;91(10):918-24. doi: 10.1002/bdra.20840. Epub 2011 Jul 28. PubMed PMID: 21800413.
- Shi J, Jiao X, Song T, Zhang B, Qin C, Cao F. CRISPLD2 polymorphisms are associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a northern Chinese population. *Eur J Oral Sci*. 2010 Aug;118(4):430-3. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00743.x. PubMed PMID: 20662919.
- Shkoukani A, Chen M, Vong A. Cleft lip – a comprehensive review. *Front Pediatr*. 2013 Dec 27; 1:53. doi: 10.3389/fped.2013.00053. Review. PubMed PMID: 24400297; Central PMCID: PMC3873527.
- Smarius B, Loozen C, Manten W, Bekker M, Pistorius L, Breugem C. Accurate diagnosis of prenatal cleft lip/palate by understanding the embryology. *World J Methodol*. 2017 Sep 26;7(3):93-100. doi: 10.5662/wjm.v7.i3.93. eCollection 2017 Sep 26. Review. PubMed PMID: 29026689; PubMed Central PMCID: MC5618146.
- Stefan M. Genetic Linkage Analysis. *Arch Neurol*. 1999;56(6):667-672. doi:10.1001/archneur.56.6.667
- Swindell EC, Yuan Q, Maili LE, Tandon B, Wagner DS, Hecht JT. Crispld2 is required for neural crest cell migration and cell viability during zebrafish craniofacial development. *Genesis*. 2015 Oct;53(10):660-7. doi: 10.1002/dvg.22897. Epub 2015 Sep 5. PubMed PMID: 26297922; PubMed Central PMCID: PMC6258193.
- Trexler M, Bányai L, Patthy L. The LCCL module. *Eur J Biochem*. 2000 Sep;267(18):5751-7. PubMed PMID: 10971586.
- Vásárhelyi V, Trexler M, Patthy L. Both LCCL-domains of human CRISPLD2 have high affinity for lipid A. *Biochimie*. 2014 Feb;97:66-71. doi: 10.1016/j.biochi.2013.09.021. Epub 2013 Oct 1. PubMed PMID: 24090571.



- Wang T, Wang ZQ, Wang L, Yan L, Wan J, Zhang S, Jiang HQ, Li WF, Lin ZF. CRISPLD2 is expressed at low levels during septic shock and is associated with procalcitonin. *PLoS One*. 2013 Jun 14;8(6):e65743. doi: 10.1371/journal.pone.0065743. Print 2013. PubMed PMID: 23799041; PubMed Central PMCID: PMC3683062.
- Wang ZQ, Xing WM, Fan HH, Wang KS, Zhang HK, Wang QW, Qi J, Yang HM, Yang J, Ren YN, Cui SJ, Zhang X, Liu F, Lin DH, Wang WH, Hoffmann MK, Han ZG. The novel lipopolysaccharide-binding protein CRISPLD2 is a critical serum protein to regulate endotoxin function. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6646-56. doi: 10.4049/jimmunol.0802348. Epub 2009 Oct 28. PubMed PMID: 19864597.
- Yoon AJ, Pham BN, Dipple KM. Genetic Screening in Patients with Craniofacial Malformations. *J Pediatr Genet*. 2016 Dec;5(4):220-224. Epub 2016 Sep 14. PubMed PMID: 27895974; PubMed Central PMCID: PMC5123894.
- Yuan Q, Chiquet BT, Devault L, Warman ML, Nakamura Y, Swindell EC, Hecht JT. Craniofacial abnormalities result from knock down of nonsyndromic clefting gene, *crispld2*, in zebrafish. *Genesis*. 2012 Dec;50(12):871-81. doi: 10.1002/dvg.22051. Epub 2012 Aug 21. PubMed PMID: 22887593; PubMed Central PMCID: PMC3535582.
- Zhang H, Kho AT, Wu Q, Halayko AJ, Limbert Rempel K, Chase RP, Swezey NB, Weiss ST and Kaplan F. CRISPLD2 (LGL1) inhibits proinflammatory mediators in human fetal, adult, and COPD lung fibroblasts and epithelial cells. *Physiol Rep*. 2016 Sep;4(17). pii: e12942. doi: 10.14814/phy2.12942. PubMed PMID: 27597766; PubMed PMICID: PMC5027350.
- Zhang H, Swezey NB, Kaplan F. LGL1 modulates proliferation, apoptosis, and migration of human fetal lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Feb 15;308(4):L391-402. doi: 10.1152/ajplung.00119.2014. Epub 2014 Dec 5. PubMed PMID: 25480331.

## 8.2 BOEKEN

- D'Haeninck L, Dekeersmaecker L, Hempen B, Geris K, Goossens R, Vernemmen P. *Biogenie 6.2 deel 1*. Eerste druk. Uitgeverij De Boeck nv, Berchem. 2009: 9-33.
- D'Haeninck L, Dekeersmaecker L, Hempen B, Geris K, Goossens R, Vernemmen P. *Biogenie 6.2 deel 2*. Eerste druk. Uitgeverij De Boeck nv, Berchem. 2009: 9-53.
- Glasser SP. *Essentials of Clinical Research*. Springer Science and Business Media B.V., Alabama. 2008: 181-216.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's HUMAN EMBRYOLOGY*. Fifth edition.
  - [1] Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc., Philadelphia. 2009: 429-472.
  - [2] Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc., Philadelphia. 2009: 108-132.
  - [3] Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc., Philadelphia. 2009: 251- 266.
  - [4] Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc., Philadelphia. 2009: 83-107.

## 8.3 INTERNET BRONNEN

- Bioline Meridian Bioscience [Internet]. (2019). *Gene Expression Analysis*. Geraadpleegd op 23 maart 2019 via <https://www.bioline.com/workflows/gene-expression-analysis>.

- University of Copenhagen [Internet]. (2019). *DISEASES; disease-gene associations mined from literature: CRISPLD2 disease associations*. Geraadpleegd op 9 februari 2019 via <https://diseases.jensenlab.org/Entity?order=textmining,knowledge,experiments&textmining=10&knowledge=10&experiments=10&type1=9606&type2=-26&id1=ENSP00000262424>.
- Encyclopaedia Britannica [Internet]. (2019). *Genetic marker*. Geraadpleegd op 8 december 2018 via <https://www.britannica.com/science/genetic-marker>.
- Gene Ontology and GO Annotations [Internet]. (2018). *GO: 0008201: Heparin binding*. Geraadpleegd op 29 augustus 2018 via: <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0008201>.
- GeneCards, Human Gene Database [Internet]. (2018). *CRISPLD2 Gene*. Geraadpleegd op 2 september 2018 via <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CRISPLD2>.
- HUGO Gene Nomenclature Committee [Internet].
  - (2018). *Symbol Report for CRISPLD2*. Geraadpleegd op 2 september 2018 via [https://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?hgnc\\_id=25248](https://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=25248).
  - (2018). *Gene group: CAP superfamily*. Geraadpleegd op 14 september 2018 via <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/1356>.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM® [Internet]. (2019). \* 612434. Geraadpleegd op 2 september 2018 via <https://www.omim.org/entry/612434>.
- ScienceDaily [Internet]. (2019). *Bioinformatics*. Geraadpleegd op 5 april 2019 via <https://www.sciencedaily.com/terms/bioinformatics.htm>.
- The Free Dictionary by Farlex [Internet]. (2012).
  - *Medical dictionary: multiplex family*. Geraadpleegd op 22 maart 2019 via <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/multiplex+family>.
  - *Medical dictionary: Trio Family*. Geraadpleegd op 23 maart 2019 via <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Trio+Family>.
- The Human Protein Atlas [Internet]. (z.j.). *CRISPLD2*. Geraadpleegd op 29 augustus 2018 via <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000103196-CRISPLD2/tissue>.
- The UniProt Consortium [Internet]. (2002-2019). *UniProtKB - Q9H0B8 (CRLD2\_HUMAN)*. Geraadpleegd op 29 augustus 2018 via <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H0B8#expression>.
- U.S. National Library of Medicine [Internet].
  - [1] (2019). *Clustered RefSNPs (rs) and Other Data Computed in House*. Geraadpleegd op 22 maart 2019 via [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44417/#Content.are\\_refsnp\\_rs\\_numbers\\_unique\\_for](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44417/#Content.are_refsnp_rs_numbers_unique_for).
  - [2] (2019). *Genetics Home Reference: What are whole exome sequencing and whole genome sequencing?* Geraadpleegd op 22 maart 2019 via <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/testing/sequencing>. (2019).
  - [3] (2019). *Genetics Home Reference: What are genome-wide association studies?*. Geraadpleegd op 22 maart 2019 via <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/gwastudies>.

- [4] (2019). *CRISPLD2: cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2 [Homo sapiens (human)]*. Geraadpleegd op 14 september 2018 via [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=83716](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=83716).
- UZ Leuven [Internet]. (2018).
  - [1] *Schisisteam*. Geraadpleegd op 31 juli 2018 via <https://www.uzleuven.be/nl/schisisteam>.
  - [2] *Schisis met enkelzijdige lipspleet en verhemeltespleet*. Geraadpleegd op 28 juli 2018 via <https://www.uzleuven.be/nl/schisis-met-enkelzijdige-lipspleet-en-verhemeltespleet>.
- Walker NJ, Podda S, StatPearls [Internet]. (2018). *Cleft Lip*. Geraadpleegd op 24 augustus 2018 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.kuleuven.ezproxy.kuleuven.be/books/NBK482262/>. PubMed PMID: 29489249.

## 8.4 BROCHURES

- UZ Leuven. (2018).
  - [3] *Behandeling van een verhemeltespleet*. Leuven: UZ Leuven. Referentienummer: 700634.

## 8.5 AFBEELDINGEN

- Glasser SP. *Essentials of Clinical Research*. Springer Science and Business Media B.V., Alabama. 2008: 181-216.
- GeneCards, Human Gene Database [Internet]. (2018). *CRISPLD2 Gene*. Geraadpleegd op 2 september 2018 via <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CRISPLD2>.
- Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev*. 2008 Dec;29(7):865-97. doi: 10.1210/er.2008-0032. Epub 2008 Sep 29. PubMed PMID: 18824526.
- U.S. National Library of Medicine [Internet]. (2019). *dbSNP*. Geraadpleegd op 25 februari 2019 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.
- Phan M, Conte F, Khandelwal KD, Ockeloen CW, Bartzela T, Kleefstra T, van Bokhoven H, Rubini M, Zhou H, Carels CE. Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms?. *Hum Genet*. 2016 Dec;135(12):1299-1327. Epub 2016 Oct 3. Review. PubMed PMID: 27699475; PubMed Central PMCID: PMC5065589.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's HUMAN EMBRYOLOGY*. Fifth edition.
  - Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc., Philadelphia. 2009: 251- 266.
  - Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc., Philadelphia. 2009: 429-472.
- Shkoukani A, Chen M, Vong A. Cleft lip – a comprehensive review. *Front Pediatr*. 2013 Dec 27; 1:53. doi: 10.3389/fped.2013.00053. Review. PubMed PMID: 24400297; Central PMCID: PMC3873527.
- Smarius B, Loozen C, Manten W, Bekker M, Pistorius L, Breugem C. Accurate diagnosis of prenatal cleft lip/palate by understanding the embryology. *World J Methodol*. 2017 Sep 26;7(3):93-100. doi: 10.5662/wjm.v7.i3.93. eCollection 2017 Sep 26. Review. PubMed PMID: 29026689; PubMed Central PMCID: MC5618146.