

ROL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH DURANTE EL DESARROLLO DE
ESTRUCTURAS CRANEOFACIALES

THE ROLE OF NOTCH SIGNALING PATHWAY IN THE DEVELOPMENT OF
CRANIOFACIAL STRUCTURES

BELFRAN ALCIDES CARBONELL MEDINA¹

RESUMEN. La vía de señalización NOTCH es un mecanismo de señalización célula-célula conservado evolutivamente entre las especies, el cual es indispensable para un correcto desarrollo embrionario, mediando una variedad de procesos celulares como proliferación, diferenciación, apoptosis, transformación epitelio- mesénquimal, migración, angiogénesis, mantenimiento de células madre y definición de destino celular. Varios genes componentes de esta vía han sido implicados en el desarrollo de estructuras craneofaciales. El 80% de los pacientes con síndrome de Alagille, presentan mutaciones en el gen que codifica para el receptor Jagged1 (Jag1), acompañado de hipoplasia del tercio medio facial y de craneosinostosis esporádica. Ratonos con mutaciones homocigotas en el gen Jagged2 (Jag2) presentan paladar hendido, como resultado de fusiones ectópicas entre la lengua y los procesos palatinos. Por otro lado, mutaciones inducidas en el gen Hes1 generan defectos en el desarrollo de estructuras craneofaciales, derivadas de las células de la cresta neural craneal (CCNC) que incluyen: paladar hendido, agenesia del hueso frontal, malformación de base craneal y disminución en el tamaño del maxilar superior e inferior. Recientes estudios han evidenciado alteraciones durante la morfogénesis dental de ratones mutantes Jagged2^{-/-}, acompañada de defectos en la citodiferenciación de ameloblastos y deficiente deposición de matriz de esmalte. Estos estudios muestran cómo la vía de señalización NOTCH está implicada en el desarrollo de una variedad de estructuras craneofaciales como paladar, dientes, maxilares y cráneo. Por esta razón, el propósito del presente artículo es presentar una revisión de las diferentes funciones de la vía NOTCH durante el desarrollo de estas estructuras craneofaciales, y de las alteraciones resultantes cuando existen mutaciones en algunos genes componentes de la vía NOTCH, como Jagged2, Jagged1, Hes1, Notch1 y Notch2.

Palabras clave: vía NOTCH, desarrollo craneofacial, palatogénesis, Jagged1.

Carbonell BA. Rol de la vía de señalización NOTCH durante el desarrollo de estructuras craneofaciales. RevFacOdontolUnivAntioq 2014; 26(1): 164-179.

ABSTRACT. The NOTCH signaling pathway is a cell-cell signaling mechanism evolutionarily conserved among species, which is essential for proper embryonic development as it participates in a variety of cellular processes such as proliferation, differentiation, apoptosis, epithelial-mesenchymal transformation, migration, angiogenesis, stem cell maintenance, and cell fate determination. Several genes of this pathway have been implicated in the development of craniofacial structures. 80% of Alagille syndrome patients have mutations in the gene that codes for receptor Jagged1 (Jag1), along with midface hypoplasia and sporadic craniosynostosis. Mice with gene Jagged2 (Jag2) homozygous mutations present cleft palate as a result of ectopic fusions between the tongue and palatal processes. Similarly, mutations induced in the Hes1 gene produce developmental defects in craniofacial structures resulting from cranial neural crest cells (CrnNC), including cleft palate, frontal bone agenesis, cranial base malformation, and reduced size of upper and lower maxilla. Recent studies have shown alterations during tooth morphogenesis in Jagged2^{-/-} mutant mice, accompanied by defects in ameloblasts cytodifferentiation and poor enamel matrix deposition. These studies show that NOTCH signaling pathway is involved in the development of a variety of craniofacial structures such as palate, teeth, maxillaries, and skull. The purpose of this article is to review the different functions of NOTCH signaling during the development of these craniofacial structures and the alterations resulting from mutations in some NOTCH signaling genes such as Jagged2, Jagged1, Hes1, Notch1, and Notch2.

Key words: NOTCH pathway, craniofacial development, palatogenesis, Jagged1.

Carbonell BA. The role of NOTCH signaling pathway in the development of craniofacial structures. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2014; 26(1): 164-179.

1 Odontólogo, especialista en docencia universitaria, candidato a magister en Odontología, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia.

1 Dentist, higher education specialist, magister in Dentistry, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia.

INTRODUCCIÓN

El complejo craneofacial está formado por un conjunto de estructuras que incluyen, a grosso modo, el viscerocráneo (cara) y el neurocráneo.¹ El desarrollo craneofacial es quizás uno de los procesos más complejos durante la embriogénesis, ya que requiere una amplia variedad de interacciones entre los diversos tejidos embrionarios.^{2,3} Los tejidos que dan origen a las estructuras craneofaciales en vertebrados, son derivados de ectodermo, mesodermo, endodermo y, adicionalmente, de las células de la cresta neural craneal (CCNC).^{3,4} Durante la embriogénesis, señales provenientes del ectodermo y el endodermo contribuyen recíprocamente para regular procesos celulares como proliferación, supervivencia, migración y diferenciación del mesénquima facial, a través de interacciones epitelio- mesénquima.^{5,6} El mesénquima facial está compuesto tanto por células de la cresta neural craneal (CCNC) como por células del mesodermo paraxial cefálico.⁷

El mesodermo paraxial cefálico da origen a la musculatura voluntaria facial y células endoteliales, mientras que las CCNC dan origen al tejido conectivo craneofacial, como dentina, pulpa dental, cartílagos faciales, huesos del viscerocráneo, y región anterior de la base craneal.^{3,5,7} Varias vías de señalización han sido implicadas durante el desarrollo del complejo craneofacial, dentro de las más estudiadas tenemos BMP (Bone Morphogenetic protein), SHH (Sonic Hedgehog), WNT (Wingless), TGF-beta (Transforming Growth Factor Beta), FGF (Fibroblast Growth Factor) y más recientemente se ha vinculado la vía de señalización NOTCH.⁸⁻¹¹ La vía de señalización celular NOTCH está implicada durante la etapa embrionaria y posnatal en varios procesos celulares, como proliferación, diferenciación, apoptosis, mantenimiento de células madre indiferenciadas y decisión de destino celular.¹² Mutaciones inducidas en varios genes componentes de la vía de señalización NOTCH como *Jagged2* y *Hes1*, en modelos animales como el ratón, han mostrado alteraciones en el desarrollo de varias estructuras craneofaciales como paladar, dientes, maxilares, base y bóveda craneal.¹³⁻¹⁵

INTRODUCTION

The craniofacial complex is formed by a set of structures including, roughly, the viscerocranium (face) and the neurocranium.¹ Craniofacial development is perhaps one of the most complex processes during embryogenesis since it requires a wide variety of interactions among different embryonic tissues.^{2,3} The tissues that produce craniofacial structures in vertebrates originate from ectoderm, mesoderm, endoderm, and cranial neural crest cells (CrnNC).^{3,4} During embryogenesis, signals from the ectoderm and the endoderm reciprocally contribute to regulate cell processes such as proliferation, survival, migration, and differentiation of facial mesenchyme, through epithelial-mesenchymal interactions.^{5,6} The facial mesenchyme contains cranial neural crest cells (CrnNC) as well as cells of the cephalic paraxial mesoderm.⁷

The cephalic paraxial mesoderm produces voluntary facial muscle and endothelial cells, whereas CrnNC produce craniofacial connective tissue, such as dentin, dental pulp, facial cartilage, viscerocranium bones, and the anterior region of the skull base.^{3,5,7} Several signaling pathways have been associated to the development of the craniofacial complex, some of the most studied are BMP (Bone Morphogenetic Protein), SHH (Sonic Hedgehog), WNT (Wingless), TGF-beta (Transforming Growth Factor Beta), FGF (Fibroblast Growth Factor), and the NOTCH signaling pathway has been recently associated to it.⁸⁻¹¹ The NOTCH signaling pathway is involved in the embryonic and postnatal stages in several cell processes such as proliferation, differentiation, apoptosis, maintenance of undifferentiated stem cells, and cell fate differentiation.¹² Mutations induced in several genes of the NOTCH signaling pathway such as *Jagged2* and *Hes1* in animal models like mice have shown alterations in the development of various craniofacial structures including palate, teeth, jaws, cranial base, and cranial vault.¹³⁻¹⁵

Dentro de las alteraciones craneofaciales más sobresalientes, se han reportado: paladar hendido, alteraciones morfológicas y deficiente formación de matriz de dentina, agenesia de huesos frontales, disminución del tamaño de los maxilares y cierre prematuro de las fisuras craneales, generando un fenotipo de craneosinostosis, involucrándose en esta última alteración la participación del gen *Twist1*.^{10, 13-15} Adicionalmente, entre el 70 y el 80% de los pacientes con síndrome de Alagille, reportan mutaciones en el gen *Jagged1*, el cual codifica un ligando perteneciente a la vía NOTCH.¹⁶ Este síndrome se caracteriza por alteraciones multiorgánicas y craneofaciales, que incluyen frente ancha, barbilla puntiaguda, punta de la nariz bulbosa, apariencia facial de triángulo invertido y craneosinostosis ocasional.¹⁷⁻¹⁹ Este artículo se hizo con el objetivo de revisar el rol de varios genes componentes de la vía de señalización NOTCH, como *Notch1*, *Notch2*, *Jagged1*, *Jagged2* y *Hes1*, durante el desarrollo de estructuras craneofaciales como paladar, dientes, cráneo y maxilares.

Generalidades de la vía de señalización NOTCH

La vía de señalización canónica de NOTCH es un mecanismo de señalización célula-célula conservado evolutivamente, el cual participa en una variedad de procesos celulares como: especificación de destino celular, proliferación, apoptosis, adhesión, transformación epitelio-mesénquimal, migración, angiogénesis, mantenimiento de células madre y homeostasis de tejidos adultos.^{12, 20, 21} La vía de señalización canónica de NOTCH está integrada por diversos componentes, entre los cuales podemos citar: receptores NOTCH, ligandos (DSL), genes diana (genes de la familia bHLH, *Hes* y *Hey*) y otras proteínas reguladoras de la vía descritas en la tabla 1.

The most commonly reported craniofacial alterations include cleft palate, morphological alterations and poor formation of dentin matrix, frontal bone agenesia, decreased maxillaries size, and premature closure of cranial fissures, generating a craniosynostosis phenotype with the participation of the *Twist1* gene.^{10, 13-15} In addition, 70 to 80% of Alagille Syndrome patients report mutations in the *Jagged1* gene, which encodes a ligand belonging to the NOTCH pathway.¹⁶ This syndrome is characterized by multi-organic and craniofacial alterations such as wide forehead, pointed chin, bulbous nose tip, inverted triangle facial appearance, and occasional craniosynostosis.¹⁷⁻¹⁹ The objective of this article was to review the role of NOTCH signaling pathway components, such as *Notch1*, *Notch2*, *Jagged1*, *Jagged2*, and *Hes1*, in the development of craniofacial structures like palate, teeth, skull, and maxillaries.

An overview of the NOTCH signaling pathway

Canonical NOTCH signaling pathway is an evolutionarily conserved mechanism of cell-cell signaling, which participates in a variety of cell processes such as cell fate specification, proliferation, apoptosis, adhesion, epithelial-mesenchymal transformation, migration, angiogenesis, stem cells maintenance, and homeostasis of adult tissues.^{12, 20, 21} Canonical NOTCH signaling pathway contains several components, including NOTCH receptors, ligands (DSL), target genes (genes of the bHLH, *Hes* and *Hey* family), and other regulatory proteins of this pathway as described in table 1.

Tabla 1. Componentes de la vía NOTCH canónica por especies^{12, 22}

Components	Aves	Mamíferos	Drosophila M.	C. Elegans
Receptores	Notch1	Notch1	NOTCH	Lin-12
		Notch2		
	Notch2	Notch3		GLP-1
		Notch4		
Ligandos	Serrate1 (Jagged1)	Jagged1	Serrate	APX-1
	Serrate2 (Jagged2)	Jagged2	Delta	LAG-1
	Delta1	Delta1		ARG-1
	Delta4	Delta3		DSL-1
		Delta4		
Genes blanco	Hairy1 (Hes1)	Hes1 - 7	E (psl) bHLH	REF-1
	Hairy2 (Hes2)			
	Hairy5 (Hes)			
	Hairy6 (Hes6)			
	Hey1	Hey1		
	Hey2	Hey2		
	HeyL	HeyL		
Proteínas reguladoras	Lunatic, manic and radical fringe	Lunatic, manic and radical fringe	Fringe	No identificados

Table 1. Components of the canonical Notch signaling pathway per species^{12, 22}

Components	Birds	Mammals	Drosophila M.	C. Elegans
Receptors	Notch1	Notch1	NOTCH	Lin-12
		Notch2		
	Notch2	Notch3		GLP-1
		Notch4		
Ligands	Serrate1 (Jagged1)	Jagged1	Serrate	APX-1
	Serrate2 (Jagged2)	Jagged2	Delta	LAG-1
	Delta1	Delta1		ARG-1
	Delta4	Delta3		DSL-1
		Delta4		
Target genes	Hairy1 (Hes1)	Hes1 - 7	E (psl) bHLH	REF-1
	Hairy2 (Hes2)			
	Hairy5 (Hes)			
	Hairy6 (Hes6)			
	Hey1	Hey1		
	Hey2	Hey2		
	HeyL	HeyL		
Regulatory proteins	Lunatic, manic and radical fringe	Lunatic, manic and radical fringe	Fringe	Unidentified

En mamíferos, como humanos y ratones, se han descrito cuatro receptores NOTCH (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3* y *Notch4*), cinco ligandos (*Jag1*, *Jag2*, *Delta1*, *Delta3* y *Delta4*) y varios genes diana, dentro de los más estudiados se incluyen *Hes1*, *Hes5* y *Hey1*.²³ El receptor de la vía NOTCH es una proteína transmembranal que recibe señales de ligandos transmembranales que son expresados en células vecinas.²²

In mammals, like humans and mice, four NOTCH receptors (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, and *Notch4*), five ligands (*Jag1*, *Jag2*, *Delta1*, *Delta3*, and *Delta4*) and several target genes have been described; some of the most studied are *Hes1*, *Hes5*, and *Hey1*.²³ The NOTCH pathway receptor is a transmembrane protein that receives signals of transmembrane ligands which are expressed in neighboring cells.²²

El contacto directo entre el receptor y el ligando desencadena una serie de eventos proteolíticos a nivel del receptor NOTCH, provocando que el dominio intracelular del receptor se tras lo que al núcleo donde activa la transcripción de los genes diana *Hes* y *Hey* (figura 1).²² Las señales que son transducidas por estos receptores tienen un papel central en diversas etapas del desarrollo embrionario.²⁴ De manera significativa, tanto las deficiencias y anormales aumentos de señalización NOTCH se han asociado con anomalías de desarrollo y cáncer.^{18, 25-28}

Direct contact of receptor and ligand triggers a series of proteolytic events at the level of the NOTCH receptor, causing the receptor's intracellular domain to translocate to the nucleus where it activates transcription of target genes *Hes* and *Hey* (figure 1).²² The signals transduced by these receptors play a pivotal role in various stages of embryonic development.²⁴ Deficiencies and abnormal growth of NOTCH signaling have been significantly associated with developmental anomalies and cancer.^{18, 25-28}

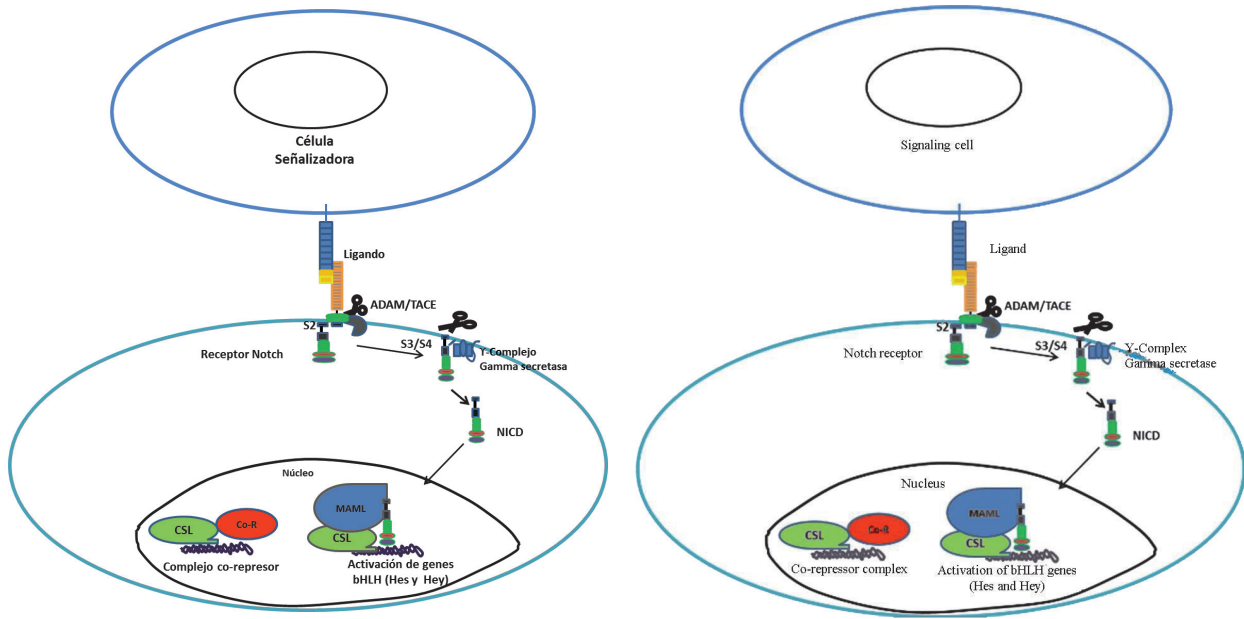


Figura 1. Activación canónica de la vía de señalización NOTCH

Figure 1. Canonic activation of NOTCH signaling pathway

El contacto entre el ligando de una célula señalizadora (célula en la parte superior) y el receptor NOTCH de una célula vecina (célula inferior), genera una serie de eventos proteolíticos a nivel de los dominios extracelular e intracelular del receptor NOTCH, provocando que el dominio intracelular NOTCH (NICD), se trasloque al núcleo, activando la transcripción de los genes de la familia bHLH, *Hes* y *Hey*, a través de la interacción con el factor de transcripción CSL y el coactivador MAML.

Contact between the ligand of a signaling cell (at the top) and the NOTCH receptor of a neighboring cell (at the bottom) produces a series of proteolytic events at the extracellular and intracellular domains of the NOTCH receptor, causing the NOTCH intracellular domain (NICD) to translocate to the nucleus, activating the transcription of genes of the bHLH, *Hes* and *Hey* family through interaction with CSL transcription factor and the MAML co-activator.

Vía NOTCH en el desarrollo del paladar secundario

El desarrollo del paladar secundario toma lugar alrededor del estadio E12-E15 en ratones, correspondiente al periodo comprendido entre la 8.^a y la 12.^a semana de gestación en humanos.²⁷ Durante este periodo, los procesos palatinos que emergen de los bordes internos de las prominencias maxilares, crecen verticalmente a lado y lado de la lengua, posteriormente se elevan y se posicionan horizontalmente sobre el dorso de la lengua, para finalmente contactar uno con otro y fusionarse, dando lugar a una división entre la cavidad oral y la cavidad nasal.²⁸ Cada uno de estos pasos durante la palatogénesis son altamente regulados por varias vías de señalización, y un fallo durante el crecimiento, elevación, contacto o fusión de los procesos palatinos, genera una fisura palatina.²⁷

Durante el desarrollo normal del paladar, se ha detectado la expresión de varios genes componentes de la vía de señalización NOTCH.¹⁰ Los genes que codifican para los receptores *Notch2* y *Notch3*, se expresan en el mesénquima lingual, procesos maxilares, mandibulares y palatinos desde E12.5 hasta E14.5. Contrario a este patrón de expresión mesénquimal, *Jag2* y *Notch1* son coexpresados predominantemente en el epitelio lingual, maxilar, palatino y epitelio lateral mandibular.¹⁰ Ratones con mutaciones homocigotas *Jag2*^{-/-}, exhiben paladar hendido acompañado de fusiones ectópicas entre la región dorsal de la lengua y los procesos palatinos.¹³ El fenotipo de paladar hendido en estos mutantes es atribuido a estas fusiones ectópicas que no permiten una elevación adecuada de los procesos palatinos y, por consiguiente, la génesis de la hendidura palatina.^{10, 13}

Fusiones patológicas entre el paladar y la lengua han sido descritas en humanos.^{29, 30} Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares involucrados en este proceso patológico, no están totalmente claros. Casey, en el 2006, identificó en el modelo de ratón altos niveles del receptor *Notch1* activado durante el proceso de diferenciación de las células del periderma lingual,

The NOTCH pathway in the development of secondary palate

The development of secondary palate takes place around stage E12-E15 in mice, corresponding to the period between the 8th and 12th week of gestation in humans.²⁷ During this period, the palatal processes generated at the internal edges of the maxillary prominences grow vertically on both sides of the tongue, then they elevate and position horizontally on the dorsum of tongue, to finally contact each another and merge, producing a split between the oral cavity and the nasal cavity.²⁸ Each of these palatogenesis steps are highly regulated by several signaling pathways, and any failure during growth, lifting, contact or fusion of the palatal processes produces cleft palate.²⁷

The expression of several NOTCH signaling pathway genes has been detected during normal palate development.¹⁰ Genes that encode for *Notch2* and *Notch3* receptors are expressed in the lingual mesenchyme and in mandibular, maxillary and palatal processes from E12.5 to E14.5. Contrary to this pattern of mesenchymal expression, *Jag2* and *Notch1* are co-expressed mainly in the lingual, maxillary and palatine epithelium and in the mandibular lateral epithelium.¹⁰ Homozygous mice with *Jag2*^{-/-} mutations show cleft palate accompanied by ectopic fusions between the dorsal region of the tongue and the palatal processes.¹³ The cleft palate phenotype in these mutants is attributed to such ectopic fusions, which inhibit proper elevation of the palatal processes and therefore generate cleft palate.^{10, 13}

Pathological palate-tongue fusions have been described in humans.^{29, 30} However, the cellular and molecular mechanisms involved in this pathology are not totally clear. In 2006, Casey identified in a mouse high levels of the *Notch1* receptor activated during the differentiation process of cells of the lingual,

maxilar, palatino y mandibular, desde E11.5 hasta E14.5.¹⁰ Los ratones mutantes *Jag2*^{sm/sm} homocigotos, además de mostrar paladar hendido y fusiones entre la lengua y los procesos palatinos, presentan fusiones aberrantes entre los procesos maxilares y mandibulares, acompañado de reducción de los niveles activados de *Notch1* durante la formación del periderma oral, con desorganización y pérdida de la morfología plana de las células peridérmicas que recubren el paladar y la lengua.¹⁰

Lo anterior sugiere a *Jag2* como el ligando responsable de la activación de *Notch1* y de la diferenciación del periderma oral. Por lo tanto, la señalización *Jag2-Notch1* parece ser tempo-espacialmente regulada durante el desarrollo temprano del paladar, para prevenir prematuras adhesiones entre los procesos palatinos con el resto del epitelio oral en contacto, y así facilitar la elevación, contacto, adhesión y fusión de los procesos palatinos.¹⁰ Adicionalmente, otros autores han mostrado que la vía de señalización NOTCH, mediada por *Jag2* junto a IRF6 (transcription factor interferón regulatory factor 6), funcionan como vías de señalización convergentes durante el proceso de diferenciación del epitelio oral, durante el periodo de palatogénesis.³¹

Otro de los genes pertenecientes a la vía de señalización NOTCH implicados en el desarrollo de estructuras craneofaciales como el paladar, es el gen *Hes1*.¹⁵ Ratones con mutaciones homocigotas *Hes1*^{-/-}, presentan alteraciones durante el proceso de palatogénesis secundaria, caracterizado por un crecimiento deficiente y una prematura elevación y reorientación horizontal de las crestas palatinas, lo cual genera un paladar hendido, dado que el deficiente tamaño de las crestas palatinas no permite que estas puedan contactar y fusionarse en la mayoría de los mutantes.¹⁵ Adicionalmente, estos ratones mutantes exhiben defectos en el desarrollo de la base craneal relacionados con agenesia del hueso esfenoides. Los mecanismos celulares y moleculares específicos involucrados en el fenotipo de estos mutantes aún es desconocido. Sin embargo, los autores sugieren que una diferenciación temprana de las células de la cresta neural craneal con una reducida proliferación, pudo haber inducido la elevación prematura y deficiente tamaño de las crestas palatinas.¹⁵

palatal, maxillary and mandibular periderm, from E11.5 to E14.5.¹⁰ Mutant *Jag2*^{sm/sm} homozygous mice, in addition to cleft palate and palate-tongue fusions, show aberrant fusions between the maxillary and mandibular processes accompanied by reduction of *Notch1* activated levels during the formation of oral periderm, with disorganization and loss of the flat morphology of the periderm cells that cover the palate and tongue.¹⁰

This suggests that *Jag2* is the ligand responsible for activation of *Notch1* and oral periderm differentiation. Therefore the *Jag2-Notch1* signaling appears to be temporally and spatially regulated during early palate development, to prevent premature adhesions between palatal processes and the rest of the oral epithelium in contact, and thus facilitate lifting, contact, adhesion and fusion of palatal processes.¹⁰ In addition, other authors have shown that NOTCH signaling pathway, mediated by *Jag2* and IRF6 (transcription interferon regulatory factor 6) function as signaling pathways converging during the process of oral epithelium differentiation during palatogenesis.³¹

Another NOTCH signaling pathway gene involved in the development of craniofacial structures like palate is gene *Hes1*.¹⁵ Mice with homozygous mutations *Hes1*^{-/-} show alterations during secondary palatogenesis, characterized by poor growth, premature lifting, and horizontal reorientation of palatal ridges, which generates cleft palate since the small size of palatal ridges thwarts their contacting and merging in most mutants.¹⁵ In addition, these mutant mice show defects in cranial base development associated with agenesis of the sphenoid bone. The specific cellular and molecular mechanisms involved in these mutants' phenotype are still unknown. However, the authors suggest that early differentiation of cranial neural crest cells with reduced proliferation may have induced premature elevation and inadequate size of the palatal ridges.¹⁵

Vía de señalización NOTCH durante la odontogénesis: *Jagged2* regula la diferenciación y morfogénesis dental.

Además de la implicación de la vía NOTCH en el desarrollo de estructuras como paladar, varios componentes de esta vía de señalización han sido identificados durante el desarrollo dental de ratones. Varios estudios han evidenciado que los componentes de la vía de señalización NOTCH se expresan durante el desarrollo dental de ratones. La expresión de *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*³², *Dll1*³³, *Jag1*³⁴ y *Jag2*^{35, 36} prefiguran en el desarrollo dental en la subdivisión de regiones ameloblásticas y no ameloblásticas, en las etapas iniciales del desarrollo dental (tabla 2). Esto se hace evidente durante la etapa de citodiferenciación, en la que varios receptores NOTCH y varios de sus ligandos, muestran patrones de expresión complementarios: la expresión de *Notch1* se limita al estrato intermedio, mientras que *Dll1* y *Jag2* están expresados en la capa adyacente al epitelio dental interno (figura 2).^{33, 35, 36}

Del mismo modo, en el mesénquima dental, *Dll1* se expresa en odontoblastos en proceso de diferenciación, mientras que los genes NOTCH se expresan predominantemente en la capa sub-odontoblástica.³⁴ Estos resultados sugieren que los receptores y ligandos de la vía NOTCH participan en los procesos de diferenciación celular durante el desarrollo dental. Recientes estudios han analizado la expresión, regulación y función del gen *Jag2* en desarrollo dental de ratones.¹⁴ Estos estudios han mostrado que *Jag2* se expresa en las células epiteliales, que darán lugar a la producción de esmalte (ameloblastos) durante las primeras etapas del desarrollo dental.

Así mismo, en experimentos de recombinación tisular, se evidenció que la expresión de *Jag2* en el epitelio está regulada por señales derivadas del mesénquima.¹⁴ Cultivos in vitro de explantes de epitelio dental muestran cómo la aplicación local de FGF estimula la expresión de *Jag2*, mientras que la aplicación de BMP genera un efecto contrario. Lo anterior indica que durante el desarrollo

NOTCH signaling pathway during odontogenesis: *Jagged2* regulates tooth morphogenesis and differentiation

In addition to NOTCH pathway participation in the development of structures like palate, various components of this signaling pathway have been identified during tooth development in mice. Several studies have shown that components of the NOTCH signaling pathway are expressed during tooth development in mice. The expression of *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*³², *Dll1*³³, *Jag1*³⁴ and *Jag2*^{35, 36} prefigure ameloblastic and non-ameloblastic region subdivision in the initial stages of tooth development (table 2). This is evident during the cytodifferentiation stage, in which several NOTCH receptors and some of their ligands show complementary expression patterns: *Notch1* expression is limited to the intermediate layer, while *Dll1* and *Jag2* are expressed in the layer adjacent to the inner dental epithelium (figure 2).^{33, 35, 36}

Similarly, in the dental mesenchyme, *Dll1* is expressed in odontoblasts in process of differentiation, while NOTCH genes are expressed in the sub-odontoblastic layer mainly.³⁴ These findings suggest that receptors and ligands of the NOTCH pathway participate in the processes of cellular differentiation during tooth development. Recent studies have examined the expression, regulation, and function of *Jag2* gene in tooth development in mice.¹⁴ These studies have shown that *Jag2* is expressed in epithelial cells, enabling enamel production (ameloblasts) during the early stages of tooth development.

Likewise, tissue recombination experiments have shown that *Jag2* expression in the epithelium is regulated by signals from the mesenchyme.¹⁴ In vitro cultures of dental epithelium explants show that local application of FGF stimulates *Jag2* expression, while the application of BMP produces the opposite effect. This suggests that during tooth development,

dental, la expresión del gen *Jag2* en el mesénquima es controlado por FGF y BMP desde el mesénquima. Ratonés mutantes homocigotos *Jag2* presentan una variedad de anomalías dentales.¹⁴ En molares, la morfología de la corona es deforme, con cúspides adicionales y en incisivos la citodiferenciación de ameloblastos y la deposición de matriz de esmalte son inhibidas.

the *Jag2* gene expression is controlled by FGF in mesenchyme and by BMP from mesenchyme. Homozygous *Jag2* mutant mice show a variety of dental anomalies.¹⁴ Their molars' crown morphology is deformed, with additional cusps, and their incisors ameloblast cytodifferentiation is inhibited as well as enamel matrix deposition.

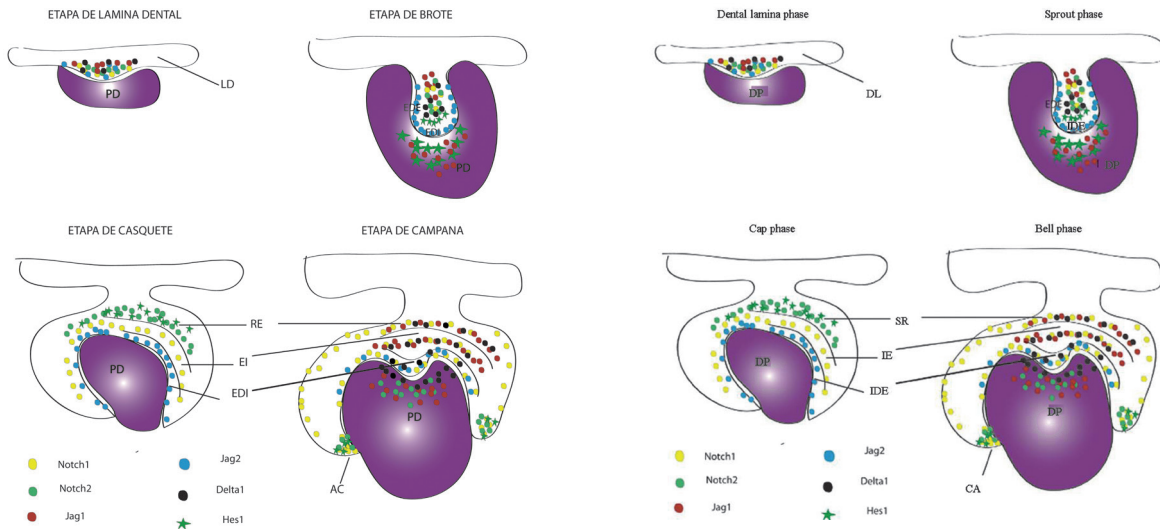


Figura 2. Patrones de expresión de receptores, ligandos y genes blancos de la vía NOTCH durante el desarrollo dental

En este esquema se ilustra, con círculos de colores, las regiones donde se expresan los genes *Notch1*, *Notch2*, *Jag1*, *Jag2*, *Delta1* y *Hes1* durante las etapas del desarrollo dental. LD (lámina dental), PD (papila dental), EDE (epitelio dental externo), EDI (epitelio dental interno), RE (retículo estrellado), EI (estrato intermedio). Las convenciones de colores son mostradas en la parte inferior del esquema.

Figure 2. Patterns of expression of NOTCH pathway receptors, ligands, and target genes during tooth development

This diagram uses colored dots to show the regions where *Notch1*, *Notch2*, *Jag1*, *Jag2*, *Delta1* and *Hes1* genes are expressed during the stages of tooth development. DL (dental lamina), DP (dental papilla), EDE (external dental epithelium), IDE (internal dental epithelium), SR (stellate reticulum), IL (intermediate layer). Color legends are shown at the bottom of the diagram.

Estos resultados demuestran que la vía NOTCH, mediada por *Jag2*, es indispensable para una correcta odontogénesis.^{14, 37, 38} Estudios recientes han permitido evidenciar una nueva función de la vía NOTCH mediada por el receptor NOTCH1 y una de sus proteínas efectoras *Hes1*, en el desarrollo el asa cervical. Mediante el uso de un inhibidor de la vía NOTCH, conocido como DAPT en modelos murinos in vitro e in vivo, se demostró

These results demonstrate that the NOTCH pathway, mediated by *Jag2*, is essential for correct odontogenesis.^{14, 37, 38} Recent studies have shown a new function of the NOTCH pathway mediated by the *Notch1* receptor and one of its *Hes1* effector proteins in the development of cervical loop. Using a NOTCH pathway inhibitor known as DAPT on in vitro and in vivo mouse models demonstrated

Table 2. Expression and function of NOTCH pathway component genes during tooth development

Stages of tooth development in mice	Patterns of expression of NOTCH pathway components during odontogenesis	Reported or related functions
Dental lamina (E11)	Expression of <i>Notch1</i> , <i>Notch2</i> and <i>Notch3</i> in dental lamina ³⁴	
	<i>Jag2</i> in dental epithelium ¹⁴	
	<i>Jag1</i> in dental epithelium ³⁶	
	<i>Delta1</i> in dental lamina ³⁵	
Bud (E12, E13-5, 5)	Expression of <i>Notch1</i> , <i>Notch2</i> and <i>Notch3</i> in entire dental epithelium ³⁴	
	<i>Jag2</i> in internal and external dental epithelium ¹⁴	
	<i>Jag1</i> in dental epithelium and mesenchyme, there is no expression in dental epithelium adjacent to mesenchyme. ³⁶ Also, <i>Delta1</i> in dental epithelium ³⁵	
Cap (E14, E15-5, 5)	<i>Hes1</i> in condensed mesenchyme and epithelium which will result in stellate reticulum	<i>Jag2</i> apparently regulates apoptosis levels mediated by enamel node and tooth morphogenesis ¹⁴
	<i>Notch1</i> in intermediate layer and <i>Notch2</i> in stellate reticulum ³⁴	
Bell (E16, 5 - E18, 5)	<i>Jag2</i> in internal dental epithelium ¹⁴ and <i>Jag1</i> in enamel organ ³⁶	<i>Jag2</i> is involved in odontoblasts and ameloblasts differentiation and in the subsequent deposit of matrix of enamel and dentin ¹⁴
	<i>Notch1</i> in enamel organ and cervical loop ³⁴	
	<i>Notch2</i> and <i>Notch3</i> in enamel organ and dental papilla; also, <i>Notch2</i> in cervical loop ³⁴	
	<i>Jag2</i> in internal dental epithelium ¹⁴ <i>Jag1</i> in intermediate layer, stellate reticulum, dental follicle and dental papilla ³⁶ <i>Delta1</i> in enamel organ, inner dental epithelium, stellate reticulum and intermediate layer. Also, its presence in mesenchyme will result in pre-odontoblasts and odontoblasts ³⁵	

Tabla 2. Expresión y función de genes componentes de la vía NOTCH durante el desarrollo dental

Etapas del desarrollo dental en ratones	Patrones de expresión de componentes de la vía NOTCH en odontogénesis	Funciones reportadas o relacionadas
Lámina dental (E11)	Expresión de <i>Notch1</i> , <i>Notch2</i> y <i>Notch3</i> en lámina dental ³⁴	
	<i>Jag2</i> en epitelio dental ¹⁴	
	<i>Jag1</i> en epitelio dental ³⁶	
	<i>Delta1</i> en lámina dental ³⁵	
Brote (E12,5–E13,5)	Expresión de <i>Notch1</i> , <i>Notch2</i> y <i>Notch3</i> en todo el epitelio dental ³⁴	
	<i>Jag2</i> en epitelio dental interno y externo ¹⁴	
	<i>Jag1</i> en epitelio dental y mesénquima, no se observa expresión en epitelio dental adyacente al mesénquima. ³⁶ Además, <i>Delta1</i> en epitelio dental ³⁵	
Casquete (E14,5–E15,5)	<i>Hes1</i> en mesénquima condensado y epitelio que dará lugar al retículo estrellado	<i>Jag2</i> aparentemente regula los niveles de apoptosis mediados por el nodo del esmalte y la morfogénesis dental ¹⁴
	<i>Notch1</i> en estrato intermedio y <i>Notch2</i> en retículo estrellado ³⁴	
Campana (E16,5–E18,5)	<i>Jag2</i> en epitelio dental interno ¹⁴ y <i>Jag1</i> en órgano del esmalte ³⁶	<i>Jag2</i> está involucrado en la diferenciación de odontoblastos, ameloblastos y la subsecuente deposición de matriz de esmalte y dentina ¹⁴
	<i>Notch1</i> en órgano del esmalte y asa cervical ³⁴	
	<i>Notch2</i> y <i>Notch3</i> en órgano del esmalte y papila dental, adicionalmente <i>Notch2</i> en asa cervical ³⁴	
	<i>Jag2</i> en epitelio dental interno ¹⁴ <i>Jag1</i> en estrato intermedio, retículo estrellado, folículo dental y papila dental ³⁶ <i>Delta1</i> en órgano del esmalte, epitelio dental interno, retículo estrellado y estrato intermedio. Además, se observa su presencia en mesénquima que dará lugar a pre-odontoblastos y odontoblastos ³⁵	

que el bloqueo de la expresión del gen *Hes1* dio lugar a un incremento en los niveles de apoptosis y una disminución en la proliferación de células madre del asa cervical.³⁹ Estos resultados indican que la vía NOTCH a través de *Hes1* controla la supervivencia de las células madre epiteliales del asa cervical en desarrollo.³⁹

that blocking the *Hes1* gene expression resulted in an increase in apoptosis levels and a decrease in proliferation of stem cells from the cervical loop.³⁹ These findings suggest that, by means of *Hes1*, the NOTCH pathway controls survival of epithelial stem cells of the developing cervical loop.³⁹

Implicación de la vía NOTCH en el fenotipo craneofacial de pacientes con síndrome de Alagille y Hajdu Cheney

El síndrome de Alagille es un trastorno autosómico dominante que afecta el sistema hepático, cardíaco, esquelético, renal, oftalmológico y el desarrollo facial.^{17, 40} El síndrome de Alagille es causado predominantemente por una haploinsuficiencia del gen *Jagged1*.^{16, 19, 41} Sin embargo, mutaciones en el gen *Notch2* han sido identificadas en un subgrupo de pacientes con este síndrome.^{18, 42, 43} El síndrome de Alagille se caracteriza por alteraciones craneofaciales que incluyen: frente ancha, barbilla puntiaguda, punta de la nariz bulbosa, hipoplasia del tercio medio facial que da la apariencia facial de triángulo invertido y craneosinostosis ocasional.^{17-19, 40, 44} El clásico rasgo facial de V invertida es encontrado en un 95% de los pacientes que son diagnosticados, basado en el fenotipo de conducto intrabiliar hepático.^{40, 45} Estos rasgos faciales sugieren que *Jagged1* participa en la morfogénesis del tercio medio facial.

Varios modelos animales, como ratón y zebrafish, han sido utilizados para modelar las características del síndrome de Alagille, dentro de éstas las craneofaciales.⁴⁶⁻⁴⁸ El uso del modelo de ratón ha permitido identificar cuál es la función que desarrolla *Jagged1* durante la morfogénesis facial. La delección de *Jagged1* en células de la cresta neural craneal usando un ratón *Wnt1-cre; Jag1 Flox/Flox* permitió recapitular el fenotipo de hipoplasia del tercio medio facial de pacientes con síndrome de Alagille.⁴⁹ La etiología de la hipoplasia del tercio medio facial en estos ratones, fue una consecuencia de una proliferación celular reducida de las CCNC en el tercio medio facial, aberrante vasculogénesis y deficiente producción de matriz extracelular en los procesos palatinos, asociados con un crecimiento anormal de la región facial.⁴⁹ Específicamente, se evidenció tamaño disminuido del maxilar superior y deficiente elongación de los procesos palatinos.

Con respecto al desarrollo de la bóveda craneal, *Jagged1* ha sido implicado en el mantenimiento indiferenciado

Involvement of the NOTCH pathway in the craniofacial phenotype of patients with Alagille Syndrome and Hajdu-Cheney Syndrome

Alagille Syndrome is an autosomal dominant disorder that affects the hepatic, cardiac, skeletal, kidney, and eye systems as well as facial development.^{17, 40} Alagille Syndrome is caused by haploinsufficiency of gen *Jagged1* mainly.^{16, 19, 41} However, gene *Notch2* mutations have been identified in a subgroup of patients with this syndrome.^{18, 42, 43} Alagille Syndrome is characterized by craniofacial abnormalities including wide forehead, pointed chin, bulbous nose tip, and midfacial third hypoplasia, producing an inverted triangle facial appearance of occasional craniosynostosis.^{17-19, 40, 44} The typical inverted V face feature is found in 95% of diagnosed patients, based on the intrabiliary hepatic duct phenotype.^{40, 45} These facial features suggest that *Jagged1* is involved in midface morphogenesis.

Several animals like zebrafish and mice have been used to model Alagille Syndrome characteristics, including the craniofacial ones.⁴⁶⁻⁴⁸ Mice models have allowed identifying the role of *Jagged1* during facial morphogenesis. Deletion of *Jagged1* in cranial neural crest cells using a *Wnt1-cre; Jag1 Flox/Flox* mouse allowed recapitulating the midface hypoplasia phenotype in Alagille Syndrome patients.⁴⁹ The etiology of midface hypoplasia in these mice was a consequence of a reduced proliferation of CrnNC in the midface, aberrant vasculogenesis, and poor production of extracellular matrix in palatal processes, associated with abnormal growth in the facial area.⁴⁹ Decreased maxilla size and poor elongation of palatal processes were also evident.

Regarding cranial vault development, *Jagged1* has been involved in the undifferentiated maintenance

de células pre ontogénicas inmaduras durante el desarrollo de las suturas craneales, garantizando así un desarrollo armonioso entre el crecimiento del cerebro y el cierre de las suturas en modelos de ratón.⁵⁰ Estos estudios han evidenciado que *Jagged1* funciona como un gen blanco del factor de transcripción *TWIST1* para regular la expresión de genes como *β-catenina*, *Smad 1/3/8* y *PrK1/2*, implicados en la diferenciación de osteoblastos de la bóveda craneal.⁵⁰ De esta forma, *Jagged1* mantiene indiferenciadas las células precursoras osteoblásticas y, por consiguiente, la permanencia de las suturas craneales. Mutaciones en *Jagged1* resultan entonces en un cierre prematuro de las suturas coronales, generando así un fenotipo de craneosinostosis como el observado de manera esporádica en el síndrome de Alagille.^{44, 50}

Otro de los síndromes con alteraciones en el desarrollo de estructuras craneofaciales, es el síndrome de Hajdu-Cheney.^{51, 52} Este síndrome presenta una herencia autosómica dominante, aunque se pueden encontrar casos esporádicos. Los pacientes con este síndrome presentan una mutación puntual en el exón 34 del gen *Notch2*, lo que genera un defecto en la síntesis del dominio PEST de la región intracelular de la proteína *Notch2*.⁵³ El dominio PEST está involucrado en la ubiquitinación y degradación de la porción intracelular del receptor NOTCH, por lo tanto, la ausencia de este dominio permite que la activación de la vía NOTCH no sea regulada adecuadamente.²² El fenotipo craneofacial de los pacientes con síndrome de Hajdu-Cheney, incluye las siguientes características: Dismorfismo facial, micrognatismo, deficiente cierre de suturas craneales y formación de huesos wormianos.⁵¹ Hasta la fecha no se ha evidenciado la función que cumple el gen *Notch2* durante el desarrollo de las estructuras craneofaciales. Por lo tanto, es necesario que, mediante el uso de modelos animales, se investiguen los mecanismos celulares y moleculares alterados durante el desarrollo de las estructuras craneofaciales afectadas en este síndrome.

CONCLUSIONES

Los estudios actuales sobre alteraciones en genes componentes de la vía NOTCH y su implicación en el

of immature pre-ontogenic cells during development of cranial sutures, ensuring a harmonious development of brain growth and sutures closing in mouse models.⁵⁰ These studies have shown that *Jagged1* works as a target gene of the *TWIST1* transcription factor to regulate the expression of genes such as *β-catenin*, *Smad 1/3/8* and *PrK1/2*, involved in cranial vault osteoblast differentiation.⁵⁰ Hence *Jagged1* maintains osteoblastic precursor cells undifferentiated and therefore it keeps cranial sutures. Then, *Jagged1* mutations result in premature closure of coronal sutures, generating a craniosynostosis phenotype, as sporadically observed in Alagille Syndrome.^{44, 50}

Another syndrome with alterations in craniofacial structures development is the Hajdu-Cheney.^{51, 52} This syndrome has autosomal dominant inheritance, although sporadic cases can also be found. Patients with this syndrome have a point mutation in exon 34 of gene *Notch2*, which produces a defect in the PEST domain synthesis of the intracellular region of protein *Notch2*.⁵³ The PEST domain is involved in the ubiquitination and degradation of the NOTCH receptor's intracellular portion; therefore, absence of this domain impedes the proper regulation of NOTCH pathway activation.²² The craniofacial phenotype of Hajdu-Cheney syndrome patients includes the following features: facial dimorphism, micrognathism, poor closure of cranial sutures, and wormian bones formation.⁵¹ The role of *Notch2* gene during craniofacial structures development has not been established to date. Therefore, it is necessary to study animal models to analyze the cellular and molecular mechanisms that are altered during development of the craniofacial structures affected in this syndrome.

CONCLUSIONS

Current studies on NOTCH pathway's genes alterations and their involvement in craniofacial

desarrollo de estructuras craneofaciales, como paladar, bóveda craneal, base craneal y dientes, se limita a un número restringido de genes que incluyen *Jagged2*, *Jagged1*, *Notch1*, *Notch2* y *Hes1*. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares implicados en cada alteración del desarrollo resultante de la pérdida de función de cada uno de estos genes, aún no es clara. Por lo que es necesario que, mediante el uso de modelos animales como ratón u otros modelos que incluyen Zebrafish y pollo, se investigue la expresión de cada uno de los genes componentes de la vía NOTCH en cada etapa del desarrollo y, por medio de estudios de pérdida y ganancia de función génica, se establezca la función que desarrolla cada gen, tanto en etapas tempranas como tardías del desarrollo craneofacial.

Por otro lado, además de la necesidad de continuar ahondando en los aspectos celulares y moleculares de la vía NOTCH en el desarrollo craneofacial, se hace necesario hacer estudios genéticos en poblaciones afectadas con defectos craneofaciales, como paladar hendido y defectos de asimetría facial, en donde se investigue la presencia de mutaciones en varios de los genes de la vía NOTCH que han sido relacionados con estos defectos. Teniendo en cuenta los vacíos aún existentes referentes a la función de la vía NOTCH en el desarrollo craneofacial, es posible plantear los siguientes interrogantes que nos permitan orientar un proceso investigativo: ¿Cuál es la prevalencia de mutaciones en el gen *Hes1* y *Jagged2* en pacientes con paladar hendido? ¿Además de los pacientes con Alagille, en qué otros pacientes con asimetría facial se pueden identificar mutaciones en genes componentes de la vía NOTCH, además de *Jagged1* y *Notch2*?

CORRESPONDENCIA

Belfran Alcides Carbonell
 Universidad Nacional de Colombia
 Carrera 34 N.º 25C-12
 Bogotá D. C., Colombia
 Correo electrónico: bacarbonellm@unal.edu.co

structures development, such as palate, cranial vault, cranial base, and teeth, is limited to a restricted number of genes, including *Jagged2*, *Jagged1*, *Notch1*, *Notch2*, and *Hes1*. However, the cellular and molecular mechanisms involved in each development alteration as a result of function loss in each of these genes are not yet clear. It is therefore necessary to use animal models such as mice, chicken and zebrafish to analyze the expression of each NOTCH pathway gene in every stage of development and, through studies of loss and gain of gene function, to establish the function of each gene in early and late stages of craniofacial development.

On the other hand, in addition to further research on the cellular and molecular aspects of NOTCH pathway in craniofacial development, it is necessary to perform genetic studies on populations affected by craniofacial defects such as cleft palate and facial asymmetry, in order to study the presence of mutations in several NOTCH pathway genes that have been associated with these defects. Taking into account the existing gaps concerning the function of NOTCH pathway in craniofacial development, it is possible to raise the following questions in order to direct new research: what is the prevalence of genes *Hes1* and *Jagged2* mutations in cleft palate patients? Apart from Alagille patients, in what other patients with facial asymmetry can NOTCH pathway gene mutations be identified, besides *Jagged1* and *Notch2*?

CORRESPONDING AUTHOR

Belfran Alcides Carbonell
 Universidad Nacional de Colombia
 Carrera 34 No. 25C-12
 Bogotá D. C., Colombia
 Email address: bacarbonellm@unal.edu.co

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Gross JB, Hanken J. Review of fate-mapping studies of osteogenic cranial neural crest in vertebrates. *Deve Biol* 2008; 317(2): 389-400.
2. Marcucio RS, Cordero DR, Hu D, Helms JA. Molecular interactions coordinating the development of the forebrain and face. *Dev Biol* 2005; 284(1): 48-61.
3. Szabo-Rogers HL, Smithers LE, Yakob W, Liu KJ. New directions in craniofacial morphogenesis. *Dev Biol* 2010; 341(1): 84-94.
4. Chambers D, McGonnell IM. Neural crest: facing the facts of head development. *Trends Genet* 2002; 18(8): 381-384.
5. Le Douarin NM, Brito JM, Creuzet S. Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Rev* 2007; 55(2): 237-247.
6. Helms JA, Cordero D, Tapadia MD. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development*. 2005; 132(5): 851-861.
7. Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M, Helms JA. Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet* 2011; 155A(2): 270-279.
8. Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signalling in craniofacial development. *Int J Dev Biol* 2006; 50(6): 511-521.
9. Paiva KB, Silva-Valenzuela Md, Massironi SM, Ko GM, Siqueira FM, Nunes FD. Differential Shh, Bmp and Wnt gene expressions during craniofacial development in mice. *Acta histochem* 2010; 112(5): 508-517.
10. Casey LM, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Gridley T, Jiang R. Jag2-Notch1 signaling regulates oral epithelial differentiation and palate development. *Dev Dyn* 2006; 235(7): 1830-1844.
11. Loomes KM, Stevens SA, O'Brien ML, Gonzalez DM, Ryan MJ, Segalov M et al. Dll3 and Notch1 genetic interactions model axial segmental and craniofacial malformations of human birth defects. *Dev Dyn* 2007; 236(10): 2943-2951.
12. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284(5415): 770-776.
13. Jiang R, Lan Y, Chapman HD, Shawber C, Norton CR, Serreze DV et al. Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* 1998; 12(7): 1046-1057.
14. Mitsiadis TA, Graf D, Luder H, Gridley T, Bluteau G. BMPs and FGFs target Notch signalling via Jagged2 to regulate tooth morphogenesis and cytodifferentiation. *Development* 2010; 137(18): 3025-3035.
15. Akimoto M, Kameda Y, Arai Y, Miura M, Nishimaki T, Takeda A et al. Hes1 is required for the development of craniofacial structures derived from ectomesenchymal neural crest cells. *J Craniofac Surg* 2010; 21(5): 1443-1449.
16. Warthen DM, Moore EC, Kamath BM, Morrissette JJ, Sanchez-Lara PA, Piccoli DA et al. Jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome: increasing the mutation detection rate. *Hum Mutat* 2006; 27(5): 436-443.
17. Emerick KM, Rand EB, Goldmuntz E, Krantz ID, Spinner NB, Piccoli DA. Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology* 1999; 29(3): 822-829.
18. McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA et al. Notch2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet* 2006; 79(1): 169-173.
19. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23(4): 450-457.
20. Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev* 2007; 28(3): 339-363.
21. Pan Y, Liu Z, Shen J, Kopan R. Notch1 and 2 cooperate in limb ectoderm to receive an early *Jagged2* signal regulating interdigital apoptosis. *Dev Biol* 2005; 286(2): 472-482.
22. Fiuza UM, Arias AM. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* 2007; 194(3): 459-474.
23. Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of Notch signaling a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 19): 3109-3119.
24. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284(5415): 770-776.

25. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 587-613.
26. Aster JC. Deregulated NOTCH signaling in acute T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma: new insights, questions, and opportunities. *Int J Hematol* 2005; 82(4): 295-301.
27. Gritli-Linde A. Molecular control of secondary palate development. *Dev Biol* 2007; 301(2): 309-326.
28. Dudas M, Li WY, Kim J, Yang A, Kaartinen V. Palatal fusion - where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect. *Acta histochem* 2007; 109(1): 1-14.
29. Din SU. Atypical tongue-tie due to congenital tongue-palate fusion. *J Coll Physicians Surg Pak* 2003; 13(8): 459-460.
30. Humphrey T. Palatopharyngeal fusion in a human fetus and its relation to cleft palate formation. *Ala J Med Sci* 1970; 7(4): 398-426.
31. Richardson RJ, Dixon J, Jiang R, Dixon MJ. Integration of IRF6 and Jagged2 signalling is essential for controlling palatal adhesion and fusion competence. *Hum Mol Genet* 2009; 18(14): 2632-2642.
32. Mitsiadis TA, Lardelli M, Lendahl U, Thesleff I. Expression of Notch 1, 2 and 3 is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. *J Cell Biol* 1995; 130(2): 407-418.
33. Mitsiadis TA, Hirsinger E, Lendahl U, Goridis C. Delta-notch signaling in odontogenesis: correlation with cytodifferentiation and evidence for feedback regulation. *Dev Biol* 1998; 204(2): 420-431.
34. Mitsiadis TA, Henrique D, Thesleff I, Lendahl U. Mouse Serrate-1 (Jagged-1): expression in the developing tooth is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and fibroblast growth factor-4. *Development* 1997; 124(8): 1473-1483.
35. Mitsiadis TA, Regaudiat L, Gridley T. Role of the Notch signalling pathway in tooth morphogenesis. *Arch Oral Biol* 2005; 50(2): 137-140.
36. Valsecchi C, Ghezzi C, Ballabio A, Rugarli EI. JAGGED2: a putative Notch ligand expressed in the apical ectodermal ridge and in sites of epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev* 1997; 69(1-2): 203-207.
37. Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 1999; 147(1): 105-120.
38. Mustonen T, Tummers M, Mikami T, Itoh N, Zhang N, Gridley T et al. Lunatic fringe, FGF, and BMP regulate the Notch pathway during epithelial morphogenesis of teeth. *Deve Biol* 2002; 248(2): 281-293.
39. Felszeghy S, Suomalainen M, Thesleff I. Notch signalling is required for the survival of epithelial stem cells in the continuously growing incisor. *Differentiation* 2010; 80(4-5): 241-248.
40. Kamath BM, Loomes KM, Oakey RJ, Emerick KE, Conversano T, Spinner NB et al. Facial features in Alagille syndrome: specific or cholestasis facies? *Am J Med Genet* 2002; 112(2): 163-170.
41. Yuan ZR, Kohsaka T, Ikegaya T, Suzuki T, Okano S, Abe J et al. Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. *Hum Mol Genet* 1998; 7(9): 1363-1369.
42. Kamath BM, Bauer RC, Loomes KM, Chao G, Gerfen J, Hutchinson A et al. NOTCH2 mutations in Alagille syndrome. *J Med Genet* 2012; 49(2): 138-144.
43. Turnpenny PD, Ellard S. Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet* 2012; 20(3): 251-257.
44. Kamath BM, Stolle C, Bason L, Colliton RP, Piccoli DA, Spinner NB et al. Craniosynostosis in Alagille syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 112(2): 176-180.
45. Piccoli DA, Spinner NB. Alagille syndrome and the Jagged1 gene. *Semin Liver Dis* 2001; 21(4): 525-534.
46. Lorent K, Yeo SY, Oda T, Chandrasekharappa S, Chitnis A, Matthews RP et al. Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development* 2004; 131(22): 5753-5766.
47. McCright B, Lozier J, Gridley T. A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of Jag1 haploinsufficiency. *Development* 2002; 129(4): 1075-1082.
48. Zuniga E, Stellabotte F, Crump JG. Jagged-Notch signaling ensures dorsal skeletal identity in the vertebrate face. *Development* 2010; 137(11): 1843-1852.
49. Humphreys R, Zheng W, Prince LS, Qu X, Brown C, Loomes K et al. Cranial neural crest ablation of Jagged1 recapitulates the craniofacial phenotype of Alagille

- syndrome patients. *Hum Mol Genet* 2012; 21(6): 1374-1383.
50. Yen HY, Ting MC, Maxson RE. Jagged1 functions downstream of Twist1 in the specification of the coronal suture and the formation of a boundary between osteogenic and non-osteogenic cells. *Dev Biol* 2010; 347(2): 258-270.
51. Zanotti S, Canalis E. Notch signaling in skeletal health and disease. *Eur J Endocrinol* 2013; 168(6): R95-103.
52. Zanotti S, Canalis E. Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders. *Calcif Tissue Int* 2012; 90(2): 69-75.
53. Isidor B, Lindenbaum P, Pichon O, Bézieau S, Dina C, Jacquemont S et al. Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis. *Nat Genet* 2011; 43(4): 306-308.