

ORIGINAL

Hey1 gene expression patterns during the development of branchial arches and facial prominences

Patrones de expresión del gen *Hey1* durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales

Belfran Carbonell M^{1*} M.Sc, Francys Bayona R¹ M.Sc, Zayra Garavito-Aguilar^{1,2} Ph.D, Carolina Parada B³ Ph.D, Humberto Arboleda G⁴ M.Sc, Clementina Infante-Contreras¹ Esp.

¹Universidad Nacional de Colombia, Faculty of Dentistry, Institute of Genetics, Bogotá, Colombia. ²Universidad de los Andes, Department of Biological Sciences, Bogotá, Colombia. ³University of Southern California, USA. ⁴Universidad Nacional de Colombia, Faculty of Medicine, Institute of Genetics, Bogotá, Colombia. *Correspondence: bacarbonellm@unal.edu.co

Received: June 2017; Accepted: February 2018.

ABSTRACT

Objective. The present study aimed to describe in detail the expression patterns of the gene *Hey1*, an effector of the Notch pathway, during the development of branchial arches and facial prominences. **Materials and methods.** Fertilized chicken (*Gallus gallus*) eggs obtained from a local egg farm were incubated at 37.5-38.5°C with 70% relative humidity until the embryos reached Hamilton-Hamburger stages HH14 through HH25. Digoxigenin-UTP labeled probes *Hey1* were generated from linearized plasmids with either T3 polymerase for in vitro transcription. Whole-mount *in situ* hybridization was then performed. At least 3 replicates (n=3) were obtained for each stage. To confirm the results observed in whole embryos, sagittal and coronal cryosectioning was performed using a thickness of 10 µm. **Results.** During developmental stages HH14 and HH18, *Hey1* gene expression was localized to the endoderm of branchial pouches. *Hey1* gene expression was also observed in the epithelium that covers the maxillary and mandibular prominences during developmental stages HH19 and HH21, as well as in the nasal epithelium between HH19 and HH25. Transcripts were also detected in the epithelium that covers the frontonasal prominence during stage HH21. **Conclusions.** These expression patterns suggest the participation of this component of the Notch signaling pathway in craniofacial morphogenesis, possibly establishing pharyngeal segmentation patterns during early stages and/or regulating cell proliferation and differentiation during the late stages of facial development.

Keywords: Chicken embryo; craniofacial development; facial ectodermal; frontonasal prominence; mandibular prominences; notch signaling (Sources: *Mesh*, *DeCS*).

RESUMEN

Objetivo. El presente estudio tuvo como objetivo describir detalladamente los patrones de expresión del gen *Hey1*, un efector de la vía Notch durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales. **Materiales y métodos.** Se incubaron huevos fertilizados de pollo (*Gallus gallus*) obtenidos de una granja local entre 37.5-38.5°C con humedad relativa del 70% hasta que los embriones alcanzaron los estadios HH14 hasta HH25 de Hamilton-Hamburger. Las sondas *Hey1* marcadas con digoxigenina-UTP se generaron a partir de plásmidos linealizados con T3 polimerasa por transcripción in vitro. Luego

se realizó hibridación *in situ* sobre embriones completos. Se obtuvieron al menos 3 repeticiones (n=3) para cada estadio. Para confirmar los resultados observados en embriones completos, se realizaron cortes sagitales y coronales de 10 μm . **Resultados.** Durante los estadios de desarrollo HH14 y HH18, la expresión del gen *Hey1* se localizó en el endodermo de las bolsas branquiales. La expresión génica de *Hey1* también se observó en el epitelio que cubre las prominencias maxilares y mandibulares durante las etapas de desarrollo HH19 y HH21, así como en el epitelio nasal entre HH19 y HH25. También se detectaron transcritos de *Hey1* en el epitelio que cubre la prominencia frontonasal durante la etapa HH21. **Conclusiones.** Estos patrones de expresión sugieren la participación de este componente de la vía de señalización Notch en la morfogénesis craneofacial, posiblemente estableciendo patrones de segmentación faríngea durante las primeras etapas y / o regulando la proliferación y diferenciación celular durante las últimas etapas del desarrollo facial.

Palabras clave: Desarrollo craneofacial; ectodermo facial; embrión de pollo; prominencia frontonasal; prominencia mandibular (Fuentes: *Mesh, DeCS*).

INTRODUCTION

Vertebrate craniofacial morphogenesis requires the interaction of the three germ layers (endoderm, ectoderm, and mesoderm) with the so-called fourth germ layer, the neural crest cell (NCC)-derived mesenchym. The latest begins with the differentiation of the neural crest at the boundary between the ectoderm and the neuroectoderm in the neural tube, from which NCCs from the cephalic region delaminate and migrate ventromedially to populate the branchial arches (BAs)(1).

BAs are transitional segmented structures that form on the ventral region of the embryo and subsequently give rise to various structures of the face and neck, including the maxilla and the parathyroid glands (2). The first BA (BA1) is key in the development of the face, particularly during early stages of facial development, because it gives rise to the maxillary and mandibular prominences evident at late stages of facial development, which later form the maxilla and the mandible, respectively (3).

In parallel to the NCC migration toward the BAs, a fraction of these cells migrate anteriorly to form a fifth prominence called the frontonasal prominence, also called the frontonasal mass in chick embryos, which is responsible for nose, upper lip, and premaxilla formation (4). Several studies using mouse embryos have shown that the frontonasal prominence is composed of NCCs derived from the medial and anterior regions of the cephalic neural plate, while the BA1 is occupied by NCCs originating from the caudal-most region of the cephalic neural plate, which gives rise to the midbrain and the hindbrain (5).

Fusion of the five prominences, two maxillary, two mandibular (one at either side) and one

INTRODUCCIÓN

La morfogénesis facial requiere de la interacción de las cuatro capas germinales: endodermo, ectodermo, mesodermo y mesénquima derivado de las células de la cresta neural (CCN). Este evento comienza con la formación de la cresta neural en el límite entre ectodermo y neuroectodermo en el tubo neural, desde donde las CCN delaminan y migran ventro-medialmente para poblar los arcos branquiales (AB)(1).

Los AB son estructuras transitorias, segmentadas, que se forman en la región ventral del embrión y posteriormente dan origen a diferentes estructuras de la cara y el cuello, como los maxilares y las glándulas paratiroides (2). El primer AB (AB1) es crucial para la formación de la cara (etapa temprana del desarrollo facial), ya que de él se originan las prominencias maxilar y mandibular (etapa tardía del desarrollo facial), las cuales formarán el maxilar y la mandíbula, respectivamente (3).

Simultáneo a la migración de las CCN hacia los AB, una porción de estas células migra anteriormente para desarrollar una quinta prominencia denominada la prominencia frontonasal (masa frontonasal en el caso del embrión de pollo), encargada de la formación de la nariz, el labio superior y la premaxila (4). Diferentes estudios en embriones de ratón han demostrado que la prominencia frontonasal está compuesta por CCN derivadas de la región media y anterior del cerebro, mientras que el AB1 está poblado por CCN que provienen de la porción más caudal del cerebro medio y del cerebro posterior (5).

La fusión de las cinco prominencias, dos maxilares, dos mandibulares (una a cada lado) y una única frontonasal, da origen a la forma

frontonasal, gives rise to the mature form of the face. This is a highly conserved process in vertebrates, which makes its study possible in animal models, such as the chick embryo (6).

The complex configuration of the BAs and the facial prominences results from a strict combination of the expression domains of various molecules belonging to several cell signaling pathways (4). Previous studies have reported the involvement of signaling pathways, such as the Notch, Wnt, FGF, and BMP pathways, in the development of the precursor structures of the face through the regulation of cellular processes, such as proliferation, apoptosis, and differentiation(1,6).

The Notch signaling pathway is a mechanism of intercellular communication involved in various aspects of embryonic development as well as pathologies, such as CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*), cancer, and diabetes (7). Elements of this pathway include Notch receptors, Serrate and Delta family ligands, and target genes, such as *Hes* and *Hey* family genes (8).

The *Hey* gene family consists of three members, *Hey1*, *Hey2* and *HeyL*, which are highly conserved between species (9). *Hey1*, a representative target gene of the Notch signaling pathway, encodes a transcription factor in the *basic helix-loop-helix* (bHLH) protein family. This transcription factor can bind to specific promoter sites to regulate the transcription of certain target genes, including *Hey1* itself (9). The expression of this gene is linked to several events during embryogenesis that generally involve the regulation of cell fate and the formation of anatomical boundaries (10).

The *Hey1* gene is involved in the embryonic development of various organs and systems, such as the heart, somites, central nervous system, and vascular system(11,12). Furthermore, this gene is a GGGnegative regulator of osteoblast mineralization *in vitro* and is expressed in craniofacial structures, such as the branchial clefts, BA1, nasal pit, otic vesicles, supporting cells of the auditory system, calvaria, maxilla, and mandible(10,13-15). Despite reports of *Hey1* expression in structures such as the BAs, these descriptions are general and do not shed light about the specific distribution of *Hey1* in the different germ layers. Thus, this work aimed to describe in detail the expression patterns of *Hey1* in the precursor structures of face formation, the BAs and the facial prominences in chick embryos using *in situ* hybridization analysis.

madura de la cara. Este es un proceso altamente conservado en los vertebrados, virtud que le hace posible ser estudiado en modelos animales, como el embrión de pollo (6).

La compleja organización de los AB y las prominencias faciales, es producto de una combinación estricta de dominios de expresión, de diversas moléculas organizadas en diferentes vías de señalización celular (4). Investigaciones previas han reportado la participación de vías como Notch, Wnt, FGF y BMP durante el desarrollo de las estructuras precursoras de la cara, las cuales actúan regulando procesos celulares, como proliferación, apoptosis y diferenciación (1,6).

La vía de señalización celular Notch, es un mecanismo de comunicación célula-célula implicado en diferentes procesos del desarrollo embrionario, así como en patologías como CADASIL, cáncer, diabetes, entre otras (7). La vía está compuesta por los receptores Notch, ligandos de la familia Serrate y Delta, y genes diana como la familia de genes *Hes* y *Hey* (8).

La familia de genes *Hey* (también llamada *Hesr*, *Herp* y *Hrt*), está conformada por tres miembros, *Hey1*, *Hey2* y *HeyL*, genes conservados entre especies (9). *Hey1*, gen diana representativo de la vía de señalización celular Notch, codifica para un factor de transcripción *Basic helix-loop-helix* (bHLH), con capacidad para unirse a sitios específicos de los promotores, inhibiendo así, la transcripción de ciertos genes diana e inclusive de ellos mismos (9). Su expresión se relaciona con múltiples eventos de la embriogénesis, al parecer regulando el destino celular y la formación de límites anatómicos (10).

Este gen está implicado en el desarrollo embrionario de diferentes órganos y sistemas como el corazón, las somitas, el sistema nervioso central y el sistema vascular (11,12). Además, es un regulador negativo de la mineralización de osteoblastos *in vitro* y se encuentra expresado en estructuras craneofaciales como las hendiduras branquiales, AB1, las fositas nasales, las vesículas óticas, las células de soporte del sistema auditivo, el hueso de la bóveda craneal, el maxilar y la mandíbula, entre otras (10,13-15). A pesar de los reportes acerca de su expresión en estructuras como los AB, estas descripciones son generalizadas y no informan acerca de la ubicación en las diferentes capas germinales, razón por la cual el objetivo de este trabajo es describir de forma detallada el patrón de expresión en las estructuras precursoras de la formación de la cara, los AB y las prominencias faciales en el embrión de pollo, a través de la técnica de hibridación *in situ*.

MATERIALS AND METHODS

Chick embryo collection and fixation.

Fertilized chicken (*Gallus gallus*) eggs obtained from a local egg farm were incubated at 37.5-38.5°C with 70% relative humidity until the embryos reached Hamilton-Hamburger stages HH14 through HH25 (16). At least 3 replicates (n=3) were obtained for each stage.

Upon reaching an adequate stage, the embryos were extracted in PBS/DEPC (phosphate-buffered saline/diethylpyrocarbonate) to remove the extraembryonic membranes and were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4°C (6-12 hours). After fixation, the embryos were washed, dehydrated with PBT (PBS-Tween Buffer) and serial washes of methanol/PBT (25%, 50%, 75% and 100%) for 5 minutes each, and stored at -20°C.

Riboprobe synthesis. Plasmids containing a DNA sequence encoding an antisense probe construct for chicken *Hey1* were used for riboprobe synthesis and have been previously published (17). *In vitro* synthesis of the riboprobe was done with RNA polymerase T3 (Roche®) and digoxigenin UTP (DIG)-labeled ribonucleotides (Roche®).

Whole embryos ISH. *In situ* hybridization was performed using whole embryos following protocols used by the Developmental Biology group at Pompeu Fabra University-Barcelona Biomedical Research Park, with modifications as described below.

Embryos were rehydrated by serial washes in 75% to 25% methanol/PBT. Following one wash in PBT, the embryos were treated with 10 µg/ml of proteinase K for 3 to 15 minutes depending on the developmental stage of the embryo. Next, the embryos were washed in PBT and post-fixed in 4% PFA. Following post-fixation, the embryos were rinsed with PBT and hybridization buffer (SSC 5X, Formamide, EDTA, CHAPS 0.5%, Heparin and Yeast RNA). Hybridization was done overnight at 60°C in hybridization buffer containing the probe. The embryos were then washed for 30 minutes with solutions I (formamide, SSC 20% and SDS 10%) and Solution III (formamide, 10% SDS) 3 times at 60°C.

Subsequently, the embryos were washed in TBST and blocking solution to prepare them for anti-DIG addition and for DIG-labeled nucleotide visualization. After washing, anti-DIG was added to a fresh blocking solution in which the embryos were submerged overnight at 4°C. The next day, the embryos were washed 3 times with

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y fijación de embriones de pollo.

Huevos fertilizados de gallina (*Gallus gallus*) obtenidos de una granja local productora de huevos para el consumo humano, fueron incubados a 37.5-38.5°C, con humedad relativa de 70%, hasta conseguir embriones en estadio de desarrollo de HH14 a HH25, de acuerdo con la clasificación de Hamilton y Hamburger (16). Para cada estadio de desarrollo se obtuvieron 3 réplicas (n=3).

Una vez obtenidos los estadios adecuados, los embriones se extrajeron en PBS/DEPC (Solución buffer fosfato/dietilpirocarbonato) para retirar las membranas extraembrionarias y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante toda la noche a 4°C (6-12 horas). Finalizada la fijación, los embriones se deshidrataron con un lavado en PBT y series de metanol/PBT al 25%, 50%, 75% y 100% por 5 minutos cada uno y se almacenaron a -20°C.

Síntesis de ribosonda. Plásmidos que contenían la secuencia de DNA codificante para el gen *Hey1* de pollo, fueron usados para la síntesis de la ribosonda, los cuales han sido publicados previamente (17). La síntesis *in vitro* de la ribosonda antisentido, se realizó utilizando RNA polimerasa T3 (Roche®) y ribonucleótidos marcados con digoxigenina UTP (DIG) (Roche®).

ISH en embriones completos. La hibridación *in situ* fue llevada a cabo en los embriones completos siguiendo el protocolo usado en el grupo de Biología del Desarrollo de la Universitat Pompeu Fabra-Parc de Recerca Biomedica de Barcelona, con algunas modificaciones.

Los embriones fueron rehidratados por medio de lavados en series de metanol/PBT del 75% al 25%. Después de un lavado en PBT fueron tratados con proteínasa K 10µg/ml, por un tiempo según el estadio de desarrollo del embrión (entre 3 y 15 min). Posteriormente fueron lavados en PBT y refijados en PFA 4%. Finalizada la fijación se realizaron enjuagues con PBT y con solución de hibridación. La hibridación se realizó a 60°C con solución de hibridación y la sonda durante toda la noche. Luego, los embriones fueron lavados con solución I y III (formamida al 50%, SDS 10%) 3 veces durante 30 min cada lavado a 60°C.

Posteriormente se prepararon los embriones para recibir el anticuerpo anti-DIG y para la visualización de los nucleótidos marcados con DIG, a través de lavados en TBST y solución de bloqueo. Después de la preparación, a una nueva solución de bloqueo se adicionó el anticuerpo anti-DIG y se sumergieron los embriones durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron

TBST and incubated overnight (in TBST). On the fourth day, washes were done using TBST and NTMT. Visualization was done using BCIP/NBT solution for approximately 45 minutes while protected from light. Once visualization reaction was completed, the samples were washed with NTMT and PBT. The embryos were postfixed in 4% PFA and stored at 4°C protected from light. Following ISH, the embryos were clarified by serial washing in methanol/PBT, PBT, and glycerol to be recorded. Images were obtained using a camera couple to stereoscope (Stemi 508 Zeiss).

Histological sectioning. To confirm the results observed in whole embryos, sagittal and coronal cryosectioning was performed using a thickness of 10 µm. The embryos used were those prepared for whole embryo *in situ* hybridization analysis. The embryos were over-developed, processed in different sucrose washes, and then soaked in OCT/sucrose for freezing. Frozen embryo sectioning was performed with a cryostat (Leica1850). The sections were mounted with 80% glycerol and were imaged in microscope Axio imager A2 (Zeiss).

Ethical aspects. The study samples were collected by the students of the Master in Dentistry at the Institute of Genetics of the National University of Colombia, which took into account the procedures for the collection of scientific, administrative and ethical samples contained in Law 84 of 1989 (National Congress of Colombia). The investigation was approved by the research committee of the Faculty of Dentistry of the National University of Colombia through act 03 of February 28, 2011. In addition, this research comprehensively covered the international principles of the 3 Rs y the Guide for the care and use of laboratory Animals (NIH Guide).

RESULTS

Hey1 expression during branchial arch development. Early stages of craniofacial morphogenesis. BA development in chick embryos occurs mainly between the Hamilton-Hamburger stages HH14 and HH19(16).

In situ hybridization (ISH) analysis of whole embryos revealed that *Hey1* gene expression was localized to the first three branchial clefts, the mesenchyme of the maxillary and mandibular prominence primordia, and the mesenchyme of BA2 during stage HH14 (Figure 1, A). Analysis of sagittal and coronal cryosections confirmed that *Hey1* expression is especially present in

3 lavados en TBST. En este último se dejó durante toda la noche de nuevo. Durante el cuarto día se completaron los lavados con las soluciones TBST y NTMT. El proceso de revelado se realizó con la solución BCIP/NBT protegido de la luz durante 45 minutos aproximadamente. Después del revelado, se realizaron lavados en NTMT y en PBT. Los embriones fueron posfijados en PFA 4% y almacenados protegidos de la luz a 4° C. Una vez finalizada la ISH los embriones fueron aclarados con series de lavados en metanol/PBT, PBT y glicerol; para luego ser fotografiados en el estereoscopio (Stemi 508 Zeiss).

Cortes histológicos. Para confirmar los resultados evidenciados en los embriones completos se llevaron a cabo criosecciones sagitales y coronales, de 12 µm de espesor. Se utilizaron los embriones que habían sido sometidos a hibridación *in situ* del embrión completo. Los embriones se sobrerivelaron y fueron procesados en diferentes lavados en sucrosa, y posteriormente embebidos en OCT/sucrosa para ser congelados. Los cortes de los embriones congelados fueron realizados en el criostato (Leica). Los cortes fueron montados con glicerol al 80% y fotografiados en el microscopio Axio imager A2 (Zeiss).

Aspectos éticos. Las muestras de estudio fueron recolectadas por estudiantes de la Maestría en Odontología en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia para lo cual se tuvo en cuenta los procedimientos de recolección de muestra científicos, administrativos y éticos contenidos en la Ley 84 de 1989(Congreso Nacional de Colombia). La investigación fue aprobada por el comité de investigación de la facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia mediante acta 03 de 28 de febrero del 2011. Adicionalmente, esta investigación contempló de manera absoluta los principios internacionales de las 3 R y la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Guide for the care and use of laboratory Animals (NIH Guide)

RESULTADOS

Expresión de *Hey1* durante el desarrollo de los arcos branquiales (Estadios tempranos de morfogénesis facial). La formación de los AB en el embrión de pollo se lleva a cabo principalmente durante los estadios de desarrollo HH14 a HH19 de Hamilton y Hamburger (16).

A través de hibridación *in situ* (ISH) en los embriones completos se hizo evidente que la expresión del gen *Hey1* se concentró en las tres primeras hendiduras branquiales y en el mesénquima de los primordios de las

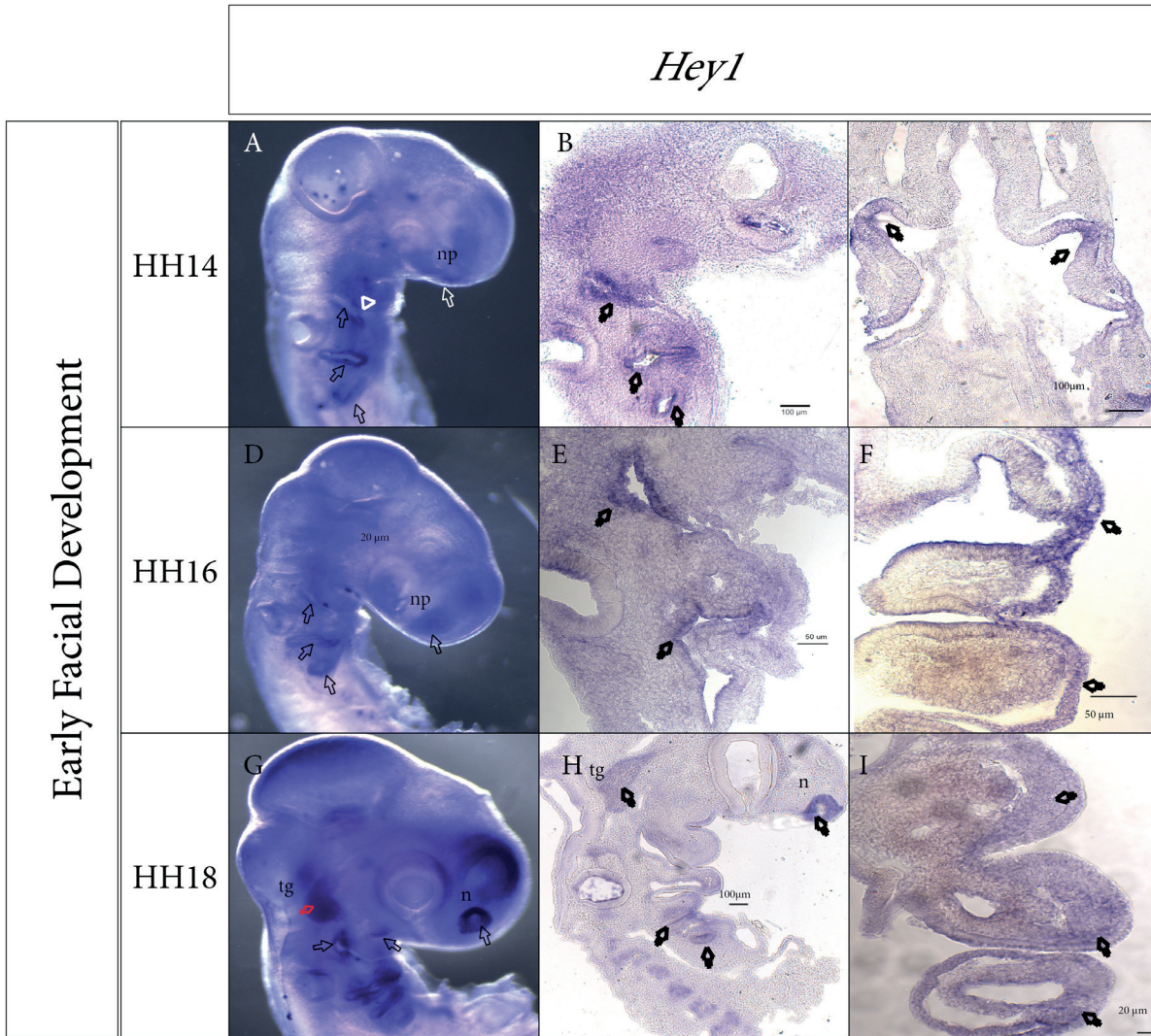


Figure 1. *Hey1* gene expression patterns during branchial arch development. A, D, G Sagittal view of whole embryos during stages HH14, HH16, and HH18, respectively. B, E, H Sagittal cryosections. C, F, I Coronal cryosections. A, Expression in the three branchial clefts, first branchial arch, and nasal placode region. B, Expression in the ectoderm of the first, second, and third branchial clefts. C, Low expression in the branchial endoderm. D, *Hey1* expression in the first three clefts and the nasal placode. E, Expression is maintained in the ectoderm of the clefts. F, *Hey1* expression in the endoderm and mesenchyme of the first and second branchial arches. G, Expression is clearly visualized in the nasal pit, trigeminal ganglion region (red arrow), first three branchial clefts, maxillary and mandibular primordia, and second and third branchial arches. H, Sagittal cut confirms expression in the nasal epithelium, trigeminal ganglion region, ectoderm of the maxillary primordium, and ectodermic epithelium of the first and third branchial clefts. I, Coronal sections reveal *Hey1* expression in the mesenchyme adjacent to the first and second branchial arches. f, frotonasal prominence; n, pit nasal; np, nasal placode; mx, maxillary prominence; md, mandibular prominence; tg, trigeminal ganglion.

the endoderm of the branchial pouches and the ectoderm that composes the branchial clefts, although at lower expression levels (Figure 1, B and C).

During stage HH16, *Hey1* gene expression was maintained in the first three branchial clefts, the

prominencias maxilar y mandibular, así como en el mesénquima de AB2, durante el estadio HH14 (Figura 1, A). Al analizar las criosecciones en sentido sagital y coronal se confirmó que la expresión está localizada especialmente en el endodermo de las bolsas branquiales y con menor intensidad en el ectodermo que conforma las hendiduras branquiales (Figura 1, B y C).

maxillary prominence primordium, the dorsal side of the mandibular prominence primordium, the ventral region of BA2 and BA3, the margins of the otic vesicle, and in the nasal placode (Figure 1, D). Cryosection analysis confirmed its expression in the epithelium of the branchial clefts and pouches (Figure 1, E and F). Furthermore, *Hey1* expression was detected in the BA mesenchyme (Figure 1, F).

During the HH18 stage, *Hey1* expression exhibited an obvious, localized signal in the epithelium of the nasal pit (Figure 1, G and H). Expression was also detected in the anterior and posterior poles of the otic vesicle, the trigeminal ganglion, and in every cleft (Figure 1, G). Although in the dorsal region of the first cleft, *Hey1* expression expanded toward the mesenchyme. The signal was also evident in the maxillary and mandibular prominences, although with lower intensity in the latter, in contrast to the signal observed in the ventral region of BA2 and BA3; furthermore, this signal extended from the second cleft toward the adjacent mesenchyme, invading the caudal-most region of BA2. Cryosection analysis confirmed extension of the expression toward the mesenchyme adjacent to the branchial clefts and pouches (Figure 1, H and I).

***Hey1* expression during facial prominence development (late stages of craniofacial morphogenesis).** Development of the facial prominences, which are precursors of the face, occurs mainly between the Hamilton-Hamburger stages HH21 and HH25(16). During this phase, the prominences primarily undergo an increase in size and become morphologically established.

Analysis of stage HH21 showed that *Hey1* expression remained localized to the epithelium of the nasal pit and maxillary and mandibular prominences and also the caudal-most region of BA2, trigeminal ganglion, and third and fourth branchial clefts, where a strong signal was observed (Figure 2, A). The signal, which was previously confined in the first branchial cleft, extended further toward the dorsal region of the cleft (Figure 2, A). Sagittal sections in the frontonasal mass region showed *Hey1* expression in the nasal epithelium and the frontonasal mass ectoderm (Figure 2, C). Furthermore, coronal sectioning allowed detection of *Hey1* expression in the epithelium, the lateral mesenchyme of the mandibular prominence, and the lateral epithelium of the maxillary prominence (Figure 2, B).

Subsequently, during the HH23 stage, *Hey1* primary transcripts were detected in the nasal pit, the maxillary prominence, the ventral and dorsal regions of the mandibular prominence

Durante el estadio HH16, la expresión persistió en las primeras tres hendiduras branquiales, en el primordio de la prominencia maxilar, en la porción dorsal del primordio de la prominencia mandibular, en el área ventral de AB2 y AB3, en el reborde de la vesícula ótica y en la placoda olfatoria (Figura 1, D). Las criosecciones permitieron confirmar la expresión en el epitelio de las hendiduras y bolsas branquiales (Figura 1, E y F). Adicionalmente, se detectó expresión en el mesénquima que conforma los AB (Figura 1, F).

Por otro lado, el estadio HH18 se caracterizó por presentar una señal muy evidente y localizada en el epitelio de la fosita nasal (Figura 1, G y H). También se observó en los polos anterior y posterior de la vesícula ótica, en el ganglio del trigémino y en todas las hendiduras (Figura 1, G), aunque en la porción dorsal de la primera hendidura, la expresión se expandió hacia el mesénquima. La señal también fue evidente en la prominencia maxilar, un poco más leve en la mandibular y muy fuerte en la porción ventral de AB2 y AB3; además, se extendió desde la segunda hendidura hacia el mesénquima adyacente, invadiendo el área más caudal de AB2. Las criosecciones permitieron confirmar la extensión de la expresión hacia el mesénquima adyacente a las bolsas y hendiduras branquiales (Figura 1, H e I).

Expresión de *Hey1* durante el desarrollo de las prominencias faciales (Estadios tardíos de morfogénesis facial). El desarrollo de estas estructuras precursoras de la cara se da, en su mayoría, durante los estadios HH21 a HH25 de Hamilton y Hamburger(16). Durante esta fase, las prominencias experimentan sobretodo aumento de tamaño y adquieren mayor definición morfológica.

Al analizar el estadio HH21 se detectó que la expresión de *Hey1* continuó fuerte y localizada en el epitelio de la fosita nasal, en las prominencias maxilar y mandibular, así como en la porción más caudal de AB2, en el ganglio del trigémino y en la tercera y cuarta hendidura branquial (Figura 2, A). La señal circunscrita previamente a la primera hendidura branquial, se extendió hacia la región más dorsal de la misma (Figura 2, A). Las secciones sagitales a nivel de la masa frontonasal, evidenciaron la expresión de *Hey1* en el epitelio nasal y en el ectodermo que recubre la misma (Figura 2, C). Adicionalmente, las secciones de los embriones en sentido coronal permitieron detectar la expresión en el epitelio y mesénquima lateral de la prominencia mandibular y en el epitelio lateral de la prominencia maxilar (Figura 2, B).

Posteriormente, durante el estadio HH23, la presencia del transcrito se detectó en la fosita nasal, la prominencia maxilar, el área ventral de la prominencia mandibular y en la porción dorsal de forma más marcada, así como en la región que

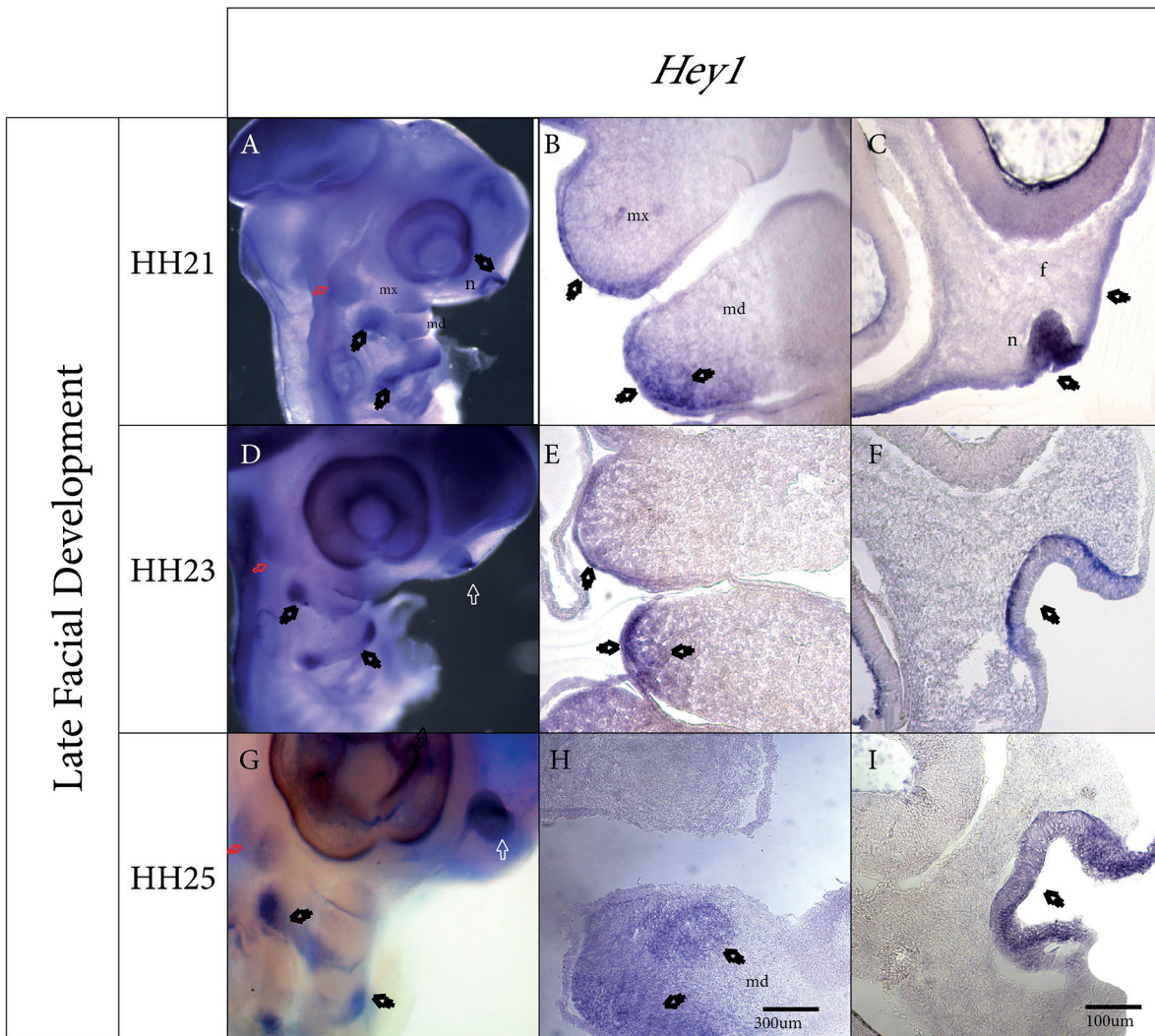


Figure 2. *Hey1* gene expression patterns during facial prominence development. A, D, G Sagittal view of whole embryos during stages HH21, HH23, and HH25, respectively. B, E, H Coronal sections in the maxillary and mandibular prominence region. C, F, I Sagittal sections in the frontonasal prominence and nasal pit region. A, Expression is revealed in the nasal pit, trigeminal ganglion (red arrow), maxillary and mandibular prominences, and second branchial arch. B, *Hey1* expression is observed in the mesenchyme adjacent to the epithelium of the mandibular prominence and the ectoderm that covers both prominences. C, Expression in the ectoderm that covers the frontonasal prominence and in the epithelium of the nasal pit. D, Expression in the nasal pit, trigeminal ganglion, maxillary prominence, mandibular prominence, and second branchial arch. E, Expression in the ectoderm that covers the maxillary and mandibular prominences, as well as the mandibular mesenchyme adjacent to the ectoderm. F, Clear expression in the epithelium of the nasal pit. G, Expression in the nasal pit, trigeminal ganglion, mandibular prominence, and second branchial arch. H, Coronal cut reveals *Hey1* expression in the mandibular mesenchyme. I, Expression revealed in the epithelium of the nasal pit. f, frontonasal prominence; n, pit nasal; mx, maxillary prominence; md, mandibular prominence. Scale bar of 300 µm for B, E and H. Scale bar of 100 µm for C, F and I.

(more markedly on the dorsal side), and the region corresponding to the trigeminal ganglion (Figure 2, D and F). The analyzed sections revealed this expression to be in the epithelium and the lateral mesenchyme adjacent to the maxillary and mandibular prominences (Figure

corresponde al ganglio del trigémino (Figura 2, D, F). Las secciones analizadas hicieron evidente esta expresión en el epitelio y mesénquima lateral adyacente de las prominencias maxilar y mandibular (Figura 2, E). Adicionalmente, a nivel de AB2 se evidenciaron dos dominios de expresión, uno ventral y otro dorsal y, menor

2, E). Finally, the BA2 showed two expression domains, one ventral and the other dorsal, with a weaker signal in the first, third and fourth clefts (Figure 2, D and F).

In the latest stage analyzed, HH25, the expression patterns were similar to those observed for HH21 and HH23, although the signal was stronger. Namely, *Hey1* expression was observed in the nasal pit and the dorsal region of the mandibular prominence (Figure 2, G). However, during this stage, *Hey1* expression was not detected in the maxillary prominence. Sagittal cryosections showed that *Hey1* expression was restricted to the epithelium of the nasal pit (Figure 2, I), while coronal sections in the mandibular prominence region showed expression specifically in the lateral mesenchyme of the mandibular prominence (Figure 2, H).

DISCUSSION

Various cell signaling pathways are associated with craniofacial morphogenesis(1). The Notch signaling pathway target gene *Hey1* is expressed in craniofacial structures, such as the BA1, suggesting a role for this pathway in face development(10). Despite existing reports, the precise location of *Hey1* gene expression in the germ layers that compose the BAs and the facial prominences, which are precursors of face development, is unclear. Using *in situ* hybridization analysis of chick embryos and histology sections, we present a detailed description of the expression patterns of this component of the Notch pathway.

***Hey1* expression during branchial arch development. Early stage of face formation.**

The initial phase of craniofacial morphogenesis is characterized by the formation of the BAs, which arise during pharyngeal development when the lateral wall of the pharynx becomes invaginated, forming the structures known as the branchial pouches; in the outer embryo, the pharyngeal endoderm becomes depressed, forming the fissures known as the branchial clefts (2). The formation of these pouches represents the first sign of segmentation of the pharyngeal region, which is representative of all chordates and defines anterior-posterior polarity in the embryo(2). Subsequently, the BAs increase in size due to the migration and proliferation of NCCs-derived cells, which form the BA mesenchyme along the paraxial mesoderm. Cells originating from each BA germ layer are responsible for the formation of a given specific structure or participate indirectly by signaling to the neighboring epithelium as a result of the mesenchyme-epithelium reciprocal interaction (18).

intensidad en la señal a nivel de la primera, tercera y cuarta hendidura (Figura 2, D, F).

En el último estadio analizado, HH25, a pesar de haber presentado un patrón de expresión semejante al observado en HH21 y HH23, la señal fue más intensa. Esto se observó en la fosita nasal y en la región dorsal del proceso mandibular (Figura 2, G). Aunque, a diferencia de HH21 y HH23, en este estadio no se detectó expresión de *Hey1* en la prominencia maxilar. Las criosecciones sagitales mostraron que la expresión está restringida al epitelio de la fosita nasal (Figura 2, I), mientras que en las coronales a nivel de la prominencia mandibular, específicamente en el mesénquima lateral de la prominencia mandibular (Figura 2, H).

DISCUSIÓN

Diferentes vías de señalización celular están asociadas a la morfogénesis facial(1). El gen diana de la vía de señalización celular Notch, *Hey1*, se ha visto expresado en componentes craneofaciales como el AB1, indicando una posible función de la vía durante la formación de la cara (10). A pesar de los reportes existentes, no es precisa la ubicación de la expresión de este gen en las capas germinales que conforman los AB y las prominencias faciales, precursoras de la formación facial. A través de la técnica de hibridación *in situ* en embriones de pollo y de cortes histológicos, en este estudio presentamos una descripción detallada del patrón de expresión de este componente de la vía Notch.

Expresión de *Hey1* durante la formación de los arcos branquiales, etapa temprana de formación facial.

La fase inicial de la morfogénesis facial se caracteriza por la formación de los AB, los cuales surgen durante el desarrollo de la faringe, cuando la pared lateral de la misma se invagina formando las estructuras conocidas como bolsas branquiales; mientras que en el aspecto externo del embrión, el ectodermo a nivel de la faringe, se deprime formando unas fisuras denominadas hendiduras branquiales (2). La formación de las bolsas es la primera señal de segmentación del área faríngea, característica de todos los cordados, que además define la polaridad anteroposterior en el embrión (2). Posteriormente, los AB aumentan de tamaño gracias a la migración y proliferación de CCN que formarán, junto al mesodermo paraxial, el mesénquima de los AB. Cada capa germinal de los AB tiene a su cargo la formación de alguna estructura específica o participa indirectamente señalizando al epitelio contiguo, gracias a la interacción epitelio-mesénquimal (18).

A través de hibridación *in situ* se determinó que durante las etapas HH14 a HH18, la expresión

Using *in situ* hybridization analysis, it was found that between the HH14 and HH18 stages, *Hey1* expression was primarily localized to the endoderm of the branchial pouches. Previous studies highlight the importance of the endoderm in BA organization not only through the formation of the branchial pouches as the first signal of pharyngeal segmentation but also as a source of signaling to the neighboring ectoderm and mesenchyme (19). Our findings in this study suggest that the *Hey1* gene maybe involved in the initial segmentation of the pharyngeal region. In addition, the extension of *Hey1* expression toward the mesenchyme may also suggest that a series of events occur at this stage, with the purpose of increasing cell proliferation to achieve an adequate arch size.

***Hey1* expression during facial prominence development. Late stage of face formation.**

Establishment of the five facial prominences that form the face is the most important aspect of facial development. Facial prominences are mesenchyme buds covered by epithelium that emerge, grow and fuse to form the face (20). The maxillary and mandibular prominences arise from the growth and morphological differentiation of BA1. Meanwhile, the frontonasal prominence arises through the proliferation of NCCs originating from the anterior neural plate that gives rise to the forebrain and the midbrain(5, 6, 21).

High levels of mesenchymal proliferation have been detected during the development of the maxillary and mandibular prominences between stages HH19 and HH21, mediated by epithelial-mesenchymal reciprocal interactions(22). However, as development proceeds, these proliferation levels decrease, leading to cell differentiation processes that give rise to the structures derived from these prominences (22). In the present study, *Hey1* gene expression was identified in the epithelium that envelops the maxillary and mandibular prominences during stages HH19 and HH21, which coincides with the highest levels of mesenchymal proliferation in the maxillary and mandibular prominences (22). This finding may suggest the involvement of the Notch pathway in this cellular process through the effector gene *Hey1*.

In addition, it was determined that between stages HH21 and HH26, mesenchymal cells condense and then differentiate into prechondrogenic cells that give rise to Meckel's cartilage, which is the blueprint for mandibular development (23, 24). Both this process of chondrogenesis and cell proliferation events depend on the interactions between the epithelium and the adjacent lateral

de *Hey1* se concentró sobre todo a nivel del endodermo de las bolsas branquiales. Reportes previos dejan clara la importancia que tiene el endodermo en la organización de los AB, no sólo a través de la formación de las bolsas branquiales como primera señal de segmentación faríngea, sino como fuente de señalización para el ectodermo y el mesénquima cercanos (19). Los hallazgos de esta investigación sugieren que el gen *Hey1* podría estar involucrado en la segmentación inicial del área faríngea. Este es un evento fundamental para el desarrollo adecuado de los AB, que desempeña una función en las interacciones epitelio-mesenchimales que tienen lugar durante el desarrollo de estas estructuras. Adicionalmente, la extensión de dicha expresión hacia el mesénquima, también puede sugerir alguna función en eventos que se presentan en esta etapa como un aumento en la proliferación celular para lograr el tamaño adecuado de los arcos.

Expresión de *Hey1* durante la formación de las prominencias faciales, etapa tardía de formación facial.

El establecimiento de las cinco prominencias faciales que formarán la cara, es la característica más importante durante esta etapa de desarrollo. Las prominencias faciales son brotes de mesénquima cubiertos por epitelio, los cuales emergen, crecen y se fusionan para formar la cara (20). Las prominencias maxilar y mandibular se originan del crecimiento y la diferenciación morfológica de AB1. Mientras que la prominencia frontonasal surge de la proliferación de las CCN provenientes del cerebro anterior y medio(5, 6, 21).

Durante el desarrollo de las prominencias maxilar y mandibular, se han identificado altos niveles de proliferación mesenchimal en los estadios de desarrollo desde HH19 hasta HH21, mediados por interacciones epitelio-mesenchimales (22). Sin embargo, a medida que avanza el desarrollo, estos niveles de proliferación descienden para dar lugar a procesos de diferenciación celular, que originarán las estructuras derivadas de estas prominencias (22). En este estudio se identificó la expresión del gen *Hey1* en el epitelio que recubre las prominencias maxilar y mandibular durante los estadios de desarrollo HH19 y HH21, hallazgos que coinciden con los niveles más altos de proliferación mesenchimal en las prominencias maxilar y mandibular (22), sugiriendo una probable participación de la vía Notch en este proceso celular a través del gen efector *Hey1*.

Se ha identificado que durante los estadios HH21 a HH26, las células mesenchimales se condensan para luego diferenciarse en células precondrogénicas que darán lugar al cartílago Meckel, el cual será la plantilla para el desarrollo mandibular (23,24). Este proceso de condrogénesis, al igual que los

mesenchyme (25). In this study, *Hey1* gene expression was detected in the lateral mandibular mesenchyme between stages HH21 and HH25. These results agree with previous reports stating that chondrogenesis in the mandibular prominence begins during the same time period (23, 24). Furthermore, other studies in mice have shown that *Hey1* is required for the initiation of early chondrogenesis in human bone marrow cells and favors the formation of hypertrophic chondrocytes (14, 26). Additionally, it has been shown that *Hey1* activation through the Notch receptor favors the formation of chondrogenic cell condensates in human bone marrow cells (27). The expression patterns found in this study during the stage of mandibular chondrogenesis, specifically in the mandibular mesenchyme between stages HH21 and HH25, along with previous reports, suggest the involvement of the Notch pathway in the process of mandibular chondrogenesis via its effector gene *Hey1*.

Regarding the development of the frontonasal prominence, previous studies have shown that this process is regulated by a group of signals arising from two signaling nodes found in the nasal epithelium and the frontonasal ectodermal zone (FEZ)(20, 28, 29). Several molecules, such as FGF8, BMP, and SHH, mediate proliferation and apoptosis in the frontonasal mesenchyme within these signaling nodes (20, 29, 30). In this study, *Hey1* expression was detected in the nasal epithelium between stages HH19 and HH25. This expression pattern coincides with the point in time in which cell differentiation of the nasal epithelium occurs and with the stage at which the nasal epithelium signals for the development of the lateral nasal mesenchyme, suggesting the involvement of *Hey1* in this process (20).

Hey1 transcripts were detected in the epithelium that covers the frontonasal prominence during stage HH21 (Figure 2, B). These expression patterns coincide with the stages in which the FEZ becomes established in birds, stages HH20-HH22 (28). This signaling node is conserved between birds and mammals and is involved in controlling dorso-ventral polarity and the proximo-distal extension of the frontonasal prominence (28). The results obtained here suggest that *Hey1* participates in the establishment of polarity of this prominence.

In conclusions this study revealed the specific expression patterns of the *Hey1* gene during BAs and facial prominence establishment and development. These patterns of expression suggest a role for this component of the Notch pathway in craniofacial morphogenesis, possibly establishing pharyngeal segmentation patterns

eventos de proliferación celular van a depender de las interacciones entre el epitelio y el mesénquima lateral adyacente (25). En esta investigación a partir de HH21 hasta HH25 se detectó expresión de *Hey1* en el mesénquima mandibular lateral. Estos resultados coinciden con reportes donde en esta misma etapa inicia el proceso de condrogénesis en la prominencia mandibular(23, 24). Adicionalmente, otras investigaciones llevadas a cabo en ratón, han evidenciado que *Hey1* es necesario para iniciar el proceso de condrogénesis temprana en células de médula ósea humana y favorece la formación de condrocitos hipertróficos (14, 26). Además, en células de médula ósea humana, se ha demostrado que la activación de *Hey1* a través del receptor Notch1, favorece la formación de condensaciones celulares condrogénicas (27). Los patrones de expresión encontrados en el presente estudio durante el periodo de condrogénesis mandibular, específicamente en el mesénquima mandibular desde HH21 hasta HH25, en conjunto con los reportes previos sugieren una probable participación de la vía Notch a través de su gen efector *Hey1*, en el proceso de condrogénesis mandibular.

Con respecto al desarrollo de la prominencia frontonasal, este es regulado por un grupo de señales provenientes de dos centros de señalización localizados en el epitelio nasal y la FEZ (*Frontonasal Ectodermal Zone*)(20,28, 29). En estos centros de señalización varias moléculas como FGF8, BMP y SHH, median procesos de proliferación y apoptosis en el mesénquima frontonasal (20,29,30). En el presente estudio, la expresión de *Hey1* fue detectada en el epitelio nasal desde HH19 hasta HH25. Este patron de expresión corresponde con el tiempo en que toma lugar la diferenciación de células del epitelio nasal y con el momento en que el epitelio nasal aporta señales para el desarrollo del mesenquima nasal lateral, sugiriendo un posible papel de *Hey1* en este proceso (20).

Por otro lado, se detectaron transcritos de *Hey1* en el epitelio que recubre la prominencia frontonasal durante el estadio de desarrollo HH21 (Figura2, B). Estos patrones de expresión coinciden con las etapas en que se establece la FEZ en las aves, estadio HH20-HH22 (28). Este centro de señalización es conservado entre aves y mamíferos y está involucrado en controlar la polaridad dorso-ventral y la extensión próximo-distal de la prominencia frontonasal (28). Los resultados obtenidos, permiten sugerir que *Hey1* puede estar desarrollando alguna función durante el establecimiento de la polaridad de esta prominencia.

En conclusión esta investigación hizo evidente el patrón de expresión específico del gen *Hey1* durante el establecimiento y desarrollo de los AB y las prominencias faciales. Este patrón

during early stages and/or regulating cell proliferation and differentiation during the late stages of face development. However, this role should be confirmed through studies exploring the correlation between gene expression patterns and cell proliferation patterns, such as gain and loss of function assays of *Hey1*.

Acknowledgements

We would like to thank professors Fernando Giraldez from the Developmental Biology group at Pompeu Fabra University, Barcelona Biomedical Research Park and Domingos Henrique from the Institute of Molecular Medicine at the University of Lisboa, Portugal. This project was funded by the National University of Colombia Bogota Research Division (División de Investigación de Bogotá, SIB) (Cod 13164-13094-14843).

permite suponer un papel de este componente de la vía Notch durante la morfogénesis facial, posiblemente estableciendo el patrón de segmentación faríngeo en la etapas tempranas y/o regulando procesos de proliferación y diferenciación celular en las fases tardías del desarrollo facial. Sin embargo, esto solo puede comprobarse con estudios de correlación entre los patrones de expresión génica y los patrones de proliferación celular, así como por medio de ensayos de ganancia y pérdida de función de *Hey1*.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de los profesores, Fernando Giraldez del grupo de Biología del Desarrollo de la Universitat Pompeu Fabra-Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, y Domingos Henrique del Instituto de Medicina Molecular de la Universidad de Lisboa, Portugal. Así como a la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá-DIB y a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia, por la financiación de este proyecto.

REFERENCES

1. Trainor PA. Molecular Blueprint for Craniofacial Morphogenesis and Development. Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration: John Wiley & Sons, Inc.; 2013.
2. Grevelléc A, Tucker AS. The pharyngeal pouches and clefts: Development, evolution, structure and derivatives. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; 21(3):325-32.
3. Parada C, Chai Y. Mandible and Tongue Development. *Curr Top Dev Biol.* 2015; 115:31-58. .
4. Liu B, Rooker SM, Helms JA. Molecular control of facial morphology. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; 21(3):309-13.
5. Minoux M, Rijli FM. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development.* 2010; 137(16):2605-21.
6. Szabo-Rogers HL, Smithers LE, Yakob W, Liu KJ. New directions in craniofacial morphogenesis. *Dev Biol.* 2010; 341(1):84-94.
7. Talora C, Campese AF, Bellavia D, Felli MP, Vacca A, Gulino A, et al. Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1782(9):489-97.
8. Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Just U. The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency. *Eur J Cell Biol.* 2011; 90(6-7):572-81.
9. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2003; 194(3):237-55.
10. Leimeister C, Externbrink A, Klamt B, Gessler M. Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech Develop.* 1999; 85(1-2):173-7.

11. Ratie L, Ware M, Barloy-Hubler F, Rome H, Gicquel I, Dubourg C, et al. Novel genes upregulated when NOTCH signalling is disrupted during hypothalamic development. *Neural Dev.* 2013; 8:25.
12. Stefanovic S, Barnett P, van Duijvenboden K, Weber D, Gessler M, Christoffels VM. GATA-dependent regulatory switches establish atrioventricular canal specificity during heart development. *Nat. Commun.* 2014; 5:3680.
13. Tateya T, Imayoshi I, Tateya I, Ito J, Kageyama R. Cooperative functions of Hes/Hey genes in auditory hair cell and supporting cell development. *Dev Biol.* 2011; 352(2):329-40.
14. Salie R, Kneissel M, Vukevic M, Zamurovic N, Kramer I, Evans G, et al. Ubiquitous overexpression of Hey1 transcription factor leads to osteopenia and chondrocyte hypertrophy in bone. *Bone.* 2010; 46(3):680-94.
15. Zuniga E, Stellabotte F, Crump JG. Jagged-Notch signaling ensures dorsal skeletal identity in the vertebrate face. *Development.* 2010; 137(11):1843-52.
16. Appendix II - Normal Table of Hamburger and Hamilton (1951; 1992). *Atlas of Chick Development (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2014.
17. Neves J, Parada C, Chamizo M, Giraldez F. Jagged 1 regulates the restriction of Sox2 expression in the developing chicken inner ear: a mechanism for sensory organ specification. *Development.* 2011; 138(4):735-44.
18. Rizzoti K, Lovell-Badge R. SOX3 activity during pharyngeal segmentation is required for craniofacial morphogenesis. *Development.* 2007; 134(19):3437-48.
19. Graham A, Okabe M, Quinlan R. The role of the endoderm in the development and evolution of the pharyngeal arches. *J Anat.* 2005; 207(5):479-87.
20. Szabo-Rogers HL, Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Fu KK, Richman JM. FGF signals from the nasal pit are necessary for normal facial morphogenesis. *Dev Biol.* 2008; 318(2):289-302.
21. Tak HJ, Park TJ, Piao Z, Lee SH. Separate development of the maxilla and mandible is controlled by regional signaling of the maxillomandibular junction during avian development. *Dev Dynam : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2017;246(1):28-40.
22. Minkoff R, Kuntz AJ. Cell proliferation and cell density of mesenchyme in the maxillary process and adjacent regions during facial development in the chick embryo. *J Embryol Exp Morph.* 1978; 46:65-74.
23. Dunlop LL, Hall BK. Relationships between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial-mesenchymal interactions in initiation of osteogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995; 39(2):357-71.
24. Ekanayake S, Hall BK. The in vivo and in vitro effects of bone morphogenetic protein-2 on the development of the chick mandible. *Int J Dev Biol.* 1997; 41(1):67-81.
25. Merrill AE, Eames BF, Weston SJ, Heath T, Schneider RA. Mesenchyme-dependent BMP signaling directs the timing of mandibular osteogenesis. *Development.* 2008; 135(7):1223-34.
26. Oldershaw RA, Hardingham TE. Notch signaling during chondrogenesis of human bone marrow stem cells. *Bone.* 2010; 46(2):286-93.
27. Oldershaw RA, Tew SR, Russell AM, Meade K, Hawkins R, McKay TR, et al. Notch signaling through Jagged-1 is necessary to initiate chondrogenesis in human bone marrow stromal cells but must be switched off to complete chondrogenesis. *Stem Cells.* 2008; 26(3):666-74.
28. Hu D, Marcucio RS. Unique organization of the frontonasal ectodermal zone in birds and mammals. *Dev Biol.* 2009; 325(1):200-10.
29. Abzhanov A, Cordero DR, Sen J, Tabin CJ, Helms JA. Cross-regulatory interactions between Fgf8 and Shh in the avian frontonasal prominence. *Congenit Anom.* 2007; 47(4):136-48.
30. Szabo-Rogers HL, Geetha-Loganathan P, Whiting CJ, Nimmagadda S, Fu K, Richman JM. Novel skeletogenic patterning roles for the olfactory pit. *Development.* 2009; 136(2):219-29.