

구개 형성과정에서 간엽 내 Smad4 매개 신호전달의 역할

윤지영 · 백진아 · 조의식 · 고승오

전북대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 구강생체과학연구소, BK21사업

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:460-5)

Mesenchymal Smad4 mediated signaling is essential for palate development

Chi-Young Yoon, Jin-A Baek, Eui-Sic Cho, Seung-O Ko

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Institute of Oral Bioscience and BK21 program,

School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

Introduction: A cleft palate is a common birth defect in humans with an incidence of 1/500 to 1/1,000 births. It appears to be caused by multiple genetic and environmental factors during palatogenesis. Many molecules are involved in palate formation but the biological mechanisms underlying the normal palate formation and cleft palate are unclear. Accumulating evidence suggests that transforming growth factor β /bone morphogenetic proteins (TGF- β /BMP) family members mediate the epithelial-mesenchymal interactions during palate formation. However, their roles in palatal morphogenesis are not completely understood.

Materials and Methods: To understand the roles of TGF- β /BMP signaling *in vivo* during palatogenesis, mice with a palatal mesenchyme-specific deletion of Smad4, a key intracellular mediator of TGF- β /BMP signaling, were generated and analyzed using the Osr2Ires-Cre mice.

Results: The mutant mice were alive at the time of birth with open eyelids and complete cleft palate but died within 24 hours after birth. In skeletal preparation, the horizontal processes of the palatine bones in mutants were not formed and resulted in a complete cleft palate. At E13.5, the palatal shelves of the mutants were growing as normally as those of their wild type littermates. However, the palatal shelves of the mutants were not elevated at E14.5 in contrast to the elevated palatal shelves of the wild type mice. At E15.5, the palatal shelves of the mutants were elevated over the tongue but did not come in contact with each other, resulting in a cleft palate.

Conclusion: These results suggest that mesenchymal Smad4 mediated signaling is essential for the growth of palatal processes and suggests that TGF- β /BMP family members are essential regulators during palate development.

Key words: Cleft palate, Smad4 protein, Mice, Osr2Ires-Cre

[paper submitted 2010. 9. 26 / revised 2010. 12. 14 / accepted 2010. 12. 22]

I. 서 론

두개 안면부는 인체의 다른 기관과는 달리 발생과정에서 매우 복잡한 기관의 형성과정을 수반한다. 출생 후 관찰되는 선천성 기형의 반 이상에서 두개 안면부의 형성장애를 동반하는 것으로 알려져 있고, 특히 구순구개열(cleft palate/lip)은 선천성 기형 중에 가장 빈발하는 기형 중 하나이다. 일반적으로 구순구개열은 신생아 700-1,000명당 1명 정도의 비율로 발생한다고 알려져 있다¹. 실제로는 구순열

(cleft lip)만 단독으로 생기는 경우와 구개열(cleft palate) 단독 또는 구순구개열을 동반하는 경우가 유전학적으로 구분되며 역학적으로 그 발생빈도나 남녀의 발생비율, 인종간의 발생비율 등이 다르게 나타난다¹.

현재까지 알려진 바에 따르면 구개의 형성은 상악돌기로 부터 구개돌기의 수직성장(growth), 수평거상(elevation), 구개상피의 접착 및 융합(adhesion/fusion)의 단계를 거치는 것으로 알려져 있다. 구개 형성의 각 단계에는 다양한 신호 전달물질들이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이들은 상피와 간엽간의 상호작용을 통하여 작용하는 것으로 알려져 있다. Transforming growth factor (TGF)- β superfamily는 구개 형성과정에서 상피와 간엽의 상호작용을 매개하는 주요 신호전달 물질로 잘 알려져 있고², 이들은 세포의 증식, 분화, 기질합성, apoptosis, 면역반응 등과 같이 다양한 세포의 생리적 기능을 조절하는 multifunctional regulator로 알려져 있다³. Smad4는 TGF- β superfamily의 세포 내 신호

고 승 오

561-756 전북 전주시 덕진동 664-14

전북대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Seung-O Ko

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Chonbuk National University School of Dentistry, 664-14 Duckjin-dong, Jeonju 561-756, Korea

TEL: +82-63-250-2211 FAX: +82-63-250-2089

E-mail: omfskso@jbnu.ac.kr

* 이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. 2009-0085733).

전달을 매개하는 중심물질로 잘 알려져 있다. TGF- β super-family member가 세포막에 존재하는 serine/threonine kinase 인 type I과 type II 수용체와 결합한 후, Smad signaling pathway를 경유하여 세포 내 신호를 전달한다. Smad protein은 현재까지 8종이 알려져 있는데, 기능에 따라 다음과 같이 3가지 군으로 분류된다. Receptor-activated Smad (R-Smad: Smad1, 2, 3, 5 and 8), common Smad (Co-Smad: Smad4), inhibitory Smad (Smad6 and 7). R-Smad 중 Smad2와 Smad3은 TGF- β 와 activin에 반응하나 Smad1과 5, 8은 bone morphogenetic proteins (BMP) signaling pathway에서 반응한다. TGF- β 나 BMP에 의해 활성화된 R-Smad들은 Smad4와 heterodimer를 형성한 후, 핵 내로 이동하여 각각의 target gene의 발현을 유도하거나 억제하게 된다⁴.

Smad4 null mouse는 초기 발생과정인 E7.5-8.5일에 사망하기 때문에 기관을 형성하는 과정에서 그 기능을 연구하는 것은 불가능하다. 따라서 이러한 한계를 극복하기 위해서 특정 조건하에서만 유전자적중이 일어나는 "Conditional Knockout Strategy"가 개발되었다⁵. 그 동안 구개발생과정에서 상피와 간엽간의 상호작용을 알아보기 위하여, 상피에서 특이적으로 활성을 나타내는 cytokeratin-14과 신경능선기원의 외배엽성 간엽조직에서 특이적으로 활성을 나타내는 Wnt1의 promoter를 이용하여 제작된 transactivator인 *K14-Cre*와 *Wnt1-Cre* mouse를 많이 이용하고 있다. 그러나 *K14-Cre*는 상피에서 특이적으로 Smad4가 유전자를 적중시키면 출생할 때까지 살아남지만, *Wnt1-Cre*는 구개간엽에 제한적이지 않고 신경능선세포 기원의 외배엽성 간엽조직 전체에서 유전자적중을 일으켜서 배아가 구개형성 이전에 사망하므로 구개형성과정에서 Smad4의 기능을 알아보는데 부적합하다⁶. 최근에 구개형성 동안 구개간엽에서 특이적인 활성을 나타내는 *Osr2*를 이용하여 구개형성과정에서 조절되는 다양한 생체 내의 조절기전을 알아보기 위하여, 2.3 kb의 프로모터를 갖는 *Osr2Ires-Cre* transgenic mouse가 제작되었다^{7,8}. 따라서 본 연구에서는 구개형성과정에서 Smad4의 역할을 알아보기 위하여, *Osr2Ires-cre* mouse를 이용하여 구개간엽에서 Smad4를 제거한 조직특이적 유전자적중생쥐를 제작하고 표현형을 분석하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

구개간엽에서 특이적으로 Smad4에 대한 유전자적중을 실시하기 위하여, Smad4 conditional allele mouse인 *Smad4^{CC}* mouse⁹와 *Osr2Ires-Cre* mouse⁸를 사용하였다. *Smad4^{CC}* mouse와 *Osr2Ires-Cre* mouse를 교배하여 *Osr2Ires-Cre:Smad4^{CC}* mouse를 얻고 이를 다시 *Smad4^{CC}* mouse와 교배하여 구개간엽에서 Smad4가 불활성화된 mutant mouse인 *Osr2Ires-Cre:Smad4^{CC}* mouse를 생성하였다. 구개상피에서

Smad4를 적중시킨 mouse의 표현형과 비교분석을 실시하기 위하여, *K14-Cre* mouse (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA)를 이용하여 *K14-Cre:Smad4^{CC}* mouse를 생성하였다.

2. 연구방법

1) Genotyping

Mouse와 배아의 genotype은 각각 꼬리 또는 양막으로부터 genomic DNA를 추출하고 유전자 특이적 primer를 사용한 polymerase chain reaction (PCR)을 시행하여 확인하였다⁹.

2) Skeletal Staining

Skeletal stain은 Martin 등¹⁰이 기술한 방법에 따라 시행하였다. 신생 생쥐의 머리조직을 얻은 후에 3차 증류수에 하룻밤 동안 incubation하였다. 다음날 70°C water bath에서 5분간 가열한 후 피부조직을 벗겨내고 100% 알코올에서 3일 동안 반응 후, Alcian blue stain solution (Alcian blue 8GX 15 mg, 95% ethanol 80 mL, glacial acetic acid 20 mL)으로 8-12시간 염색하였다. 시간이 경과한 후에 100% 알코올을 이용하여 하룻밤 동안 실온에서 반응시킨 후 세척하고 2% KOH를 이용하여 6시간 동안 투명화를 실시하고 Alizarin Red (50 mg/L of 2% KOH)를 이용하여 3시간 동안 연골과 뼈의 구분을 위한 대조염색을 실시하였다. 대조염색을 마친 후에 2% KOH와 glycerol을 이용하여 다시 투명화 과정을 실시하고 실체현미경으로 관찰하였다¹¹.

3) Histology

유전자적중에 따르는 구개의 조직학적 이상유무를 확인하기 위하여, 생쥐의 배아에서 구개형성이 진행되는 시기인 E13.5, E14.5, E15.5일에 해당되는 임신된 생쥐를 희생하여 배아를 얻었다. 각각 배아의 유전형은 양막으로부터 분리한 genomic DNA를 이용한 PCR을 시행하여 확인하였다. 배아는 어미로부터 신속하게 분리하고 4% paraformaldehyde로 4°C에서 16시간 동안 고정하였다. Genotype 결과 wild type과 mutant로 확인된 배아는 phosphate-buffered saline (PBS)로 수세한 후 통상적인 방법에 따라 파라핀에 포매한 후 회전식 박절기를 이용하여 5 μ m 두께의 연속절편을 만들고 슬라이드에 부착시켜 hematoxylin-eosin 염색을 실시하고 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 결 과

Osr2Ires-Cre mouse를 이용하여 구개간엽에서 Smad4를 유전자적중시켰을 때, mutant mouse는 구개의 융합이 실패하여 cleft palate가 나타나고 출생 후 24시간 내에 사망하였다. 뿐만 아니라 mutant mouse는 크기가 작고 사지가 굵어 있었으며 open eyelid 등을 표현형으로 나타내었다. Skeletal

stain과 조직학적 검사를 실시하여 구개의 형태학적 특징을 관찰한 결과, 간엽에서 Smad4의 유전자적중의 결과로 구개를 형성하는 뼈중 구개골의 수평돌기가 형성되지 못하여 cleft palate가 나타남이 확인되었고, 조직학적 표본에서도 cleft palate와 open eyelid가 뚜렷하게 관찰되었다.(Fig. 1)

이와 같이 Smad4 유전자적중에 의해서 생기는 cleft palate가 구개형성과정 중 어느 단계에서 이상이 발생하는지를 알아보기 위해서, 구개형성시기인 E13.5, E14.5, E15.5일의 배아를 대상으로 조직학적 관찰을 실시한 결과, 구개선반이 성장하는 시기인 E13.5일의 배아에서는 구개돌기의 성장에 있어서 조직학적으로는 wild type에서와 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 구개돌기가 수평으로 올라가는 시기인 E14.5일의 배아에서 wild type mouse의 구개돌기는 정상적으로 서로를 마주보며 올라가 구개형성에 문제가 생기지 않았지만, mutant에서는 구개돌기가 올라가지 못하고 E13.5일의 배아에서와 같이 여전히 아래를 향해 있었다. 또한 접합과 융합이 일어나는 시기인 E15.5일의 배아에서 wild type인 경우에는 양측의 구개돌기의 접합과 융합이 정상적으로 이루어져 완성된 구개를 형성한 반면에 mutant에서는 구개돌기의 올라가지 못하고 cleft palate가 생기는 것을 알 수 있었다.(Fig. 2) 이와 같은 소견으로 볼 때, *Osr2Ires-Cre* mouse를 이용하여 구개간엽에서 Smad4 유전자를 적중하였을 때 구개돌기의 거상이 정상적으로 일어나지 못함에 따라 구개돌기의 접합 및 융합이 일어나지 못함을 확인하였다.

위와 같은 연구결과로 구개간엽에서 Smad4를 매개로 하는 신호전달은 구개의 형성과정에서 필수적인 역할을 수행하고 있다는 것을 알 수 있었는데 본 연구에서는 이러한 Smad4의 역할이 구개간엽에서만 특이적인 지를 확인하고자 구개상피에서도 특이적으로 Smad4를 유전자적중을 실시하여 비교해보았다. 구개상피에서 특이적인 활성을 나타내는 K14-Cre mouse를 이용하여 Smad4를 구개상피에서 유전자적중을 실시한 결과, 간엽에서의 유전자적중 결과와는 달리 구개가 정상적으로 형성되었다. 이와 같은 결과로 보아 구개형성과정에서 Smad4를 매개로 하는 신호전달은 구개상피에서는 크지 않을 것으로 판단된다.(Fig. 3)

결과적으로 TGF- β superfamily의 mediator인 Smad4 유전자를 *Osr2Ires-Cre* mouse를 이용하여 간엽에서 유전자적중하였을 때, 구개돌기의 성장시기인 E13.5일에는 변화가 없었지만 구개돌기가 올라가는 시기인 E14.5일에는 구개선반이 올라가지 않아 cleft palate가 초래되었다. 따라서 구개골기의 간엽에서 Smad4를 매개로 하는 TGF- β 신호전달은 정상적인 구개의 형성에 매우 중요한 역할을 수행함이 확인되었다. 또한 K14-Cre를 이용하여 Smad4 유전자를 상피에서 제거하였을 때에는 정상적으로 구개가 형성되지만 *Osr2Ires-Cre*를 이용하여 간엽에서 유전자적중을 하였을 때에 cleft palate가 나타나는 것으로 보아 TGF- β superfamily의 mediator인 Smad4 유전자는 구개형성과정에서 상피에서보다는 간엽에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다.

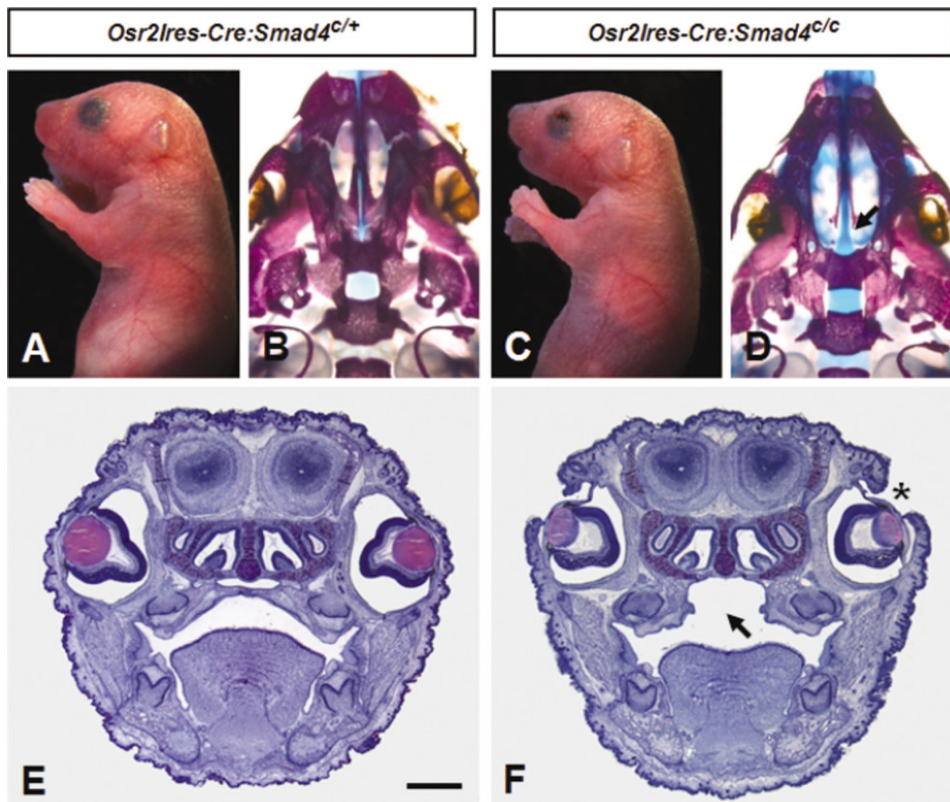


Fig. 1. Phenotypes of *Osr2Ires-Cre* mediated Smad4 conditional knockout mouse at birth. In contrast to heterozygous littermates A, B, E, mutant mice were born with open eyelid and complete absence of palatal bone C, D, F. In histological analysis, cleft palate (arrow) and open eyelid (*) was found in the mutant F.

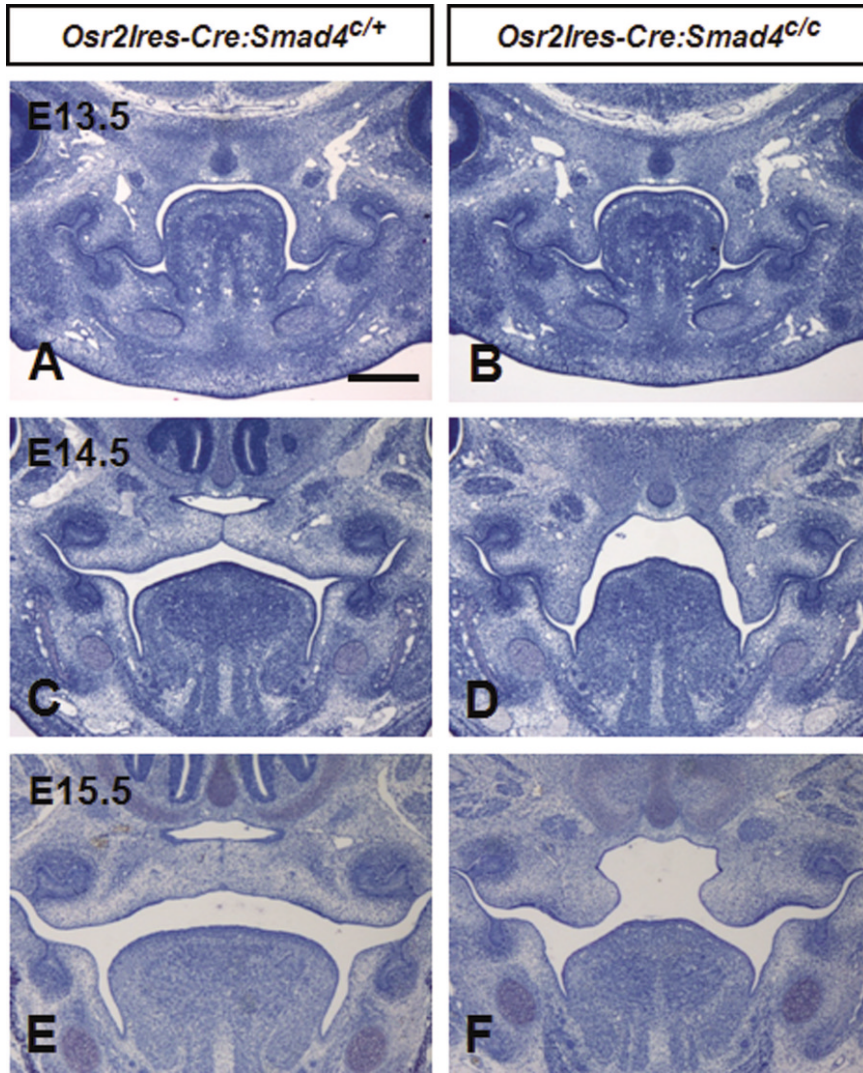


Fig. 2. Histological features of palate in *Osr2^{ires}-Cre* mediated *Smad4* conditional knockout mouse during palatogenesis. At E13.5, palatal shelves both of mutant and heterozygous littermates showed infero-medial direction A, B. At E14.5, palatal shelves of heterozygous mice elevated and fused each other C but those of mutant showed vertical orientation D. At E15.5, palatal processes were fused in heterozygous, whereas complete cleft palate were shown in mutant mice E, F.

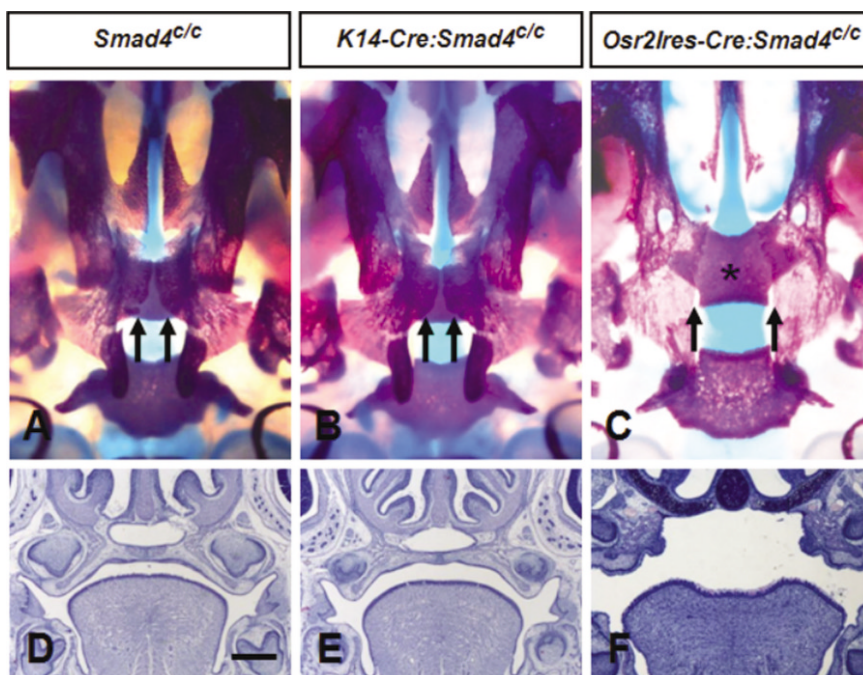


Fig. 3. Comparison of tissue specific *Smad4* conditional knockout mice in the epithelium or mesenchyme of palatal shelves using *K14-Cre* or *Osr2^{ires}-Cre* mice. Palate was formed normally in the wild type and *K14-Cre* mediated *Smad4* conditional knockout mice A, B, D, E but complete cleft palate was found in the *Osr2^{ires}-Cre* mediated *Smad4* conditional knockout mouse C, F. Note asterisk marked absence of palatal bone and arrows indicate the medial border of palatal bones.

IV. 고 찰

본 연구에서는 구개형성과정에서 상피와 간엽의 상호작용을 매개하는 TGF- β superfamily의 역할을 알아보기 위하여, 구개간엽에서 특이적으로 Smad4 유전자를 적중시킨 생쥐를 생성하고 유전자적증에 따르는 구개에서의 표현형을 확인하였다.

구개의 형성과정에서 2차 구개는 상악돌기로부터 형성되는 구개선반의 성장, 거상, 그리고 구개돌기 상피의 접착 및 융합의 단계를 거치게 된다. 이와 같은 구개의 형성은 상피와 간엽간의 상호작용을 통해 이루어지는 것으로 알려져 있으며 다양한 신호전달물질들이 구개상피와 간엽간의 상호작용을 조절하는 것으로 알려져 있다¹¹. 현재까지 생쥐를 대상으로 한 유전자적증의 결과로 cleft palate를 표현형으로 나타내는 유전자들이 많이 보고되어 왔으며, 이들은 분비단백질 또는 각각의 수용체이거나 다른 단백질의 합성을 조절하는 전사인자들이 대부분이다. 현재까지 생쥐에서 유전자적증에 따라 cleft palate를 표현형으로 보고된 분비 단백질과 각각의 수용체로는 *Bmp*, *Bmp type1 receptor*, *Fgf10*, *Fgfr2b*, *Shh*, *Gabrb3*, *Tgfb3*, *Tgfb2*, *Tgfb1* 등이 있고, 전사조절인자로는 *Msx1*, *Osr2*, *p63*, *Pitx2*, *Satb2*, *Shox2* 등이 알려져 있다. 이들은 구개의 형성과정에서 세포의 증식, apoptosis 그리고 구개돌기의 성장과 부착 등에 영향을 주는 것으로 알려져 있다¹²⁻²¹.

이들 중 특히 TGF- β superfamily의 신호전달이 2차 구개의 형성과정에서 핵심적인 역할을 수행하고 있는 것으로 보고되었다¹¹. 본 연구에서는 구개의 형성과정에서 필수적으로 일어나는 상피와 간엽간의 상호작용 조절과정에서 TGF- β superfamily의 신호전달과정을 이해하기 위하여, 구개간엽과 구개 상피에서 Smad4를 선택적으로 적중한 생쥐를 제작하여 표현형을 분석하였다. 연구결과, 구개간엽에서 특이적으로 Smad4 유전자를 적중한 생쥐에서는 구개선반의 성장과 거상이 정상적으로 일어나지 못하여 cleft palate가 유발됨을 확인하였다. 그러나 이와는 달리 구개상피에서 Smad4 유전자를 적중한 생쥐에서는 정상적으로 구개가 형성됨을 확인하였다. 이와 같은 결과는 구개형성과정에서 구개상피에서 보다는 구개간엽에서 Smad4를 매개로 하는 신호전달이 정상적인 구개의 형성에 필수적임을 시사한다. 일찍이 구개형성과정 동안에 구개상피에서 특이적으로 발현되는 TGF- β 3 유전자를 적중한 생쥐의 구개형성과정에서 구개돌기의 융합실패로 인한 cleft palate가 유발됨이 보고된 바 있어서¹² 구개상피에서의 TGF- β 신호전달이 정상적인 구개형성에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 여겨져 왔으나 본 연구결과에서와 같이 상피보다는 간엽에서 Smad4를 매개로 하는 신호전달이 구개의 형성과정에서 핵심적인 역할을 수행함을 확인하였다.

구개의 형성과정에서 상피와 간엽의 상호 신호전달 과정을 이해하기 위해, 구강상피와 구개간엽에서특이적으로

유전자적증을 시도하고 생성된 mutant mouse의 표현형을 분석한 연구보고들은 대부분이 TGF- β super family의 수용체를 대상으로 한 보고들이 대부분이었다. Ito 등²⁰은 *Wnt1-Cre* mouse를 이용하여 간엽에서 특이적으로 TGF β 2를 적중하고 표현형으로 cleft palate와 두개골의 형성부전이 나타남을 보고한 바 있으나, Xu 등²¹은 *K14-Cre* mouse를 이용하여 상피에서 TGF β 2를 적중시킨 생쥐를 생성하고 분석한 결과 연구개에서의 부분적인 cleft가 나타남을 보고한 바 있다. 또한 Liu 등¹⁴은 상피에서 특이적으로 유전자를 적중한 결과 BMPR1A를 경유하는 신호전달이 정상적인 구순과 구개의 형성에서 필수적인 역할을 수행함을 보고하였다. 이와 같은 연구보고들을 살펴보면 TGF- β superfamily는 구개간엽보다는 구개상피에서 차단되었을 때 정상적인 구개의 형성이 차단되며, 구개간엽에서의 신호전달 차단은 연구개나 구개점막에서의 부분적 형성이상만을 표현형으로 나타내었다. 비록 이들 연구에서 조직특이적 유전자적증을 시도하기 위한 transactivator가 본 연구에서 사용한 것과는 차이가 있지만 이와 같은 현상은 구개상피나 구개간엽 독자적인 신호전달의 이상에 의한 결과라기보다는 구개형성과정에서 상피와 간엽간의 상호작용이 존재하며 이와 같은 상호작용을 매개하는 신호전달이 구개간엽에서 주로 일어남을 시사한다. 향후 다양한 marker를 이용한 분자발현변동에 관한 실험을 수행함으로써 구개형성과정에서 일어나는 상피와 간엽간의 상호작용과 이를 조절하는 신호전달과정을 밝혀낼 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

구개형성과정에서는 많은 신호전달물질들이 관여하고 있으며, 이들은 구개돌기의 수직성장, 수평거상, 구개상피의 접착 및 융합을 달성하기 위하여 상피와 간엽 간의 상호작용을 매개함으로써 핵심적인 역할을 수행한다. 본 연구에서는 구개형성과정에서 TGF- β superfamily의 핵심적인 세포내 신호전달 매개체인 Smad4가 간엽에서의 신호전달 과정에서 결정적인 역할을 수행하고 있음을 확인하였다. 결론적으로 Smad4를 매개로 하는 TGF- β superfamily의 신호전달은 정상적인 구개의 형성과정에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며 상피에서보다는 간엽에서 더욱 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각되고 이는 구개형성과정에서 상피-간엽 상호작용을 매개하는 신호전달이 구개간엽에서 주로 일어남을 시사한다.

References

1. Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, et al. Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. *Am J Hum Genet* 2002;71:349-64.
2. Gritli-Linde A. Molecular control of secondary palate develop-

- ment. *Dev Biol* 2007;301:309-26.
3. Massagué J. How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-78.
4. Weinstein M, Yang X, Deng C. Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:49-58.
5. Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001;24:71-80.
6. Ko SO, Chung IH, Xu X, Oka S, Zhao H, Cho ES, *et al.* Smad4 is required to regulate the fate of cranial neural crest cells. *Dev Biol* 2007;312:435-47.
7. Lan Y, Oviatt CE, Cho ES, Maltby KM, Wang Q, Jiang R. Odd-skipped related 2 (*Osr2*) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis. *Development* 2004;131:3207-16.
8. Lan Y, Jiang R. Sonic hedgehog signaling regulates reciprocal epithelial-mesenchymal interactions controlling palatal outgrowth. *Development* 2009;136:1387-96.
9. Yang X, Li C, Herrera PL, Deng CX. Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genesis* 2002;32:80-1.
10. Martin SJ, Newmeyer DD, Mathias S, Farschon DM, Wang HG, Reed JC, *et al.* Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide-induced apoptosis. *EMBO J* 1995;14:5191-200.
11. Ferguson MWJ, Honig LS. Epithelial-mesenchymal interactions during vertebrate palatogenesis. *Curr Top Dev Biol* 1984;19:137-64.
12. Dudas M, Kim J, Li WY, Nagy A, Larsson J, Karlsson S, *et al.* Epithelial and ectomesenchymal role of the type I TGF- β receptor ALK5 during facial morphogenesis and palatal fusion. *Dev Biol* 2006;296:298-314.
13. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, *et al.* Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 1995;11:415-21.
14. Liu W, Sun X, Braut A, Mishina Y, Behringer RR, Mina M, *et al.* Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. *Development* 2005;132:1453-61.
15. Rice R, Spencer-Dene B, Connor EC, Gritli-Linde A, McMahon AP, Dickson C, *et al.* Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *J Clin Invest* 2004;113:1692-700.
16. Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genet* 1994;6:348-56.
17. Zhao Y, Guo YJ, Tomac AC, Taylor NR, Grinberg A, Lee EJ, *et al.* Isolated cleft palate in mice with targeted mutation of the LIM homeobox gene *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:15002-6.
18. Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* 2002;129:4135-46.
19. Yu L, Gu S, Alappat S, Song Y, Yan M, Zhang X, *et al.* Shox2-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development* 2005;132:4397-406.
20. Ito Y, Yeo JY, Chytil A, Han J, Bringas P Jr, Nakajima A, *et al.* Conditional inactivation of Tgfbr2 in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development* 2003;130:5269-80.
21. Xu X, Han J, Ito Y, Bringas P Jr, Urata MM, Chai Y. Cell autonomous requirement for Tgfbr2 in the disappearance of medial edge epithelium during palatal fusion. *Dev Biol* 2006;297:238-48.