

Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Břežná

Vývoj obličeje a jeho molekulární podstata
Facial development and its molecular background

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Mária Hovořáková, Ph.D.

Praha, 2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2019

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Márie Hovořákové, Ph.D. za trpělivost, čas a cenné rady při vedení této bakalářské práce.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je přehledem nejdůležitějších milníků při vývoji lidského embrya v oblasti hlavy a obličeje a přináší ucelený přehled nejnovějších poznatků ve vývojové a molekulární embryologii kraniofaciálních struktur se zaměřením na fúzi faciálních výběžků. V raném embryonálním období se odehrávají nejdůležitější vývojové změny v oblasti hlavy. Tato fáze je proto nejvíce náchylná na vznik defektů a malformací. Nejčastějším defektem v oblasti hlavy a obličeje je rozštěp rtu a/nebo patra, vyskytující se samostatně (nesyndromický) nebo v rámci syndromu (syndromický). Nejčastější příčinou vzniku rozštěpu je nedostatečná proliferace v obličejových výběžcích a patrových ploténkách, která je zapříčiněna chybnou exprimací genů nebo receptorů daných genů, jejichž funkci lze modelově testovat na myších a kuřatech. Předložená práce sumarizuje také znalosti z etiologie rozštěpových vad v kontextu nových poznatků o splývání obličejových výběžků a osifikace v dané oblasti. Prohlubování našich znalostí vývoje obličeje a defektů s ním spojených je důležité pro přesnou prenatální diagnostiku a úspěšné léčení pacientů, jejichž problémy nemusí být pouze estetické, ale i život ohrožující.

Klíčová slova: obličejové výběžky, rozštěp rtu a/nebo patra, obličejové vady, žaberní oblouk, růstové faktory, transkripční faktory, embryo

ABSTRACT

This bachelor thesis is an overview of the most important developmental and molecular milestones in the embryonic development of the human head and face and it brings a comprehensive overview of the latest knowledge in developmental and molecular biology of craniofacial structures with focus on the fusion of facial processes. During early embryogenesis the most important developmental changes take place in the cranial area. This period is the most susceptible period for defects and malformations formation. The most common defect in the craniofacial region is the cleft lip and/or palate occurring alone (non-syndromic) or as a part of a syndrome (syndromic). The most common reason of the cleft formation is the insufficient proliferation in the facial processes and palatal shelves, which is caused by the incorrect expression of genes or receptors of these genes whose function can be studied on the mouse and chick models. The present thesis summarizes also the knowledge of etiology of orofacial clefts in the context of new findings about the fusion of facial processes and ossification in the cleft area. Improvement of our knowledge of facial development and defects associated with it is important for accurate prenatal diagnosis and successful treatment of patients, whose problems may not only be aesthetic but also life-threatening.

Keywords: facial processes, cleft lip and/or palate, facial defects, pharyngeal arch, growth factors, transcription factors, embryo

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Raný vývoj obličeje.....	2
2.1. Žaberní oblouky.....	3
2.2. Intermaxilární segment.....	4
2.3. Vznik nosu.....	4
2.4. Sekundární patro.....	5
3. Molekulární podstata dějů souvisejících s formací obličeje a patra.....	6
3.1. Homeotické geny.....	8
3.2. Hedgehog rodina.....	8
3.3. WNT dráha.....	9
3.4. Endotheliny.....	9
3.5. Růstové faktory.....	10
3.5.1. Fibroblast growth factor (FGF).....	10
3.5.2. Transforming growth factor (TGF).....	11
3.5.3. Platelet Derived Growth Factor (PDGF).....	12
3.6. Transkripční faktory.....	12
3.6.1. Interferon-regulatory factor (IRF).....	12
3.6.2. Proteiny NME.....	13
3.6.3. Rho GTPase-activating protein 29 (ARHGAP29).....	13
3.6.4. T-BOX (TBX).....	14
4. Vady obličeje.....	15
4.1. Rozštěp rtu a/nebo patra (CLP).....	15
4.1.1. Syndromický a nesyndromický CLP.....	15
4.1.2. Etiologie rozštěpů.....	16
4.1.3. Rozštěp patra vázaný na X.....	20
4.1.4. Anomálie zubů při CLP.....	20
4.2. Syndromy spojené s orofaciálními vadami se zaměřením na rozštěpy obličeje.....	23
4.2.1. Van der Woude syndrom (VWS).....	23
4.2.2. Popliteální pterygický syndrom.....	24
4.2.3. Pierre Robinův syndrom.....	24
4.2.4. Sticklerův syndrom.....	25
4.2.5. Treacher Collins syndrom.....	25

4.2.6. CHARGE syndrom	25
5. Závěr.....	26
6. Seznam literatury.....	27

Seznam zkratek

ABCA4	ATP vazebná kazeta podskupina A člen 4
ARHGAP29	Rho GTPáza aktivující protein 29
BMP/Bmp	Kostní morfogenetický protein
CLP	Rozštěp rtu a/nebo patra
COL2A1, COL9A (1-3), COL11A (1,2)	alpha 1 řetězec kolagenu typ II, alpha 1-3 řetězec kolagenu typ IX, alpha 1,2 řetězec kolagenu typ XI
CPX	Rozštěp patra vázaný na chromozom X
Dlx	Distal-less homeobox
Ece	Enzym konvertující endotheliny
ED	Embryonální den
ET	Endothelin
ETA, ETB	Receptory endothelinů typu A a B
FGF/Fgf	Fibroblastový růstový faktor
Fgfr	Receptor fibroblastového růstového faktoru
GRHL3	Grainyhead like transcription factor 3
Hand2	Heart and neural crest derivatives-expressed protein 2
Hh	Rodina hedgehog
Hox	Homeobox geny
CHD7	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7
IAD	IRF sdružená doména
IRF	Interferon regulující faktor

LoF	Ztráta funkce
MAFB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
Msx	Muscle segment homeobox gene
NSCLP	Nesyndromický rozštěp rtu a/nebo patra
p63	Nádorový protein p63
PDGF	Růstový faktor z destiček
PVRL1	Poliovirus receptor-related 1
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rho/RhoA	Ras homolog gene family/člen A
RIPK	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase
RTK	Receptory tyrozinkinázové skupiny
Shh	Sonic hedgehog
Smad	Intracelulární proteiny převádějící extracelulární signály do jádra
Spry	Sprouty
SRR	Serinové auroinhibiční regiony
TBX	T-box
TCOF1	Treacle ribosome biogenesis factor 1
TGF-beta	Transformující růstový faktor beta
TGF-betaR	Receptor pro transformující růstový faktor beta
VWS	Syndrom van der Woude
WNT / Wnt	Wingless

1. Úvod

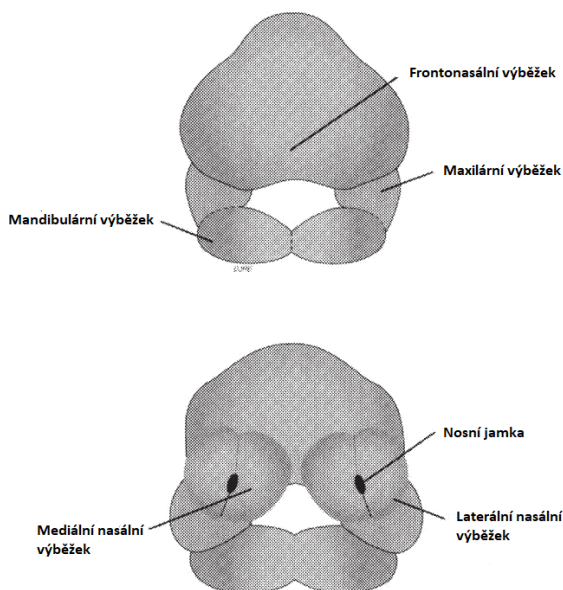
Vývoj hlavové části začíná u lidského zárodku ve 3. týdnu, spolu s vytvářením tří zárodečných listů (ektoderm, mesoderm a entoderm) v procesu gastrulace. Gastrulace je spojena s vytvořením primitivního proužku na povrchu epiblastu, který je na hlavovém konci lehce zvýšen a tvoří Hensenův uzel s primitivní jamkou. Buňky epiblastu obrůstají v hlavové části prechordovou ploténku, která se vytváří mezi koncem *chorda dorsalis* a orofaryngovou membránou z buněk, které vyšly z Hensenova uzlu. Orofaryngová membrána je oblast s těsně přilehlým ektodermem a entodermem. Zde bude ústní dutina přecházet v hltan. V hlavové části embrya se proti slepě končícímu začátku primitivního střeva začne vchlipovat ektoderm. Vytváří jamku zvanou stomodeum, ze které se následně vyvíjí dutina ústní. Kolem stomodea se vytvoří pět obličejových výběžků (nepárový frontonasální, párové maxilární a mandibulární). Maxilární a mandibulární výběžky vznikají jako derivát prvního faryngeálního oblouku. Na konci 4. týdne jsou již na frontonasálním výběžku patrné nasální plakody, vzniklé ztluštěním povrchového ektodermu. Proliferací plakod v 5. týdnu dochází ke vzniku nosních jamek, okolo kterých se tvoří tkáňový val, základ pro nosní výběžky (laterální a mediální). Mandibulární výběžky splývají ve střední čáře za vzniku dolní čelisti. Následně dochází ke splynutí maxilárních výběžků s mediálními nasálními výběžky, přičemž mediální nasální výběžky srůstají vzájemně i ve střední čáře. Na podkladě mediálních nasálních výběžků vzniká s příspěvkem výběžků maxilárních intermaxilární segment. Formování patra je dlouhý proces a končí až ve 12. týdnu. Prenatální vývoj lidského obličeje je charakterizován prodloužením hlavy a současným vyvýšením střední oblasti.

Jednou z nejčastěji se objevujících vývojových vad v oblasti obličeje jsou vady rozštěpové. Jedná se o rozštěp rtu, čelisti, patra nebo kombinaci uvedených rozštěpů. Rozštěp není pouze kosmetická vada, u novorozenců nastávají problémy s kojením, kdy mateřské mléko může vtékat do dutiny nosní. V pozdějším věku mohou nastat i problémy s postavením zubů, artikulací a duševním prožíváním dítěte v kolektivu. Je tedy důležité vadu včas identifikovat a zvolit vhodnou léčbu spolu s plastickými chirurgy a stomatology.

Cílem předložené práce bylo shrnout nynější poznatky o vývoji obličeje se zaměřením na vývoj raný a podložit je molekulárními aspekty. V práci jsem se také věnovala patologii tohoto procesu s důrazem kladeným na rozštěp rtu a/nebo patra, jehož vznik je následně také popsán i z molekulárního hlediska.

2. Raný vývoj obličeje

Mesenchym tvořící hlavu a krk vzniká z paraaxiálního mesodermu a ektomesenchymu z neurální lišty a z ektodermových plakod. Významnou strukturou při vývoji obličeje jsou faryngové oblouky, které začínáme pozorovat ve 4.-5. týdnu embryonálního vývoje. Jsou tvořeny mesenchymem, který je oddělen žaberními vkleslinami. Faryngové oblouky se postupně diferencují a 42. den embryonálního vývoje již na obličeji můžeme spatřit pět výběžků (obr. 1). Z prvního faryngového oblouku vznikají mandibulární a maxilární faciální výběžky. Nachází se okolo stomodea, kde maxilární výběžky nalezneme laterálně, mandibulární kaudálně. Tyto dva páry výběžků jsou tvořeny buňkami neurální lišty odvozenými z rostrální oblasti zadního mozku (Lan et al., 2015). Frontonasální výběžek se tvoří na horní hranici stomodea a je tvořen mezenchymálními buňkami odvozenými z buněk předního mozku a středního mozku (Osumi-Yamashita et al., 1994; Lan et al., 2015). Sousedí z obou stran s čichovými plakodami, z nichž vznikají nosní jamky, a to vchlipováním okolo 5. týdne. Tkáňový val, který se vytvoří okolo nosních jamek, dá později vzniknout nosním výběžkům (mediálním a laterálním) (obr. 1). Ve střední čáře dochází ke srůstu dvou mediálních nasálních výběžků, ke kterým z obou stran přirůstají výběžky maxilární a utváří společně horní ret. Dolní ret a čelist je pak vytvořena splynutím mandibulárních výběžků. Maxilární výběžky se nadále zvětšují a později utvoří tváře a s příspěvkem mediálních nasálních výběžků i horní čelist. Centrální část frontonasálního výběžku se podílí na vzniku hřbetu a kořene nosu. Na stavbě nosu se dále podílejí také laterální nosní výběžky, a to tvorbou nosních křídel.



Obrázek 1: Obličejové výběžky (upraveno podle (Francis-West, Robson, & Evans, 2012))

2.1. Žaberní oblouky

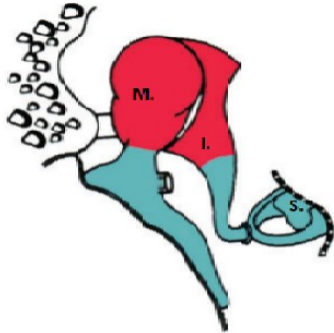
Jak již bylo zmíněno výše, významná struktura vznikající z neurální lišty okolo 4.-5. týdne embryonálního vývoje v oblasti hlavy a krku jsou párové žaberní (faryngové) oblouky. Mesenchymová výplň oblouků je oddělená žaberními vkleslinami v ektodermu. Čtyři páry jsou jasně patrné, pátý a šestý pár lze u člověka považovat spíše za rudimentární. Každý oblouk obsahuje hlavový nerv vytvořený z ektodermové plakody a tepnu, má svou svalovinu a budou se z něj diferenciovat specifické struktury okolo 42. dne vývoje.

První žaberní oblouk vzniká okolo stomodea koncem 4. týdne a tvoří dva výběžky, maxilární, položen kranálně, a kaudální mandibulární, ten obsahuje Meckelovu chrupavku. Ta později zaniká a zůstane po ní část sluchových kůstek: hlava kladívka a tělo kovádky (Whyte et al., 2009) (obr. 2). Z maxilárního výběžku dále vzniká část premaxily, maxila, *os palatinum*, *os zygomaticum*.

Druhý žaberní oblouk, který je vyztužen Reichertovou chrupavkou, dá vzniknout rukojeti kladívka, dlouhému výběžku kovádky spolu s většinou třmínku (Whyte et al., 2009) (obr. 2). Dále pak výběžku *processus styloideus* a části těla a menším rohům jazyky.

O vzniku kůstek ucha existuje i klasická teorie, která se stále ještě objevuje v některých učebnicích (Sadler, 2011), kde kladívko a kovádky se vyvinuly od prvního oblouku a třmínek od druhého. Tuto teorii však Whyte (2009) ve svém experimentu vyvrátil (Whyte et al., 2009).

Následující oblouky nejprve vyztužují stěny primordiálního hltanu. Třetí oblouk se diferencuje ve zbytek těla jazylky a její velké rohy. Zbylé oblouky (4.-6.) tvoří chrupavky hrtanu.



Obrázek 2: M. – Malleus (Kladívko), I. – Incus (Kovadlinka), S. – Stapes (Třmínek), červeně struktury prvního žaberního oblouku a modře druhého žaberního oblouku (upraveno podle (Whyte et al., 2009))

Narušení vývoje prvních dvou žaberních oblouků je základem mnoha kraniofaciálních defektů.

2.2. Intermaxilární segment

Maxilární výběžky při srůstání rostou mediálním směrem. Nesplývají pouze části povrchové, ale i hlubší. Horní ret a čelist jsou vytvořené srůstem mediálních nasálních výběžků ve střední čáře, se kterými se z obou laterálních stran spojí výběžek maxilární. Mediální nasální výběžky jsou s maxilárními nejprve spojeny epitelovým můstkem (Wei et al., 2000). Mediální výběžky postupně srůstají vzájemně po celé své délce a vytvoří intermaxiální segment, později diferencovaný na philtrum a premaxilu. Maxilární výběžky srůstají s mediálními nasálními přispívajíc k intermaxile (Lisson & Kjær, 1997), a také po celé své délce pomocí patrových plotének, které nakonec svým splynutím ve střední čáře vytvoří sekundární patro.

2.3. Vznik nosu

Poprvé můžeme pozorovat struktury nosu na frontonasálním výběžku, na jehož stranách se začne formovat ztlustělý ektoderm čichových plakod. Okolo 5. týdne se čichové plakody vchlipují a vytvoří nosní jamky, obklopeny tkáňovým valem, který dá vzniknout nasálním výběžkům (He & Soriano, 2013). Mediálně od jamek se vytvoří výběžky nasální mediální a laterálně od nich výběžky nasální laterální. Mediální nasální výběžky spolu srůstají ve střední čáře a intermaxilární segment, jehož vznik byl popsán výše, plynule přejde do nosního septa

(Barteczko & Jacob, 2004), které se později přiloží na sekundární patro. Interkalace alveolární části premaxily a maxilárního oblouku a její kontakt s dolní částí vyvíjející se nosní přepážky hraje zásadní roli při uzavření patra (Barteczko & Jacob, 2004). V 6. týdnu jsou nosní jamky zřetelně prohloubeny a od dutiny ústní je odděluje oronasální membrána. V té se následně objeví otvory *choanae primitivae*, ležící těsně za primárním patrem. Otvory odděluje frontonasální val, pozdější septum. Po utvoření sekundárního patra leží choany na rozhraní nosní dutiny a nosohltanu. Vedlejší nosní dutiny dosahují definitivní velikosti až během puberty.

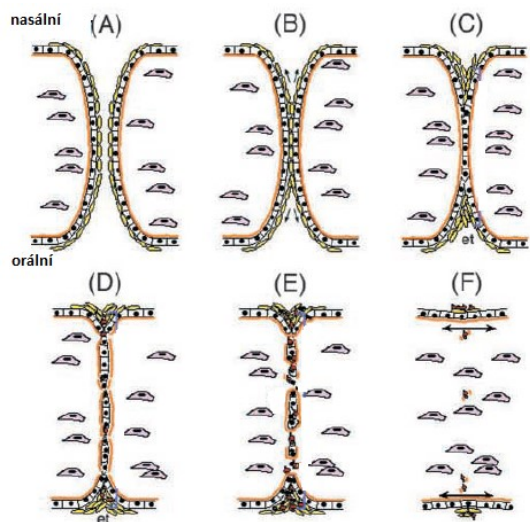
2.4. Sekundární patro

Sekundární patro vzniká ze dvou patrových plotének maxilárního výběžku. Spojuje se anteriorně s patrem primárním a ve stejný čas se pohybuje dolů nosní septum a přikládá se shora na vytvořené patro. Srůst následuje po vytvoření premaxily. Vymezení mezi primárním a sekundárním patrem je v dospělosti *sutura incisiva*. Tato hranice však neodpovídá hranici embryonální (Lisson & Kjær, 1997; Barteczko & Jacob, 2004).

Anteriorní premaxilární část patra se vyvíjí z frontonasálního výběžku a posteriorní část patra pochází z maxilárního výběžku. Patrové ploténky se formují okolo 6. týdne vývoje vertikálně podél jazyka (Lan et al., 2015). Proces uzavírání patra probíhá v osmém týdnu těhotenství zepředu dozadu mezi měkkými laterálními patrovými výběžky, které se posouvají z vertikální do horizontální polohy v procesu zvaném horizontalizace (Okuhara & Iseki, 2012). V anteriorní části patra dochází k uzavření patra tak, že je mezi patrové výběžky vsunuta premaxila. U nejmladších embryí je obdélníkový otvor před fúzí patra ohraničen patrovým epitelem. U starších začíná zdvih patrových plotének a otvor se mění do tvaru písmene Y. Otevřené Y se uzavírá tak, že přední část epitelové výstelky mizí dříve než posteriorní (Lisson & Kjær, 1997). Úplné nahrazení epitelu kostní tkání je doprovázeno tvorbou kostí v patře. Švy patra mediální i transverzální a *sutura incisiva* zůstávají jasně viditelné i po vymizení epitelu.

Patrové ploténky tvoří hlavně kraniální neurální buňky z mesenchymu neurální lišty, pokrytých jednoduchým embryonálním epitelem (Lan et al., 2015). Jejich vzájemné splynutí je zásadním předpokladem pro vytvoření sekundárního patra. Orální epitel je složený ze 2 vrstev, a to svrchního peridermu a bazálních buněk. Orální periderm je plochá epitelová vrstva, která kryje bazální buňky. Periderm zastává mnoho rolí ve vývoji patra, včetně prevence patologické orální adheze mezi patrovými ploténkami a přilehlými strukturami. Je totiž první, který se dostane

do kontaktu s protější ploténkou. Buňky peridermu při fúzi patrových plotének migrují, což vede k tvorbě epitelových trojúhelníků, kde většina z buněk peridermu zemře. Tyto buňky řídí adhezi a migraci epitelových buněk mediálního okraje tkáně. Tato migrace je nezbytná k zahájení fúze. Pokud k migraci nedojde, adheze není úplná (Cuervo & Covarrubias, 2004) (obr. 3). Bazální epitel je kubický, nacházející se mezi peridermem a bazální membránou, pod kterou se nachází mesenchym.



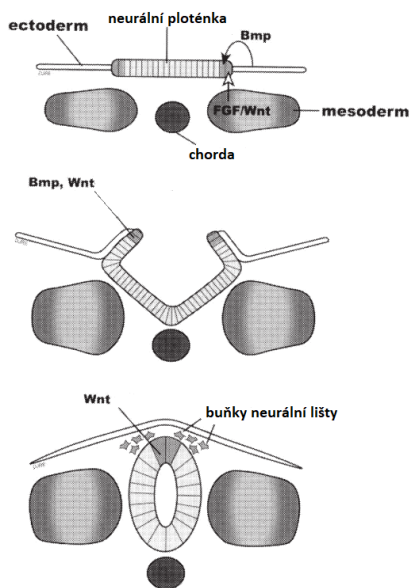
Obrázek 3: Fúze patrových plotének (A): patrové ploténky se přibližují, buňky peridermu (žlutě) překryly epitelové buňky mediálního okraje (bíle); (B): buňky peridermu jsou v kontaktu a pohybují se ve směru šipek; (C): epitelové buňky mediálního okraje interagují do jedné vrstvy, buňky peridermu tvoří epitelové trojúhelníky (et); (D a E): epitelové buňky mediálního okraje i buňky v epitelových trojúhelnících umírají; (F): mesenchymální buňky (růžově) se jen mírně rozprostřou ve směru šipek (upraveno podle (Cuervo & Covarrubias, 2004))

3. Molekulární podstata dějů souvisejících s formací obličeje a patra

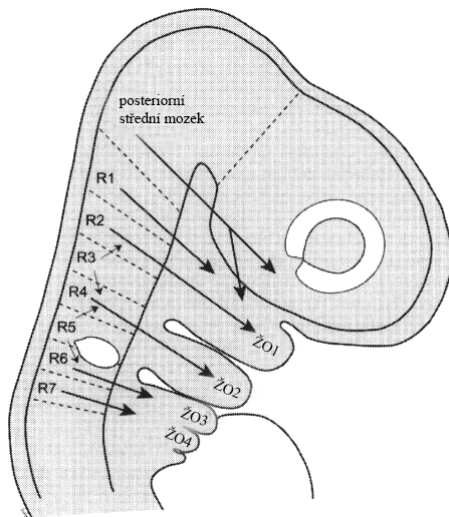
Při utváření organismu jsou tělní části odděleny hranicemi, mezi nimiž se buňky specializují na vytváření určitých struktur. Tyto pomyslné hranice jsou zde díky časovému i prostorovému oddělení exprese jednotlivých genů. Tím buňky získají polohovou identitu při procesu vzorování (Meinecke et al., 2018). Mezi hlavní genové rodiny ovlivňující tvorbu obličejových struktur patří kostní morfogenetické proteiny (*Bmps*), Fibroblastové růstové faktory (*FGFs*), geny rodiny *Hedgehog* (*Hh*), dráha *Wingless* (*Wnt*), kyselina retinová a endotheliny (Depew et al., 2005). Experimentální embryologické studie na myších určily období mezi ED10 a ED10.5

jako klíčové, kdy exprese genů v žaberních obloucích definitivně ovlivňuje kraniofaciální struktury embrya (Depew et al., 2005).

Z okrajů neurálních valů vznikají buňky neurální lišty, a to díky rodině proteinů BMP a WNT (obr. 4). V budoucí oblasti hlavy vznikají buňky hlavové neurální lišty, seskupujících se do segmentů nazývají se rhombomery. Buňky z rhombomer následně migrují do žaberních oblouků (obr. 5). Tento tok usměrňují Ephriny (a jejich receptory) a Semaforiny (Sadler, 2011). Žaberní výchlipky vznikají migrací entodermu, k čemuž dochází díky stimulaci pomocí *FGF*. Exprese těchto morfogenů řídí diferenciaci mesenchymu žaberních oblouků. Mesenchym na signály odpovídá expresí transkripčních faktorů (např. kódované *Homeobox* geny). Příjemcem těchto signálů je převážně epitel (Francis-West et al., 2012). Buňky v obličeji nejprve exprimují podobné geny, a to kvůli svému společnému počátku. Díky multipotenci se ale následně jejich osudy rozdělí, a to dá vzniknout obličejovým výběžkům s odlišným osudem (Buchtová et al., 2010).



Obrázek 4: Vliv *Wnt*, *Bmp* a *FGF* signalizace na vznik neurální trubice (upraveno podle (Francis-West et al., 2012))



Obrázek 5: Migrace buněk z rhombomer (R) do příslušných žaberních oblouků (ŽO) (upraveno podle (Francis-West et al., 2012))

3.1. Homeotické geny

Homeotické geny tvoří rodina genů významná při embryogenezi obsahující homeobox (Hox), což je sekvence DNA schopná po translaci fungovat jako transkripční faktor. Homeoboxy jsou vysoce konzervované nukleotidové sekvence o 180 párech bází (Wolf et al., 2014).

Hoxa2 řídí vznik druhého žaberního oblouku a kosterních struktur z něj diferencovaných. Je exprimován v neurální liště. Po migraci těchto buněk přejímá expresi ektoderm (Francis-West et al., 2012).

Rodina genů *Dlx* (*distal-less* homeobox) je nezbytná pro vývoj a morfogenezi žaberních oblouků. Na myším modelu bylo zjištěno, že specifická exprese *Dlx* ovlivňuje vnitřní diferenciaci, tedy tvorbu jednotlivých struktur z jednoho žaberního oblouku (Depew et al., 2005). Například *Dlx5* a *6* interaguje s geny *Hand2* (Heart and neural crest derivatives-expressed protein 2), které jsou silně exprimované v mandibulárním výběžku, a pomáhají tak jeho diferenciaci u kuřat (Buchtová et al., 2010).

3.2. Hedgehog rodina

Hedgehog rodina kóduje proteiny důležité pro interakci buňka-buňka a je nutná pro vývoj patra a frontonasálního výběžku. Součástí této genové rodiny je gen *Sonic hedgehog* (*Shh*), který je specificky významný ve formaci obličeje. *Shh* má vysoce konzervovanou N-koncovou oblast, zato C-koncová oblast je velice variabilní. Ztráta signalizace *Shh* v časných stádiích neurální

ploténky má zásadní vliv na kraniofaciální morfogenezi (Hu & Helms, 1999). Bylo shledáno, že *Shh* je převážně exprimován v místech epitelově mezenchymálních interakcí a je kriticky důležitý zejména pro frontonasální výběžek a maxilární výběžky (Hu & Helms, 1999). Ovlivňuje také růst patrových plotének, a to pomocí regulace exprese *Fgf10* a *Fgf7* v mesenchymu (Lan et al., 2015). Ukázalo se, že *Shh* exprimovaný v epitelu přímo signalizuje mesenchymu při růstu patra, přičemž *Shh* signalizace reguluje expresi *Bmp2*, *Bmp4*, *Msx1* (Muscle segment homeobox gene) a *Fgf10* (Deshpande & Goudy, 2019). Je exprimován také přímo v žaberních obloucích, kde je na něm závislá exprese *T-box1* (Garg et al., 2001), ale samotný vývoj žaberních oblouků na něm závislý není (Francis-West et al., 2012). Nejvíce kritická u embryí kuřat je ztráta exprese *Shh* mezi ED25-ED26, která vede k těžkým malformacím (Hu & Helms, 1999).

3.3. WNT dráha

WNT dráha se podílí na regulaci buněčné proliferace, z hlediska vývoje obličeje převážně ve frontonasálním výběžku (Szabo-Rogers et al., 2008), a v hlavové oblasti je zodpovědná za vývoj mozku. Homologní gen *wingless* u *Drosophila* hraje klíčovou roli v embryogenezi (Francis-West et al., 2012). *Wnt5a* byl studován na myších embryích a popsán jako nezbytný pro růst obličeje. Je exprimován převážně v prvním žaberním oblouku a ve všech obličejových výběžcích a nejspíše hraje zásadní roli při růstu a diferenciaci tkání. Ztráta exprese vede k letalitě, ale i tak můžeme u myších embryí pozorovat zkrácený čenich (Yamaguchi et al., 1999). Dále byl u lidských embryí popsán gen *WNT3* lokalizovaný na chromozom 17q21, jehož mutace vede kromě absence všech končetin také k rozštěpu rtu a patra (Niemann et al., 2004).

3.4. Endotheliny

Endotheliny (ET-1, ET-2, ET-3) představují rodinu mimo jiné vazokonstriktorů. ET-1 je vazokonstriktor a byl prokázán jako nezbytný pro vývoj dolní čelisti (Francis-West et al., 2012). Je to malý peptid skládající se z 21 aminokyselin, každý je syntetizován jako větší prepropeptid a následně modifikován. Kontroluje expresi homeobox genů v žaberních obloucích a sám se exprimuje v jejich ektodermu. Tento ektoderm také exprimuje receptor ETA v závislosti na ET-1, což naznačuje, že se ET-1 autoreguluje (Nair et al., 2007).

3.5. Růstové faktory

Tyto látky ovlivňují růst, proliferaci a diferenciaci buněk v okolí místa jejich syntézy. Působí na genovou expresi, a to jako aktivátory i inhibitory. Jejich struktura je převážně bílkovinná. Existují čtyři velké rodiny: Rodina WNT a rodina Hedgehog (zminěné výše), fibroblastové růstové faktory a nadrodina transformujících růstových faktorů.

3.5.1. Fibroblast growth factor (FGF)

Fibroblastový růstový faktor je podskupinou RTK (receptory tyrozinkinázové signální dráhy), které jsou známé jako podílející se na riziku vzniku rozštěpu u lidí. RTK jsou regulační sítě při vývoji embrya a stojí za proliferací, diferenciací a migrací buněk. RTK signální dráhy se skládají z 20 podskupin. RTK signalizace může řídit expresi *Sprouty* genů (*Spry*), které produkují proteiny, které regulují RTK signalizaci v rámci negativní zpětnovazebné smyčky (Dorey & Amaya, 2010). *Spry* také udržují homeostázu exprese *FGF* a snížení jejich exprese vede ke snížení exprese *FGF* (Szabo-Rogers et al., 2008). Signální interakce IRF6 (Interferonový regulační faktor 6) a RTK, v regulaci peridermální diferenciaci a funkce, stejně jako epistatické interakce mezi variantami v genech v IRF6 a RTK signálních drahách, mají význam pro vznik rozštěpu u lidí (Ludwig et al., 2012).

Růstové faktory jsou vytvářeny buď v epitelu, jako je tomu v případě *Fgf8* a *Fgf2*, nebo jsou lokalizovány v mesenchymu, jak je tomu v případě *Fgf5*. Zdá se, že funkce *Fgf8* kontroluje regulaci exprese *Hox* genů a epitelově-mesenchymálních interakci. *Fgf8* byl identifikován v ekodermu žaberních oblouků a nosních jam. Jeho účinek byl testován na kuřecích embryích. Nejdůležitější je exprese na laterální straně frontonasálního výběžku, kde podporuje proliferaci buněk, a to vede k spojení mediálního nasálního výběžku s maxilárním (Szabo-Rogers et al., 2008). Signalizace *Fgf10* / *Fgfr2b* koordinuje epitelově-mesenchymální interakce během tvorby patra. *Fgf10* je exprimován v mesenchymu vyvíjejících se patrových plotének a jeho odpovídající receptor *Fgfr2b* je exprimován v sousedním epitelu. Předpokládá se, že po navázání *Fgf10* na *Fgfr2b* je vytvořen komplex, který aktivuje expresi *Shh* (Okuhara & Iseki, 2012). Experimentální snížení exprese *FGF* na laterálních okrajích frontonasálního výběžku kuřat vedlo ke snížení proliferace a zvýšení apoptózy, což vedlo k rozštěpu zobáku (Szabo-Rogers et al., 2008).

Fgf3 byl navíc popsán jako kandidátní faktor pro regulaci vývoje vnitřního ucha (Francis-West et al., 2012).

3.5.2. Transforming growth factor (TGF)

Rodina TGF-beta se skládá ze tří izoform, TGF-beta1, TGF-beta2 a TGF-beta3, které jsou signálními molekulami důležitými pro zprostředkování mnoha událostí v normálním růstu a vývoji. Tyto růstové faktory jsou vylučovány buňkami, v oblasti obličeje je to nejvíce okolo nosních jam (Szabo-Rogers et al., 2008), a jsou vázány sousedními receptory, které pak intracelulárně signalizují cytoplazmatické proteiny patřící do rodiny Smad (Inman, 2005). Tento komplex je pak transportován do jádra, kde jsou indukovány transkripční změny. *TGF-beta3*, který je exprimován v epitelových buňkách na jejich mediálním okraji, se podílí na mnoha buněčných procesech, včetně transformace epitelu na mezenchymální tkáň a na programované buněčné smrti epitelu na okraji patra (Deshpande & Goudy, 2019). Receptor *TGF-betaR3* je vyžadován pro normální palatogenezi a zároveň zprostředkovává vývoj cév a kostí. Ztráta *TGF-betaR3* vede k poruchám signalizační dráhy TGF-beta /BMP, jelikož *TGF-betaR3* působí proti proudu těchto drah a udržuje odpovídající hladiny pro normální palatogenezi (Hill et al, 2015). Právě mutace v receptoru je nejspíše odpovědná za řadu kraniofaciálních malformací u lidí.

Bone morphogenetic proteins (BMPs)

BMP je růstový faktor patřící do nadrodiny TGF, který ovlivňuje vývoj kostí, jejich modelování, růst a diferenciaci. Jeho vyšší exprese koreluje s místy nižší exprese *FGF* (Szabo-Rogers et al., 2008). Jednotlivé BMP se svou funkcí značně liší, jsou přítomny ve vyvíjejícím se mozku a ovlivňují diferenciaci frontonasálního výběžku a výběžků maxilárních. Aby se specifikoval frontonasální výběžek, sníží se v dané oblasti kuřecího embrya BMP a zvýší se hladina kyseliny retinové (Lee et al., 2001). *Bmp2* indikuje tvorbu kostí a chrupavek. Hraje také důležitou roli při diferenciaci osteoblastů. Jeho exprese v maxilárním výběžku je klíčová pro následnou proliferaci buněk v oblasti patrových plotének před jejich horizontalizací a srůstem. To bylo zkoumáno na želvě z rodu *Emydura*, u které se patrové ploténky nikdy nespojí (Abramyan et al., 2014). *Bmp4* reguluje programovanou buněčnou smrt buněk neurální lišty, a tím je regulován vývoj kostí a také zubů (Francis-West et al., 2012), detekujeme ho také na mediální straně mesenchymu patrových plotének (Okuhara & Iseki, 2012). Je to další důležitý faktor pro diferenciaci obličejových výběžků. U kuřat byla největší exprese zaznamenána v maxilárním výběžku (Buchtová et al., 2010). Předpokládá se vzájemná regulace *Bmp4* a *Fgf8*, mohou se vzájemně omezovat v expresi (Szabo-Rogers et al., 2008). *Bmp7* je

exprimován v mesenchymu frontonasálního výběžku, ale ne v maxilárním mesenchymu, je to další z možných způsobů diferenciaci výběžků (Lee et al., 2001).

3.5.3. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Růstový faktor odvozený od krevních destiček (*PDGF*) je klíčový pro buněčnou proliferaci, přežití a migraci buněk (Hoch & Soriano, 2003). *Pdgfc* a *Pdgfa*, které kódují ligandy PDGF, jsou exprimovány v epitelu patrových plotének (Deshpande & Goudy, 2019). *Pdgfc* *-/-* myši umírají v perinatálním období v důsledku potravních a respiračních obtíží spojených s úplným rozštěpem sekundárního patra (Ding et al., 2004). Problémy se zdvihem patra a fúzí patrových plotének měla i myši embrya s mutací *Pdgfa* (Deshpande & Goudy, 2019).

3.6. Transkripční faktory

Transkripční faktory jsou velmi různorodou skupinou proteinů podílejících se na aktivaci nebo potlačení transkripce genu. Několik studií používajících modely na zvířatech prokázalo úlohu genů transkripčních faktorů při kraniofaciálním vývoji, během něhož jsou transkripční faktory zodpovědné za diktování osudu jednotlivých buněk (Gurramkonda et al., 2018). Tyto transkripční faktory byly také zapojeny do řady dalších biologických procesů, jako jsou epitelově mezenchymální interakce (*Msx1*), buněčná migrace (*Paired box 6*) a buněčná diferenciaci (*Dlx5*) (Francis-West et al., 2012).

3.6.1. Interferon-regulatory factor (IRF)

IRF6 je transkripční regulátor při morfogenezi úst, který kóduje helix-turn-helix DNA vazebnou doménu a méně konzervativní protein vazající doménu. Nachází se na lidském chromozomu 1q32.2. Jeho gen obsahuje 10 exonů a kóduje protein obsahující celkem 517 aminokyselin, obsahuje N-terminální DNA-vazebnou doménu s křídlovými helixy a C-terminální doménu. U lidí je známo devět IRF (Gurramkonda et al., 2018). IRF6 se exprimuje v brzkém ortofaciálním ektodermu a je exprimován podél středního okraje patra, kde se IRF6 může zapojit do signální dráhy TGF-beta (Kondo et al., 2002). U myších embryí je následně omezen na vzdálený periderm v ED13.5 patrových ploténkách (Paul et al., 2017). Exprese IRF6 byla v myších také detekována ve folikulech ochlupení, zubních pupenech, *ductus*

thyreoglossus, vnějších genitáliích a na kůži v celém těle (Kondo et al., 2002). Při ztrátě IRF6 dochází k tvorbě ztlustělého neorganizovaného epitelu, který je tvořen kulovitými buňkami nemajícími diferencovaný vzhled (Parada-Sanchez et al., 2017). IRF6 má nejspíše 2 role, v cytoplazmě má přímý dopad na epitelovou adhezi a v jádře jako transkripční regulátor ovlivňuje epitelovou diferenciaci a proliferaci (Parada-Sanchez et al., 2017). Nádorový protein p63 přímo aktivuje expresi *Irf6* během časného vývoje epitelu (Lan et al., 2015).

3.6.2. Proteiny NME

NME rodina genů kóduje vysoce konzervativní multifunkční proteiny, které se účastní metabolismu nukleových kyselin, energetické homeostázy a buněčné signalizace (Hsu, 2011). IRF6 má 2 partnerské proteiny. NME1 a NME2 se nalézají v genech situovaných na chromozomu v pozici „head-to-tail“. Nejspíše vznikly genovou duplikací, jsou tedy paralogy. Výzkumy používající geny *Drosophila* naznačily roli NME v regulaci pohybu a morfogeneze epitelových buněk, která byla také demonstrována v savčí buněčné kultuře (Hsu, 2011).

NME proteiny se spojují s IRF6 v cytoplazmě primárních epitelových buněk patra a jejich interakce s IRF6 je signifikantně zesílena fosforylací klíčových serinových residuí na IRF6 C-konci. Fosforylace IRF6 C-koncových serinů pravděpodobně díky RIPK4 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 4) vyvolá interakci s NME1/2 hexamerem v cytosolu. Kromě ostatních funkcí, tyto 2 NME proteiny jsou klíčovými regulátory RhoA (Ras homolog gene family A) a Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) aktivace, specificky kontrolují endocytózu epiteliálních spojů proteinů a remodelaci původního cytoskeletu (Parada-Sanchez et al., 2017). Zdá se, že NME geny v epitelových buňkách fungují pouze v definovaném rozsahu úrovní exprese, jelikož nižší regulace nebo over-exprese může narušit integritu epitelu, což vede k různým epitelovým abnormalitám (Hsu, 2011).

3.6.3. Rho GTPase-activating protein 29 (ARHGAP29)

ARHGAP29 (kódující Rho GTPázu aktivující protein 29) patří k rodině malých Rho GTPáz a reguluje RhoA. Je exprimován v mediálních a laterálních nasálních výbězcích, méně intenzivní exprese je pozorována v mandibulárních a maxilárních výbězcích u myších embryí ED10,5 a v patrových ploténkách u ED13,5 (Leslie et al., 2012). Exprese byla popsána i v lingválních epitelových buňkách a mezenchymových tkáních a dále v tkáních srdce,

kosterního svalstva a placenty a je tedy nezbytný pro přežití embrya (Paul et al., 2017). *ARHGAP29* se nachází na chromozomu 1p22.1 v blízkosti genu *ABCA4* (ATP vazebná kazeta podskupina A člen 4) (Leslie et al., 2012), který byl ale z potenciálních etiologických genů zapříčiňujících rozštěpy vyloučen (Beaty et al., 2010). *ARHGAP29* funkce v RhoA dependentní buněčné migraci je zapojit IRF6 a propojit ho v síti genové implikace v kraniofaciálním vývoji. Deficit IRF6 v myších vede k poklesu exprese *ARHGAP29* proteinu (Paul et al., 2017), což ukazuje, že *ARHGAP29* může působit downstream od IRF6 a být jeho mediátorem (Leslie et al., 2012). Nejčastěji se vyskytující mutace spadají pod missense, nonsense a posun čtecího rámce (Leslie et al., 2012).

3.6.4. T-BOX (TBX)

V této rodině existuje více jak 100 genů, jejichž proteiny obsahují sekvenci T-box uplatňující se jako transkripční faktor.

T-box transkripční faktor 1 (*TBX1*) je nezbytný pro normální prodlužování a horizontalizaci patrových plotének (Goudy et al., 2010), exprimuje se také v entodermu hltnu a mesodermu žaberních oblouků, kde jeho expresi reguluje *Shh*, a v zubních pupenech. *TBX1* gen leží v lokusu 22q11.2.

TBX22 je další z transkripčních faktorů T-box genové rodiny, která sdílí vysoce konzervativní DNA vázající doménu a kóduje 180 aminokyselin. Je exprimovaný hlavně v patrových ploténkách a na bázi jazyka během kraniofaciálního vývoje (Bush et al., 2002). U myších modelů začíná jeho exprese již v somitech v ED9 (Bush et al., 2002). *TBX22* gen hraje zásadní roli v palatogenesi (vývoji patra) a glossogenesi (vývoji jazyka) (Haenig et al., 2002). Výzkum na kuřatech ho také označil za jeden z hlavních genů podílejících se na diferenciaci obličejových výběžků. Jeho hladina exprese je ve frontonasálním výběžku o mnoho větší než v mandibulárním (stádium 18) a v maxilárním nastupuje až o něco později (stádium 20) (Buchtová et al., 2010). Exprimuje se v mesenchymu (Buchtová et al., 2010). Mutací místa sestřihu *TBX22* nebo i pouhá změna sekundární struktury jeho proteinu může vést k CPX (rozštěp patra vázaný na chromozom X) a kompletním unilaterálním CLP (Dai et al., 2018).

4. Vady obličeje

Jednou z hlavních příčin vývojových vad na obličeji je porucha buněk neurální lišty, které jsou hlavním stavebním materiálem při morfogenezi obličeje a přední části krku. Tyto buňky se ovšem podílejí také na utváření srdce, a proto mají pacienti s kraniofaciální malformací často též vrozené srdeční vady. Tyto buňky jsou také extrémně náchylné k nejrůznějším teratogenním vlivům.

Etiologie vývojových vad obličeje je velmi komplexním dějem. Například více než 300 genů je zapojeno do fúze patra. I jednobodové genové mutace mohou vést k rozštěpům, jako příklady můžeme uvést Sticklerův syndrom, který je asociován s patogenními variantami v jednom ze šesti genů (*COL2A1*, *COL11A1*, *COL11A2*, *COL9A1*, *COL9A2* nebo *COL9A3*, jedná se o alpha řetězce kolagenu) (Robin et. al., 2017) nebo syndromu Treacher Collins, který je spojen s mutací například v genu *TCOF1* (Dixon et. al., 2006).

V této kapitole budou popsány vývojové vady v obličejové oblasti s důrazem na vady rozštěpové, které přímo souvisí s procesem fúzování faciálních či patrových výběžků v raných stádiích prenatalního vývoje. Zároveň bude pozornost věnována molekulární podstatě vzniku těchto vad a sumarizaci známých faktů o případné patogenezí z molekulárního hlediska.

4.1. Rozštěp rtu a/nebo patra (CLP)

K rozštěpům rtu a patra dochází u 1 z 1 000 živě narozených dětí po celém světě, a to ho činí jednou z nejčastějších vad. CLP prokazatelně přispívá k morbiditě a také ovlivňuje společenskou interakci a mentální zdraví v dětství, často podmiňuje poruchy řeči (Dixon et al., 2011). Etiologie rozštěpů je komplexní a je způsobena genetickými i environmentálními faktory, mohou se vyskytovat jako součást jednoho z mnoha chromozomálních syndromů, mohou být způsobeny monogenně nebo teratogenními účinky (Wyszynski & Beaty, 1996). Četnost CLP se liší podle pohlaví. Poměr výskytu je 2:1 u mužů k ženám u rozštěpů zahrnujících pouze ret a 1:2 u mužů k ženám u rozštěpů patra (Dixon et al., 2011).

4.1.1. Syndromický a nesyndromický CLP

Přibližně 30 %, čili 1/3, rozštěpů je syndromických (asociovaných se syndromy) s výraznou variabilitou v expresivitě a neúplné penetraci. Zbývající 2/3, cca 70 %, jsou nesyndromické

rozštěpy, což znamená, že se nevyskytují v kombinaci s jinými vývojovými, strukturálními nebo kognitivními anomáliemi (Demeer et al., 2018; Leslie & Marazita, 2013).

Nesyndromický rozštěp rtu a/nebo patra (NSCLP) je vrozená vada vyskytující se ve frekvenci přibližně 1 z 700 porodů (Dixon et al., 2011). Nesyndromické rozštěpy mají komplexní etiologii s četnými predisponujícími genetickými variantami působícími ve shodě s faktory prostředí (Demeer et al., 2018).

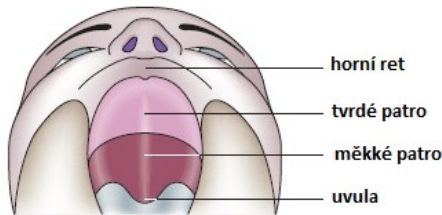
4.1.2. Etiologie rozštěpů

Při tvorbě rozštěpu dochází k selhání růstu a/nebo fúze obličejových výběžků během širšího období časného embryologického vývoje (4. až 12. týden těhotenství). Rozštěp rtu s rozštěpem patra může vyplývat z poruch v proliferaci, migraci a přežití buněk neurální lišty, nebo fúze mezi mediálními nasálními a maxilárními výběžky, zatímco rozštěp patra bez rozštěpu rtu může být důsledkem narušení růstu patrových plotének, jejich horizontalizace nebo fúze (Lan et al., 2015). CLP jsou klasifikovány podle laterality a úplnosti (obr. 6 a 7) (Dixon et al., 2011). Rozštěpy rtů mohou být jednostranné nebo oboustranné; kompletní, ve kterém rozštěp zahrnuje celou tloušťku horního rtu; nebo neúplné. Nicméně, jsou také dále klasifikovány podle umístění rozštěpu vzhledem k *foramen incisiva*. Rozštěpy mohou vznikat v oblasti patra primárního a/nebo sekundárního. Může také dojít k rozštěpení měkkého patra (Deshpande & Goudy, 2019). Rozštěp dělí patro na větší a menší segment u unilaterálního CLP, anebo na dva laterální segmenty a jeden anteriorní segment u bilaterálního CLP (Lisson & Kjær, 1997).

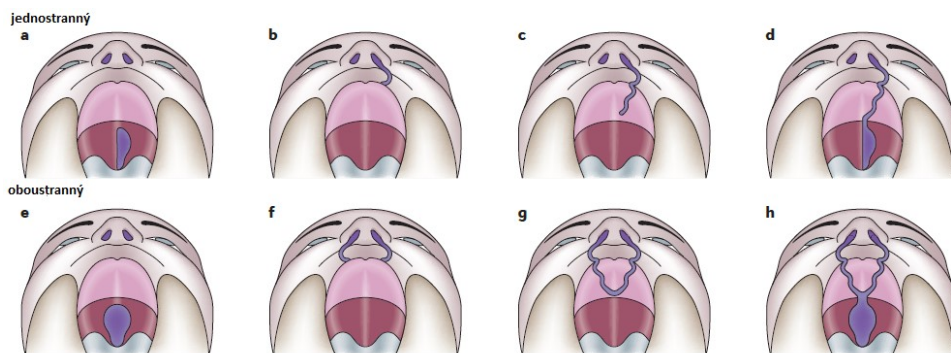
Mezi přední rozštěpové vady se řadí laterální rozštěp rtu (obr. 7b), rozštěp horní čelisti (alveolární) a rozštěp mezi primárním a sekundárním patrem. Jedná se o částečné nebo úplné nesplynutí maxilárního výběžku s mediálními nosními, a to na jedné nebo z obou stran. Dorzálně od *foramen incisiva* může nastat rozštěp sekundárního patra (obr. 7e). Nedošlo zde ke spojení patrových plotének, a to nejspíše ze dvou důvodů, buď ploténky zůstaly příliš malé a nedošlo u nich ke splynutí ve střední čáře, nebo mezi nimi zůstal vtačený jazyk, který přímo znemožňuje horizontalizaci a následnou fúzi. Jazyk nemusí sestoupit například při mikrognatii (malá čelist) (Logjes et al., 2018). Výše popsané rozštěpy se mohou i vzájemně kombinovat.

Specifickou formou obličejových vad jsou tzv. šikmé rozštěpy. Šikmé rozštěpy obličeje jsou determinovány chybnou fúzí maxilárního výběžku s výběžkem laterálním nosním. Je zde rozevřený *ductus nasocrimalis* (Sadler, 2011).

Rozštěp rtu ve střední čáře se vyskytuje jen zřídka, kdy dojde k neúplnému srůstu mediálních nosních valů. Nos je rozdělen hlubokým žlábkem na dvě poloviny. Pacienti mohou být též mentálně zaostalí, jelikož mozek může postrádat některé středové části. Tato malformace se také často objevuje spolu s defekty okulomotorických drah, jelikož vznikají souběžně během druhého měsíce těhotenství (Pilon, 2009).



Obrázek 6: Pohled na patro bez rozštěpu (upraveno podle (Dixon et al., 2011))



Obrázek 7: Formy rozštěpu: (a) izolovaný jednostranný rozštěp patra, (b) jednostranný rozštěp rtu a nosní dírky, (c) jednostranný rozštěp rtu a primárního patra, (d) jednostranný rozštěp patra s rozštěpem rtu, (e) izolovaný rozštěp patra, (f) oboustranný rozštěp rtu a nosních dírek, (g) oboustranný rozštěp rtu a horní čelisti, (h) oboustranný rozštěp rtu a patra (upraveno podle (Dixon et al., 2011))

Poslední pokroky ve výzkumu CLP identifikovaly množství lokusů spojených se zvýšeným rizikem NSCLP. Jedna z prvních genomových asociačních studií pro NSCLP objevila tři signifikantní místa: IRF6, 8q24, MAFB (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B) (Beaty et al., 2010) a i studie na thajské populaci identifikovala čtyři potenciálně patogenní mutace: p63, PVRL1 (Poliovirus receptor-related 1), *Msx1* a IRF6 v 53 nesyndromických rozštěpech patra (Dai et al., 2018). Studie dále identifikovaly mutace na *ARHGAP29* spojené se zvýšeným rizikem NSCLP (Paul et al., 2017) a mutace TBX22

související s NSCLP v čínských rodinách, kde hraje důležitou roli v X-linked rozštěpech patra (Dai et al., 2018). Také mutace u interakce mezi IRF6 s paralogy NME1 a NME2, které jsou regulovány fosforylací serinu na C-konci IRF6, mohou být příčinou nesyndromického CLP (Parada-Sanchez et al., 2017).

Ztráta jednoho z hlavních homeotických genů *Shh* je spojena s defekty ve střední linii, včetně holoprosencefálie a rozštěpu patra. Naopak zvýšená exprese vede k zvětšení frontonasálního výběžku a rozštěpu patra (Hu & Helms, 1999). Kontrolu exprese homeotických genů provádí endotheliny. Experimentální studie inaktivace genů u myši ukázaly, že tato skupina peptidů kontroluje klíčové aspekty vývoje neurální lišty. ET-1 a receptor ETA jsou vyžadovány pro normální vývoj kraniofaciální oblasti, aortálních oblouků a srdce, zatímco ET3 a receptor ETB jsou nezbytné pro vývoj kmenových linií neurální lišty (Francis-West et al., 2012). Cílená mutace v myším genu *Ece-1* - / - (enzym konvertující endotheliny) se projevuje kraniofaciálními abnormalitami. Myši embrya s touto mutací měla deformovanou mandibulu a Meckelova chrupavka zcela chyběla. Zuby byly však neporušené, i když dolní řezáky byly namísto v mandibule uloženy volně v mesenchymu (Yanagisawa et al., 1998). Cílená knockdown mutace receptoru ETA vede k fúzi mezi chrupavkami horní a dolní čelisti rybiček Dánio (Nair et al., 2007).

Zablokování funkce *Wnt5a* u myši inaktivací genů vede ke zkrácení čelisti a také zkrácení končetin a dalších axiálních struktur (Francis-West et al., 2012). Homozygotní nonsense mutace ve *WNT3* vede ke ztrátě funkce a k ovlivnění vývoje končetin a kraniofaciálních struktur (Niemann et al., 2004). Předpokládá se, že u lidí vyvolává nesyndromický CLP (Juriloff et al., 2006).

Vývoj patra je z největší části pod kontrolou růstových a transkripčních faktorů. Ztráta *TGF-betaR3* má za následek zastavení horizontalizace patrových plotének a také vede k atypické expresi signálních drah TGF-beta a BMP v patrových ploténkách (Hill et al., 2015). Při narušení nebo ztrátě BMP se zkracují maxilární primordia a dochází ke ztrátě exprese genu *Msx1*, ztrácejí se také kosterní struktury (Francis-West et al., 2012). IRF6 má různé role ve vývoji patra zprostředkované přes interakce s jinými transkripčními faktory. Reguluje například *GRHL3* (Grainyhead like transcription factor 3), jehož ztráta může vést k abnormálnímu vývoji peridermu a rozštěpu patra. Missense mutace v *GRHL3* také přispívá k riziku izolovaného rozštěpu patra (Leslie et al., 2016).

Okolo poloviny případů CLP je asociovaných s missense mutacemi na IRF6, sídlícími na C-konci IRF sdružené domény (IAD) nebo na C-konci, obsahujícím bohaté serinové autoinhibiční regiony (SRR) (Leslie & Marazita, 2013). Interakce mezi NME1/2 a IRF6 je závislá na fosforylaci IRF6 SRR. Zjistilo se, že většina CLP asociovaných s mutacemi IAD narušuje spojování s NME. Kterákoliv z těchto specifických IAD mutací naruší celkovou konformaci IRF6 nebo interakci mezi IAD a SRR je kritická i po následující fosforylaci (Parada-Sanchez et al., 2017).

Transkripční faktory obsahující sekvenci T-box jsou další významnou skupinou, jejíž mutace může způsobit kardiovaskulární defekty, hypoplazii thymu a příštítných tělísek, abnormální rysy obličej a rozštěp patra (Garg et al., 2001). Všechna embrya myši s mutací *TBX1* vykazovala rozštěp patra, se zkrácenými patrovými ploténkami, které nebyly schopny se prodloužit a horizontalizovat. Padesát procent myši bez *TBX1* bylo postiženo orálními fúzemi, a to především v oblasti zadního patra. To naznačuje, že *TBX1* může být také zodpovědný za udržení integrity epitelu v zadním patře (Goudy et al., 2010). 4 % nezařazených rozštěpů patra má příčinu v mutaci *TBX22* (Marçano et al., 2004). Patogenní *TBX22* může přispívat k CLP a bylo zde zaznamenáno mnoho mutací. Velká část mutací na *TBX22* byla popsána jako obsahující nonsense, posunující čtecí rámec, mutace místa sestřihu nebo missense mutace (Pauws et al., 2013)

Jedním z dalších kandidátů na udržování integrity je *ARHGAP29*. Jednonukleotidová změna v *ARHGAP29* vede k nonsense mutaci a pravděpodobně vede ke ztrátě funkce (LoF). Heterozygotita pro LoF na *ARHGAP29* zvyšuje častost výskytu a délku orální adheze v kritickém bodě během orofaciálního vývoje. Myši embrya s nonsense mutací na *ARHGAP29* vykazovala nesprávný kontakt epitelů mezi vyvíjejícími se orálními strukturami. Tato embrya měla také signifikantně větší procento maxilárního epitelu v kontaktu s epitelem mandibulárním. Heterozygoti mají také problém s nedostatečným vývojem patrových plotének a k jejich horizontalizaci dochází později (u myši až v E18.5) (Paul et al., 2017). Sekvenování *ARHGAP29* u jedinců s NSCLP odhalilo vzácné kódující sekvence, na základě čehož byl *ARHGAP29* vyhodnocen jako etiologický gen v daném lokusu (Leslie et al., 2012). Následující studie identifikovaly funkční nekódující varianty v oblasti, které ovlivňovaly vazbu CLP asociovaných transkripčních faktorů. Další sekvenování *ARHGAP29* odhalilo vzácné LoF varianty napovídající, že 1 kopie *ARHGAP29* LoF může způsobit mírné riziko NSCLP (Paul et al., 2017). Varianta mutace s posunem čtecího rámce byla identifikována u jedince

s bilaterálním rozštěpem rtu a patra, byla ovšem také identifikována u jeho nepostiženého sourozence. Stejně tak varianta s nonsense mutací (Leslie et al., 2012). Nemůžeme je tedy považovat za jasnou příčinu rozštěpu.

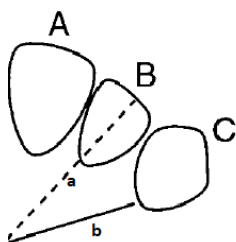
4.1.3. Rozštěp patra vázaný na X

X-linked rozštěp patra (CPX) je semidominantní vada charakterizovaná silnou vazbou na chromozom X, podléhající mendelovské dědičnosti a projevuje se izolovaným rozštěpem sekundárního patra, který je někdy doprovázen ankyloglossií (tongue-tie, přirostlý jazyk), kterou můžeme považovat za diagnostický marker onemocnění (Dai et al., 2018). Takto zapříčiněný typ rozštěpu postihuje převážně muže. U žen přenašeček se často projeví pouze ankyloglosie, rozštěp postihuje asi 16 % z nich (Marçano et al., 2004).

CPX fenotyp s největší pravděpodobností vyplývá ze ztráty funkce proteinu TBX22 (Andreou et al., 2007). V *TBX22* byly nalezeny dvě mutace kanonického místa sestříhu. Podrobná typizace těchto dvou mutací na probandech a u jejich rodin odhalila orofaciální rysy, které dříve nebyly spojeny s fenotypovým spektrem CPX, jako je například choanální atrézie, sekvence Pierre-Robin a nadměrné přirůstání kosti na zadním okraji tvrdého patra na každé straně patrové středové linie (Demeer et al., 2018).

4.1.4. Anomálie zubů při CLP

Pokud jde o vztah premaxily k rozštěpu rtu a patra, jak již bylo zmíněno výše, poloha rozštěpů není totožná se *sutura incisiva*, ale s embryonální fúzí mediálních nasálních a maxilárních výběžků (Barteczko & Jacob, 2004). Dokladem této skutečnosti je vznik zdvojeného horního laterálního řezáku u pacientů s alveolárním rozštěpem, kdy mohou být laterální řezáky lokalizovány po obou stranách rozštěpu. Linie rozštěpu totiž odděluje vývojové základy tohoto zubu (obr. 8). Zubní pupeny jak mléčných, tak trvalých maxilárních laterálních řezáků jsou umístěny v oblasti, která je náchylná během vývoje na vznik patologií právě z důvodu lokace v linii fúze faciálních výběžků. U lidských embryí se primordia mléčných laterálních řezáků objevují mezi ED42-44 a jsou fyziologicky tvořeny příspěvkem mediálních nasálních i maxilárních výběžků (Hovorakova et al., 2006).

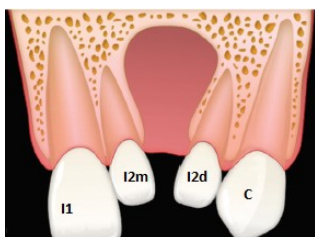


Obrázek 8: Horní čelist s dentici: A: mediální řezák, B: laterální řezák, C: špičák, a: embryonální hranice mezi mediálním nasálním výběžkem a maxilárním, b: sutura incisiva (upraveno podle (Wei et al., 2000))

U jedinců bez rozštěpu obsahuje premaxila zubní pupeny čtyř horních řezáků a maxila nese zárodky špičáků, třenových zubů a stoliček (Garib et al., 2015). Premaxila je ale, jak bylo popsáno výše, tvořena jak mediálními nasálními, tak maxilárními výběžky, zatímco alveolární rozštěp vzniká právě nesplynutím těchto výběžků, a tedy i nesplynutím vývojových částí zárodku laterálního řezáku v místě rozštěpu. Každá část se potom může vyvíjet v samostatný základ podle toho, zda je materiál příslušného výběžku dostatečný. Proto může být alveolární rozštěp či dokonce i rozštěp rtu s intaktní čelistí doprovázen zdvojením laterálního řezáku (Tsai et al., 1998). Rozštěp se obecně může objevit buď mezi centrálním a laterálním řezákem, přímo v oblasti laterálního – přičemž výsledkem bude vznik dvou laterálních řezáků po stranách rozštěpu nebo úplné chybění laterálního řezáku v místě rozštěpu, nebo mezi laterálním řezákem a špičákem (Garib et al., 2015; Hovorakova et al., 2006).

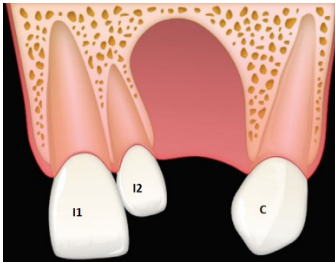
Existují tedy tyto čtyři základní typy lokalizace laterálního řezáku při rozštěpu:

1. Přítomnost dvou laterálních řezáků, jednoho mediálně a druhého distálně od alveolárního rozštěpu (obr. 9). Zubní pupen laterálního mléčného řezáku se vyvíjí v oblasti splývání mediálního nasálního výběžku s maxilárním, pokud tyto výběžky nesplynou, nespojí se ani dva zárodky řezáku, což vede k vytvoření dvou samostatně se vyvíjejících řezáků. Tento typ patologie laterálních řezáků se často objevuje i při rozštěpu pouze měkkých tkání, kdy alveolární rozštěp není přítomen.



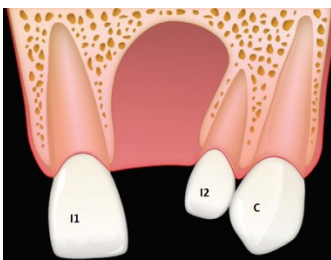
Obrázek 9: Přítomnost dvou laterálních řezáků u alveolárního rozštěpu: I1-mediální řezák, I2m-laterální řezák mediálně od rozštěpu, I2d-laterální řezák distálně od rozštěpu, C-špičák (upraveno podle (Garib et al., 2015))

2. Přítomnost jediného laterálního řezáku umístěného mediálně k alveolárnímu rozštěpu (obr. 10).



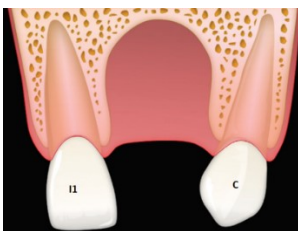
Obrázek 10: Laterální řezák mediálně od rozštěpu: I1-mediální řezák, I2-laterální řezák mediálně od rozštěpu, C-špičák (upraveno podle (Garib et al., 2015))

3. Přítomnost jediného laterálního řezáku umístěného distálně od alveolárního rozštěpu (obr. 11).



Obrázek 11: Laterální řezák distálně od rozštěpu: I1-mediální řezák, I2-laterální řezák distálně od rozštěpu, C-špičák (upraveno podle (Garib et al., 2015))

4. Ageneze laterálního řezáku (obr. 12). Ageneze je nejrozšířenější zubní anomálií sdílená pacienty s rozštěpem. Hypodoncie (snížený počet zubů) je způsobena absencí velkého množství mesenchymu (Da Silva et al., 2008).



Obrázek 12: Chybějící laterální řezák: I1-mediální řezák, C-špičák (upraveno podle (Garib et al., 2015))

Pokud se objeví jen jeden často malý řezák umístěný mediálně nebo distálně k rozštěpu může to odrážet vývoj pouze jedné složky základu řezáku (na méně poškozeném výběžku obličeje), zatímco druhá složka (na opačném výběžku) se ne vytvořila z důvodu insuficience tkáně (Hovorakova et al., 2006).

U pacientů s izolovaným rozštěpem rtu by tak přítomnost dvou laterálních řezáků v intaktním alveolu na straně rozštěpu představovala neúplný projev alveolárního rozštěpu (Garib et al., 2015). Z tohoto hlediska pacienti s nadpočetnými laterálními řezáky bez rozštěpových vad mohou být zatíženi zvýšeným rizikem nést nějakou genetickou predispozici pro orofaciální rozštěpy (Hovorakova et al., 2006).

4.2. Syndromy spojené s orofaciálními vadami se zaměřením na rozštěpy obličeje

4.2.1. Van der Woude syndrom (VWS)

Van der Woude syndrom, známý také jako syndrom lip pit, je vzácná autosomálně dominantně podmíněná malformace s 80 % až 100 % penetrací, ale s variabilní klinickou expresí, s incidencí asi 1 ze 75 000 až 1 ze 100 000 a bez genderové preference (Gurpal-Chhabda & Singh-Chhabda, 2018). Je charakterizovaná rozštěpem, který mohou doprovázet kongenitální vývojové malformace typu „lip pits“ na spodním rtu (Rizos & Spyropoulos, 2004) a příležitostně hypodoncie (Gurpal-Chhabda & Singh-Chhabda, 2018). Jedná se o nejčastější variantu syndromického CLP (Rizos & Spyropoulos, 2004) vyskytující se u asi 2% populace s rozštěpem obličeje (Gurpal-Chhabda & Singh-Chhabda, 2018).

Kritická oblast VWS byla identifikována na Iq32 až 41 s vysokou, ale neúplnou penetrací a variabilní expresivitou. Bylo zjištěno, že genetický defekt rtů je způsoben mikrodeleci na chromozomových pásmech Iq32-q4. Gen zodpovědný za VWS byl mapován na dlouhé raménko chromozomu 1 na q32 až q41. Druhý lokus VWS byl mapován na Ip34 (Gurpal-Chhabda & Singh-Chhabda, 2018).

„Lip pits“ můžeme rozdělit na tři typy podle jejich umístění: v koutcích a na střední čáře horního a dolního rtu. Nejčastěji se nacházejí na rtu dolním (Rizos & Spyropoulos, 2004), obvykle jsou bilaterální, ale známe i jednostranné případy, a mohou být perforované a sekretovat sliny. Hloubka těchto jamek je mezi 5 mm a 25 mm (Gurpal-Chhabda & Singh-Chhabda, 2018).

U pacientů s IRF6-negativním VWS a nesyndromickým CLP byla prokázána důležitost role IRF6-NME interakcí, která je podpořena identifikací dvou ne tak častých missense mutací (jedna na NME1 a jedna na NME2) (Parada-Sanchez et al., 2017). Úplná ztráta funkce může vést k přechodu z epitelových buněk na mesenchymální stádium (Hsu, 2011).

4.2.2. Popliteální pterygický syndrom

Jedná se o vzácnou autosomálně dominantní kongenitální malformaci postihující obličej, končetiny a genitálie. Nejběžnějším projevem je rozštěp patra s nebo bez doprovodného rozštěpu rtu, a to až v 97 % případů. Mohou se objevit i intraorální tkáňové spoje mezi maxilou a mandibulou, které znemožňují správné otvírání úst a musejí být odstraněny kvůli kojení. Dalšími projevy jsou „lip pits“ a adnatní filiformní ankyloblefaron, většinou částečný srůst očních víček (Froster-Iskenius, 1990).

Dva alelické stavy způsobené mutací IRF6 jsou příčinami Van der Woudeho syndromu a popliteálního pterygického syndromu (Kondo et al., 2002). Při CLP vzniká missense mutace na IRF6, která naruší schopnost připojení IRF6 k NME proteinům. Objevují se také 2 unikátní missense mutace na NME proteinech, které také narušují schopnost interakce IRF6 s příslušnými proteiny. Mutace na IRF6 nebo na NME-IRF6 interakčním rozhraní vede k destabilizaci adheze, mění tvar epitelu a zvyšuje proliferaci (Parada-Sanchez et al., 2017). U myši znamená ztráta IRF6 nebo porucha v FGF signální dráze abnormální adhezi orálního epitelu a rozštěp patra (Kousa et al., 2017). Mutace v GRHL3 vedou spíše k VWS (Kousa et al., 2017). Také mutace na NME1 může být unikátní příčinou VWS (Parada-Sanchez et al., 2017). Mutace v IRF6 může také způsobit popliteal pterygium syndrom, který vykazuje některé rysy společné s VWS (Gurpal-Chhabda & Singh-Chhabda, 2018).

4.2.3. Pierre Robinův syndrom

Nebo též Pierre Robinova sekvence se vyznačuje vývojovou poruchou prvního žaberního oblouku a hypoplazií dolní čelisti. Obvykle je doprovázen třemi fenotypy: mikrognatii (malá čelist), rozštěpem patra a zapadajícím jazykem. V důsledku toho mohou nastat respirační potíže, problémy s krmením a mluvou (Giudice et al., 2018). Sekvencí je myšlen postupný vývoj událostí od malé mandibuly, která nutí jazyk zapadnout a vyklenout se, což znemožní horizontalizaci patrových plotének a dojde k rozštěpu patra, i když ploténky nejsou

hypoplastické. Vyskytuje se v řadě syndromů, jako například Stickerův syndrom a syndrom Treacher Collins (Logjes et al., 2018).

Dlx5, jehož missense mutace byla u lidí identifikována jako jedna z klíčových při vzniku Pierre Robinovy sekvence, byl studován na psím modelu (Nova Scotia duck tolling retriever). Nachází se na chromozomu 14 v těsné blízkosti genů rodiny *Hox*. Psi s mutací na *Dlx5* a *Dlx6* mají také zkrácenou dolní čelist a rozštěp patra, který se podobá lidem s Pierre Robinovou sekvencí (Wolf et al., 2014).

4.2.4. Sticklerův syndrom

Jedná se o autozomálně dominantně dědičný syndrom s anomáliemi kloubů a očí, jako je výrazná krátkozrakost a degenerativní změny sítnice. Dále můžeme pozorovat sluchové a orofaciální defekty (Rishi et al., 2015). Defekty obličeje se mohou objevit ve formě Pierre Robinovy sekvence (mikrognatie, zapadající jazyk a rozštěp patra) viz výše. Orofaciální malformace vedou často k respiračním potížím okamžitě po narození. U postižených jedinců může nakonec dojít až k úplné slepotě a hluchotě (Antunes et al., 2012).

4.2.5. Treacher Collins syndrom

Autosomálně dominantní syndrom s prevalencí 1 dítě z 40000 až 70000 živě narozených. Postižený je při něm první a druhý žaberní oblouk a následně z nich diferencované struktury (Madi et al., 2018). Projevuje se hypoplazií dolní čelisti a špatným postavením zubů, deformované je vnější i vnitřní ucho a patro je buď vyklenuté nebo s rozštěpem (Farrar, 1967).

4.2.6. CHARGE syndrom

Syndrom CHARGE je vzácné autozomálně dominantní onemocnění (prevalence se pohybuje mezi 1/8500 a 1/12 000), které je způsobeno mutacemi v genu *CHD7* (Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7). Onemocnění charakterizuje 6 hlavních symptomů: koloboma (rozštěp duhovky), srdeční defekty, atrézie choan (vada zadního nosního východu), retardace růstu, genitální hypoplazie a ušní malformace (Kılıçarslan et al., 2018). U pacientů se syndromem CHARGE se objevuje i rozštěp rtu a/nebo patra, je však zatím jako marker opomíjen. Hughes se svým týmem (2014) ve svém výzkumu identifikovali 33 % pacientů jak s rozštěpovou vadou,

tak s pozitivní mutací *CHD7* (Hughes et al., 2014). Navrhli tedy nový akronym pro syndrom CHARGE s přidáním rozštěpových vad a zanedbávaným průzkumem rodinné historie u identifikace syndromu u postižených jedinců (obr. 13).

Nově navržený akronym	
C	Koloboma z anglického Coloboma
C	Rozštěpové vady z anglického Clefting
H	Srdeční defekty z anglického Heart defects
H	Rodinná historie z anglického History in the family
A	Atrézie choan z anglického Atresia of the choanae
R	Retardace růstu z anglického Retarded growth and/or development
G	Abnormálie genitálií z anglického Genital anomalies
E	Abnormálie uší z anglického Ear anomalies

Obrázek 13: Nově navržený akronym syndromu CHARGE s přidáním rozštěpových vad a průzkum rodinné historie postižených jedinců (upraveno podle (Hughes et al., 2014))

TBX22 mutace nebyly nalezeny jen u rodin s dobře definovaným CPX, ale i u více sporadických nesyndromických rozštěpů patra, u CLP, hypodoncie a u anomálií končetin (Marçano et al., 2004). Dále souvisí s mikrodoncií a navozuje znaky syndromu CHARGE (Demeer et al., 2018). Nejčastější fenotyp se pohybuje od vysoce klenutého patra po kompletní rozštěp sekundárního patra (Dai et al., 2018). Běžný fenotyp u mutací *TBX22* je ankyloglossia (Marçano et al., 2004).

5. Závěr

Tato práce shrnuje recentní poznatky v oblasti embryonálního vývoje lidského obličeje, který mohou postihnout mnohé vývojové vady. Hlavní důraz byl kladen na rozštěp rtu a čelisti s nebo bez rozštěpu patra, který je jednou z nejčastějších malformací, a který přímo souvisí s poruchami fúze faciálních či patrových výběžků. Jsou zde popsány i syndromy, jejichž hlavním projevem je právě rozštěp. Práce se zaměřuje rovněž na molekulární pozadí hlavních dějů při vzniku, diferenciaci a srůstu obličejových výběžků a sumarizaci základních známých genů podílejících se na těchto procesech.

Některé ze zásadních obecných informací se ještě nedostaly do všech výukových materiálů a učebnic, i když od jejich potvrzení uběhlo pár let. Například skutečnost, že *sutura incisiva* nepředstavuje hranici mezi původním embryonálním mediálním nasálním a maxilárním výběžkem. Dalším takovým poznatkem je nová teorie o vzniku ušních kůstek, které se diferencují z prvních dvou žaberních oblouků.

Celkově lze říct, že problematika vývoje obličeje a s tím souvisejících obličejových vad je v centru zájmu současné vědy a nových poznatků zejména v oblasti etiologie patologií neustále přibývá. Je však potřeba klást důraz neustále i na normogenezi obličeje jako takovou, kde i v současnosti existují stále nezodpovězené otázky, jejichž zodpovězení může úroveň vědění posunout blíže právě směrem k pochopení jednotlivých patologií.

6. Seznam literatury

- Abramyan, J., Leung, K. J. M., & Richman, J. M. (2014). Divergent palate morphology in turtles and birds correlates with differences in proliferation and BMP2 expression during embryonic development. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 322(2), 73-85.
- Andreou, A. M., Pauws, E., Jones, M. C., Singh, M. K., Bussen, M., Doudney, K., ... & Stanier, P. (2007). TBX22 missense mutations found in patients with X-linked cleft palate affect DNA binding, sumoylation, and transcriptional repression. *The American Journal of Human Genetics*, 81(4), 700-712.
- Antunes, R. B., Alonso, N., & Paula, R. G. (2012). Importance of early diagnosis of Stickler syndrome in newborns. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 65(8), 1029-1034.
- Barteczko, K., & Jacob, M. (2004). A re-evaluation of the premaxillary bone in humans. *Anatomy and embryology*, 207(6), 417-437.
- Beaty, T. H., Ruczinski, I., Hetmanski, J. B., Liang, K. Y., Wu, T., Murray, T., . . . Arcos-Burgos, M. (2010). A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nature Genetics*, 42(6), 525-529.
- Buchtová, M., Kuo, W. P., Nimmagadda, S., Benson, S. L., Geetha-Loganathan, P., Logan, C., ... & Richman, J. M. (2010). Whole genome microarray analysis of chicken embryo facial prominences. *Developmental Dynamics*, 239(2), 574-591.
- Bush, J. O., Lan, Y., Maltby, K. M., & Jiang, R. (2002). Isolation and developmental expression analysis of Tbx22, the mouse homolog of the human X-linked cleft palate gene. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 225(3), 322-326.
- Cuervo, R., & Covarrubias, L. (2004). Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development*, 131(1), 15-24.
- Da Silva, A. P. R. B., Costa, B., & De Carvalho Carrara, C. F. (2008). Dental anomalies of number in the permanent dentition of patients with bilateral cleft lip: Radiographic study. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 45(5), 473-476.
- Dai, J., Xu, C., Wang, G., Liang, Y., Wan, T., Zhang, Y., ... & Wu, D. (2018). Novel TBX22 mutations in Chinese nonsyndromic cleft lip/palate families. *Journal of genetics*, 97(2), 411-417.
- Demeer, B., Revencu, N., Helaers, R., Devauchelle, B., François, G., Bayet, B., & Vikkula, M. (2018). Unmasking familial CPX by WES and identification of novel clinical signs. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 176(12), 2661-2667.

- Depew, M. J., Simpson, C. A., Morasso, M., & Rubenstein, J. L. (2005). Reassessing the Dlx code: the genetic regulation of branchial arch skeletal pattern and development. *Journal of anatomy*, 207(5), 501-561.
- Deshpande, A. S., & Goudy, S. L. (2019). Cellular and molecular mechanisms of cleft palate development. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, 4(1), 160-164.
- Ding, H., Wu, X., Boström, H., Kim, I., Wong, N., Tsoi, B., ... & Hart, T. C. (2004). A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR- α signaling. *Nature genetics*, 36(10), 1111.
- Dixon, J., Jones, N. C., Sandell, L. L., Jayasinghe, S. M., Crane, J., Rey, J. P., ... & Trainor, P. A. (2006). Tcof1/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(36), 13403-13408.
- Dixon, M. J., Marazita, M. L., Beaty, T. H., & Murray, J. C. (2011). Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 167.
- Dorey, K., & Amaya, E. (2010). FGF signalling: Diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development*, 137(22), 3731-3742.
- Farrar, J. E. (1967). Mandibulo-facial dysostosis. A familial study. *The British journal of ophthalmology*, 51(2), 132.
- Francis-West, P. H., Robson, L., & Evans, D. J. (2012). *Craniofacial development the tissue and molecular interactions that control development of the head* (Vol. 169). Springer Science & Business Media.
- Froster-Iskenius, U. G. (1990). Popliteal pterygium syndrome. *Journal of medical genetics*, 27(5), 320.
- Garg, V., Yamagishi, C., Hu, T., Kathiriya, I. S., Yamagishi, H., & Srivastava, D. (2001). Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Developmental Biology*, 235(1), 62-73.
- Garib, D. G., Rosar, J. P., Sathler, R., & Ozawa, T. O. (2015). Dual embryonic origin of maxillary lateral incisors: clinical implications in patients with cleft lip and palate. *Dental press journal of orthodontics*, 20(5), 118-125.
- Giudice, A., Barone, S., Belhous, K., Morice, A., Soupre, V., Bennardo, F., ... & Picard, A. (2018). Pierre Robin Sequence: A comprehensive narrative review of the literature over time. *Journal of stomatology, oral and maxillofacial surgery*, 119(5), 419-428.
- Goudy, S., Law, A., Sanchez, G., Baldwin, H. S., & Brown, C. (2010). Tbx1 is necessary for palatal elongation and elevation. *Mechanisms of development*, 127(5-6), 292-300.
- Gurpal-Chhabda, V., & Singh-Chhabda, G. (2018). Congenital lower lip pits: Van der Woude syndrome. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 10(11), e1127.
- Gurramkonda, V. B., Syed, A. H., Murthy, J., & Lakkakula, B. V. (2018). IRF6 rs2235375 single nucleotide polymorphism is associated with isolated non-syndromic cleft palate but not with cleft lip with or without palate in South Indian population. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 84(4), 473-477.
- Haenig, B., Schmidt, C., Kraus, F., Pfordt, M., & Kispert, A. (2002). Cloning and expression analysis of the chick ortholog of TBX22, the gene mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Mechanisms of development*, 117(1-2), 321-325
- He, F., & Soriano, P. (2013). A critical role for PDGFR α signaling in medial nasal process development. *PLoS genetics*, 9(9), e1003851.
- Hill, C. R., Jacobs, B. H., Brown, C. B., Barnett, J. V., & Goudy, S. L. (2015). Type III transforming growth factor beta receptor regulates vascular and osteoblast development during palatogenesis. *Developmental Dynamics*, 244(2), 122-133.

- Hoch, R. V., & Soriano, P. (2003). Roles of PDGF in animal development. *Development*, 130(20), 4769-4784.
- Hovorakova, M., Lesot, H., Peterkova, R., & Peterka, M. (2006). Origin of the deciduous upper lateral incisor and its clinical aspects. *Journal of dental research*, 85(2), 167-171.
- Hsu, T. (2011). NME genes in epithelial morphogenesis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology*, 384(4-5), 363-372.
- Hu, D., & Helms, J. A. (1999). The role of Sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development*, 126(21), 4873-4884.
- Hughes, S. S., Welsh, H. I., Safina, N. P., Bejaoui, K., & Ardinger, H. H. (2014). Family history and clefting as major criteria for CHARGE syndrome. *American Journal Of Medical Genetics. Part A*, 164(1), 48-53.
- Inman, G. J. (2005). Linking Smads and transcriptional activation. *Biochemical Journal*, 386(1), E1.
- Juriloff, D. M., Harris, M. J., McMahon, A. P., Carroll, T. J., & Lidral, A. C. (2006). Wnt9b is the mutated gene involved in multifactorial nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in A/WySn mice, as confirmed by a genetic complementation test. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 76(8), 574-579.
- KILIÇARSLAN, Ö. A., Ataman, E., GÜRSOY, S., Hazan, F., RANDA, N. C., Cankaya, T., ... & BOZKAYA, Ö. G. (2018). Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome based on clinical characteristics. *Turkish journal of medical sciences*, 48(5), 911-915.
- Kondo, S., Schutte, B. C., Richardson, R. J., Bjork, B. C., Knight, A. S., Watanabe, Y., ... & McDonald-McGinn, D. M. (2002). Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nature genetics*, 32(2), 285.
- Kousa, Y. A., Roushangar, R., Patel, N., Walter, A., Marangoni, P., Krumlauf, R., ... & Schutte, B. C. (2017). IRF6 and SPRY4 signaling interact in periderm development. *Journal of dental research*, 96(11), 1306-1313.
- Lan, Y., Xu, J., & Jiang, R. (2015). Cellular and molecular mechanisms of palatogenesis. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 115, pp. 59-84). Academic Press.
- Lee, S. H., Fu, K. K., Hui, J. N., & Richman, J. M. (2001). Noggin and retinoic acid transform the identity of avian facial prominences. *Nature*, 414(6866), 909.
- Leslie, E. J., & Marazita, M. L. (2013, November). Genetics of cleft lip and cleft palate. In *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* (Vol. 163, No. 4, pp. 246-258).
- Leslie, E. J., Liu, H., Carlson, J. C., Shaffer, J. R., Feingold, E., Wehby, G., ... & McHenry, T. (2016). A genome-wide association study of nonsyndromic cleft palate identifies an etiologic missense variant in GRHL3. *The American Journal of Human Genetics*, 98(4), 744-754.
- Leslie, E. J., Mansilla, M. A., Biggs, L. C., Schuette, K., Bullard, S., Cooper, M., ... & Murray, J. C. (2012). Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome-wide association on chromosome 1p22. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 94(11), 934-942.
- Lisson, J. A., & Kjær, I. (1997). Location of alveolar clefts relative to the incisive fissure. *The Cleft palate-craniofacial journal*, 34(4), 292-296.
- Logjes, R. J., Breugem, C. C., Van Haften, G., Paes, E. C., Sperber, G. H., van den Boogaard, M. J. H., & Farlie, P. G. (2018). The ontogeny of Robin sequence. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 176(6), 1349-1368.
- Ludwig, K. U., Mangold, E., Herms, S., Nowak, S., Reutter, H., Paul, A., ... & Böhmer, A. C. (2012). Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nature genetics*, 44(9), 968.

- Madi, M., Babu, S. G., Bhat, S., & Madiyal, A. (2018). Treacher Collins syndrome: a case report. *Cukurova Medical Journal / Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 43(3), 718–721.
- Marçano, A. C. B., Doudney, K., Braybrook, C., Squires, R., Patton, M. A., Lees, M. M., ... & Stanier, P. (2004). TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. *Journal of medical genetics*, 41(1), 68-74.
- Meinecke, L., Sharma, P. P., Du, H., Zhang, L., Nie, Q., & Schilling, T. F. (2018). Modeling craniofacial development reveals spatiotemporal constraints on robust patterning of the mandibular arch. *PLoS computational biology*, 14(11), e1006569.
- Nair, S., Li, W., Cornell, R., & Schilling, T. F. (2007). Requirements for Endothelin type-A receptors and Endothelin-1 signaling in the facial ectoderm for the patterning of skeletogenic neural crest cells in zebrafish. *Development*, 134(2), 335-345.
- Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., ... & Müller, U. (2004). Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *The American Journal of Human Genetics*, 74(3), 558-563.
- Okuhara, S., & Iseki, S. (2012). Epithelial integrity in palatal shelf elevation. *Japanese Dental Science Review*, 48(1), 18-22.
- Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Eto, K., & Doi, H. (1994). The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Developmental biology*, 164(2), 409-419.
- Parada-Sanchez, M. T., Chu, E. Y., Cox, L. L., Undurty, S. S., Standley, J. M., Murray, J. C., & Cox, T. C. (2017). Disrupted irf6-nme1/2 complexes as a cause of cleft lip/palate. *Journal of dental research*, 96(11), 1330-1338.
- Paul, B. J., Palmer, K., Sharp, J. C., Pratt, C. H., Murray, S. A., & Dunnwald, M. (2017). ARHGAP29 mutation is associated with abnormal oral epithelial adhesions. *Journal of dental research*, 96(11), 1298-1305.
- Pauws, E., Peskett, E., Boissin, C., Hoshino, A., Mengrelis, K., Carta, E., ... & Stanier, P. (2013). X-linked CHARGE-like Abruzzo–Erickson syndrome and classic cleft palate with ankyloglossia result from TBX22 splicing mutations. *Clinical genetics*, 83(4), 352-358.
- Pilon, A. F. (2009). Midline orofacial cleft defects in association with type 1 Duane's retraction syndrome. *Clinical and Experimental Optometry*, 92(2), 133-136.
- Rishi, P., Maheshwari, A., & Rishi, E. (2015). Stickler syndrome. *Indian Journal of Ophthalmology*, 63(7), 614-615.
- Rizos, M., & Spyropoulos, M. N. (2004). Van der Woude syndrome: a review. Cardinal signs, epidemiology, associated features, differential diagnosis, expressivity, genetic counselling and treatment. *European Journal of Orthodontics*, 26(1), 17-24.
- Robin, N. H., Moran, R. T., & Ala-Kokko, L. (2017). Stickler syndrome. In *GeneReviews*®[Internet]. University of Washington, Seattle.
- Sadler, T. W. (2011). *Langmanova lékařská embryologie*. Grada Publishing as.
- Szabo-Rogers, H. L., Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Fu, K. K., & Richman, J. M. (2008). FGF signals from the nasal pit are necessary for normal facial morphogenesis. *Developmental Biology*, 318(2), 289-302.
- Tsai, T. P., Huang, C. S., Huang, C. C., & See, L. C. (1998). Distribution patterns of primary and permanent dentition in children with unilateral complete cleft lip and palate. *The Cleft palate-craniofacial journal*, 35(2), 154-160.
- Wei, X., Senders, C., Owiti, G. O., Liu, X., Wei, Z. N., Dillard-Telm, L., ... & Hendrickx, A. G. (2000). The origin and development of the upper lateral incisor and premaxilla in normal and cleft lip/palate monkeys induced with cyclophosphamide. *The Cleft palate-craniofacial journal*, 37(6), 571-583.

- Whyte, J., Cisneros, A., Yus, C., Fraile, J., Obón, J., & Vera, A. (2009). Tympanic ossicles and pharyngeal arches. *Anatomia, histologia, embryologia*, 38(1), 31-33.
- Wolf, Z. T., Leslie, E. J., Arzi, B., Jayashankar, K., Karmi, N., Jia, Z., ... & Murray, J. C. (2014). A LINE-1 insertion in DLX6 is responsible for cleft palate and mandibular abnormalities in a canine model of Pierre Robin sequence. *PLoS genetics*, 10(4), e1004257.
- Wyszynski, D. F., & Beaty, T. H. (1996). Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology*, 53(5), 309-317.
- Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A. P., & Jones, S. (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development*, 126(6), 1211-1223.
- Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R. P., Richardson, J. A., Williams, S. C., Clouthier, D. E., ... & Hammer, R. E. (1998). Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development*, 125(5), 825-836.