

생쥐 착상 전 배아에서 용해된 Matrigel에 의한 Mitogen Activated Protein Kinase 활성의 조절

강병문¹ · 정병목 · 계명찬[†]

¹울산대학교 의과대학 산부인과, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Regulation of Mitogen Activated Protein Kinase Activity by Solubilized Matrigel in the Preimplantation Mouse Embryos

Byung Moon Kang¹, Byung Mok Chung and Myung Chan Gye[†]

¹Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ulsan University, Ulsan 680-749, Korea

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT : To elucidate the mechanism underlying the embryotropic effect of extracellular matrix(ECM) on the preimplantation development of mammalian embryos, the involvement of mitogen-activated protein kinase(MAPK) downstream the integrin signaling was examined in mouse blastocysts. Blastocysts were cultured in the presence of growth factor-reduced(GFR) Matrigel(0.5%, v/v). MAPK activity was measured by in vitro phosphorylation of myelin basic protein by the Erk1/2 antibody immunoprecipitates of embryonic extract following the Matrigel treatment. MAPK activity of the early blastocysts rapidly increased within 10 min following the Matrigel treatment. When the embryos were cultured for 12 h in the presence of Matrigel, the MAPK activity was significantly higher than that of the control embryos. PD098059, a MAPK kinase(MEK) inhibitor, attenuated the effect of Matrigel on the change in MAPK activity. Taken together, it suggested that the embryotropic effect of ECM proteins might be mediated by the activation of MAPK cascade.

Key words : Matrigel, MAPK, Mouse Embryos.

요 약 : 세포외기질(extracellular matrix, ECM)에 의한 생쥐 초기 배아의 발생 조절 현상의 기작 규명을 위한 연구의 일환으로 Engelbreth-Holm-Swarm(EHS) mouse sarcoma의 세포외기질로부터 추출한 ECM 복합체인 Matrigel의 성장인자 제거형(GFR-Matrigel)을 생쥐 포배에 처리한 후 mitogen activated protein kinase (MAPK, ERK1/2) 활성의 변화를 조사하였다. Matrigel 처리 후 10분 이내에 배아의 MAPK 활성이 유의하게 증가하였고, 60분 후에도 유의하게 높은 활성을 유지하였다. 한편 MAPK cascade의 저해제인 PD098059를 전처리한 경우 Matrigel에 의한 MAPK 활성의 증가가 관찰되지 않았다. Matrigel 배양액 내에서 12시간 동안 배양한 포배의 MAPK 활성은 대조군과는 현격한 차이를 보였다. 이러한 결과로부터 ECM에 의한 생쥐 초기 배아의 발생 촉진효과 발현기작에는 하위 신호전달 과정의 MAPK 활성화 과정이 관여하는 것으로 사료된다.

서 론

포유류 수정란은 자궁 생식수관 내에서 3~4일 이내에 난할과 할구세포의 분화를 통해 포배로 발생한 후 부화를 거쳐 자궁에 착상하게 된다. 이 시기 동안 배아의 발생 과정은 배아 자체적으로 진행되는 발생프로그램에 의존적으로 진행되지만, 배아 자체 및 배아 주변의 생식수관에 존재하는 다양

한 생물학적 활성분자들에 의해 배아의 발생프로그램의 발현은 정교한 조절을 받는다(Kaye & Harvey, 1995). 발생 중인 배아 자체 및 자궁 생식수관조직에는 다양한 세포외기질(extracellular matrix, ECM)들이 발현되며, 초기 배아는 다양한 integrin을 발현하므로 ECM-integrin 사이의 상호작용은 할구세포의 분화 및 포배시기 영양외배엽세포(TE)의 극성의 발달과 유지에 중요한 역할을 한다(Sutherland et al., 1993). 배란된 난자 및 발생 중인 배아세포 주변(Kapur & Johnson, 1988; O'Shea et al., 1990; Turpeenniemi-Hujanen et al., 1995), 수란관 및 자궁내에는 다량의 ECM들이 존재하며(Yanagishita, 1994; Yoshimura, 1997; Burghardt et al., 1997; Guillomot, 1999) 이들은 배아 또는 자궁조직에서 주기적으로 발현되는 다양한 matrix metalloproteinase(MMP)에 의해 절단된다(McGuire

* 본 연구는 2001년 한국과학재단 연구비(2001-1-20500-020-1) 지원에 의한 것임.

[†]교신저자: 서울시 성동구 행당동 17, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791, (전) 02-2290-0958, (팩)02-2298-9646, E-mail: mcgye@hanyang.ac.kr

& Seeds, 1989; Brenner et al., 1989; Behrendtsen et al., 1992; Werb et al., 1992; Schatz et al., 1999). 생쥐의 포배는 상피의 기저막에서 주로 발견되는 laminin을 발현하며 TE 표면에서 발현되는 integrin은 자궁 내막 표면에 존재하는 laminin을 포함한 다양한 ECM 단백질들과 결합하여 착상에 관여한다 (Sutherland et al., 1993; Yoshimura, 1997). ECM 분자들은 α 와 β subunit heterodimer로 구성된 integrin과 결합하며, 12개의 α 와 9개의 β subunit의 조합의 결과로 적어도 20종의 integrin이 존재한다. 이들은 다양한 ECM 단백질과 결합하여 ECM의 생물학적 효과를 매개한다. 단백질 분해효소들에 의해 절단된 ECM 절편들은 세포 표면의 integrin과 결합하여 세포의 증식과 분화조절에 관여한다(Nagase & Woessner, 1999; Streuli, 1999). Integrin은 catenin 등을 매개로 하여 세포질골격과 연결되며, focal adhesion kinase(FAK), Src 등과의 상호작용을 통해 하위의 다양한 신호전달 과정에 관여하는 단백질의 활성화에 영향을 미친다(Fig. 1)(Jones & Walker, 1999). 또한 ECM은 integrin과의 결합을 통해 하위의 다양한 신호전달 체계를 활성화시킬 뿐 아니라 세포 주변에 존재하는 다양한 종류의 peptide 및 이들과 결합하는 단백질들과 세포간의 결합을 촉진하여 세포의 생존과 사멸, 분열과 분화 조절 효과를 상승시킨다(Camejo et al., 1995; Beattie et al., 1996; Giancotti & Ruoslahti, 1999). 다양한 조직 및 세포주에서 integrin 하위에서 ECM의 생물학적 효과를 매개하는 중요한 단백질 인산화 효소로 mitogen activated protein kinase(MAPK or ERK1/2)가 알려져 있다. 이들은 외부로부터 전달된 세포의 증식 및 분화조절 신호전달에 핵심적인 역할을 수행한다.

특정 ECM분자 또는 복합 ECM을 첨가한 배양액에서 배아의 포배형성, 부화 등 형태적 발달이 향상되며, 할구세포의 apoptosis는 억제된다(Saito & Niemann, 1991; Carnegie et al., 1995; Turpeenniemi-Hujanen et al., 1995; Desai et al., 1999; Lazzaroni et al., 1999; Chung et al., 2000; Kang et al., 2000). 이는 발생중인 배아의 주변에 존재하는 ECM 및 ECM 절편들이 발생 중인 배아 세포와의 접촉을 통해 발생에 중요한 조절인자로 작용할 가능성을 의미한다. 그러나 ECM이 착상 전 배아의 발생과 세포 생존 조절 가능성과 관련하여 ECM-integrin 상호작용의 하위에 작용하는 신호전달 경로상에 있는 MAPK 활성화에 미치는 영향은 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 Engelbreth-Holm-Swarm(EHS) mouse sarcoma에서 추출한 ECM복합체인 Matrigel을 희석한 배양액 내에서 생쥐의 포배를 배양한 후 MAPK의 활성 변화를 추적함으로써 Matrigel에 의한 배아 발생 촉진 효과를 세포 내 신호전달 수준에서 확인하고자 하였다.

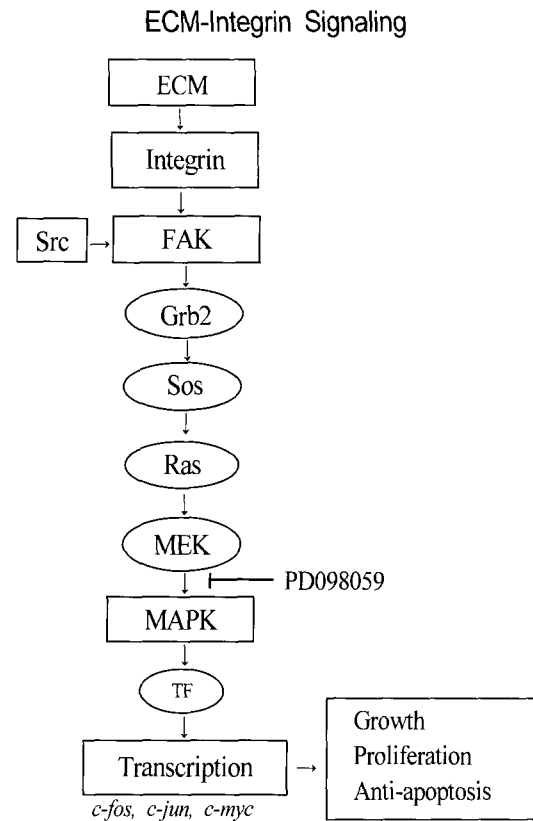


Fig. 1. Extracellular matrix - integrin signaling in general.

재료 및 방법

1. 배아의 수확 및 배양

삼육실험동물(Osan, Korea)에서 공급받은 ICR strain의 암컷 생쥐 6주령 및 수컷 생쥐 12주령을 사용하였다. 암컷 생쥐의 복강에 5IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG)(Sigma, St. USA)를 주사한 후 48h 이후에 human chorionic gonadotropin(hCG)(Sigma, St. USA) 5IU를 주사하여 과배란을 유도한 후 교미시켰다. 익일 오전 copulation plug 형성을 육안 확인한 후 hCG 주사 후 96h에 도살하여 자궁을 적출하였다. 배양액을 관류하여 포배를 수집하여 0.4% BSA가 첨가된 human tubal fluid(HTF) 배양액(Quinn, 1995)에서 12시간 동안 배양하면서 growth factor reduced Matrigel(GFR, 0.5%, v/v)를 단독으로 처리하거나 MEK 억제제인 PD098059(10 μ M)를 10분간 전처리한 후 복합 처리하였다.

2. Immunoprecipitation 및 MAPK 활성 측정

Matrigel을 처리한 배아를 HTF(1% PVP)로 세척한 후 10 μ l assay dilution buffer(ADB, 20 mM 3-morpholinopropanesulfonic acid(MOPS) pH 7.2, 25mM β -glycerophosphate, 5mM ethylene

glycol-bis(2-aminoethylether)-N, N, N, N'-tetraacetic acid(EGTA), 1mM Na-orthovanadate, 1mM dithiothreitol에 용해하였다. Protein A-agarose bead(Santacruz, CA, USA) 슬러리 30 μ l에 1 μ g Erk1/2 항체(Upstate, NY, USA)를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 진탕 배양한 후 buffer A(50mM Tris, pH 7.5, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 1mM EGTA, 0.5mM sodium ortho-vanadate, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 50 mM sodium fluoride, 5mM sodium pyrophosphate, 10mM sodium β -glycerophosphate and 0.1% Complete TM)로 2회 세척하였다. 배아추출물과 혼합하여 4°C에서 2시간동안 진탕 배양한 후 buffer A로 2회 세척하였다. Immune complex- protein A-agarose bead에 ADB를 넣고 3회 세척한 후, 14000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리한 immune complex의 상층액을 제거한 후, ADB, MAPK substrate cocktail(2 mg/ml myelin basic protein in ADB), protein kinase inhibitor cocktail (Upstate, NY, USA), Mg-ATP cocktail(75 mM magnesium chloride와 500 μ M ATP in ADB)과 [γ -³²P]-ATP (specific activity 5 μ Ci/mol, Amersham, USA)를 첨가하여 30°C에서 20분간 반응하였다. 반응종결을 위해 얼음에 정치한 후 phosphocellulose (PC) paper에 점적하였다. PC paper는 1% phosphoric acid에서 3회, ethanol로 2회 세척한 후 건조시키고 scintillation counter를 이용하여 방사선량을 측정하였다. Kinase 활성은 기질 첨가군 - 기질 비첨가군의 방사선량으로 계산하였다. 실험군들 사이의 MAPK 활성의 차이는 Student-t test로 통계 처리하여 p<0.05일 때 유의한 것으로 판정하였다.

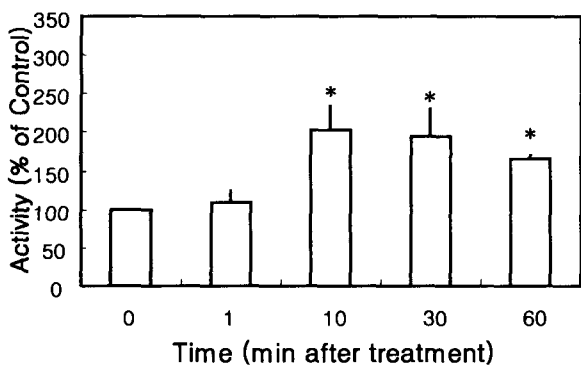


Fig. 2. Transient activation of MAPK of blastocysts following GFR-Matrigel treatment. Blastocysts were treated with GFR-Matrigel (0.5%, v/v) for 1, 10, 30, and 60 min. RIPA lysates of embryos was subjected to immunoprecipitation by the MAPK(Erk1/2) antibody and *in vitro* phosphorylation kinase assay. Results represent the means + SD of 4 independent trials. *significantly different from control by Student's *t*-test(P<0.05).

결 과

1. Matrigel에 의한 포배의 MAPK 활성변화

Matrigel은 처리 후 10분 경과 후 포배 내의 MAPK 활성을 비처리 대조군의 2배 내외로 유의하게 증가시켰으며 30분, 60분 후에도 비처리 대조군보다 유의하게 높았다(P<0.05)(Fig. 2). Matrigel에 의한 MAPK의 활성화 정도는 반면 12시간 동안 처리한 후 비처리군의 6배 정도로 유의하게 높았다(P<0.05)(Fig. 3).

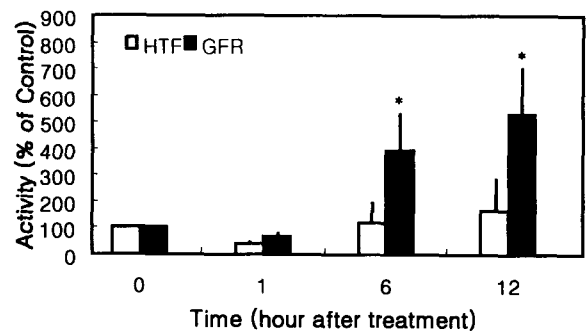


Fig. 3. Effect of GFR-Matrigel on the MAPK activity of blastocysts. Blastocysts were treated with GFR-Matrigel(0.5 %, v/v) for 1, 6, and 12 h. ADB lysates of embryos was subjected to immunoprecipitation by the MAPK(Erk1/2) antibody and *in vitro* phosphorylation kinase assay. Results represent the means + SD of 4 independent trials. *, significantly different from control by Student's *t*-test (P<0.05). HTF, human tubal fluid; GFR, GFR-Matrigel.

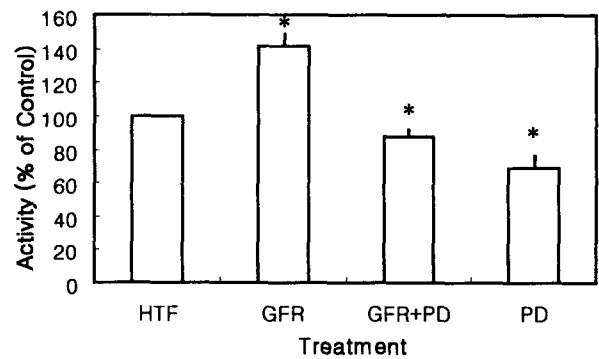


Fig. 4. Effect of PD098059 on the MAPK activity of Matrigel-treated blastocysts. Blastocysts were preincubated in the presence of 10 μ M PD098059 for 10 min and subjected to GFR-Matrigel treatment for 10 min. Results represent the means + SD of 4 independent trials. *, significantly different from HTF control by Student's *t*-test(P<0.05). HTF, human tubal fluid medium only; GFR, GFR-Matrigel treatment; GFR + PD, GFR-Matrigel plus PD098059; PD, 10 μ M PD098059 only.

2. Matrigel에 의한 MAPK 활성화변화와 MEK inhibitor 처리 효과

Fig. 2에서 확인된 MAPK 활성의 단기변동 양상에 근거하여 Matrigel 처리 후 10분 시점을 기준으로 MAPK 활성을 측정하였다. Matrigel 단독 처리 시 처리 후 10분만에 MAPK 활성이 유의하게 증가한 반면 PD098059($10 \mu\text{M}$)를 10분간 전 처리한 포배에 Matrigel을 처리한 경우 MAPK 활성은 대조군 및 Matrigel 단독처리군에 비해 유의하게 낮았다($P < 0.05$).

고 찰

Matrigel은 laminin을 주성분으로 하며 미량의 성장인자 및 단백질 분해효소들을 포함한다(Kleinman et al., 1982). 선행된 연구에서는 Matrigel에 의한 발생 촉진 효과가 단순히 ECM에 의한 것인지 아니면 성장인자 등 Matrigel 내에 존재하는 부가적 인자들에 의한 것인지는 분명치 않았다(Chung et al., 2000; Kang et al., 2000). 본 연구에서는 상기 성장인자들을 대부분 제거한 GFR-Matrigel을 처리한 배아에서 MAPK의 활성화 현상을 확인하였다. 따라서 Matrigel의 주성분인 laminin에 의한 배아 MAPK의 활성화가 진행된 것으로 사료된다. 배아 자체 및 배아 주변 생식수관에 존재하는 생리적인 ECM 뿐 아니라 외부에서 첨가한 비고형 상태의 ECM 역시 투명대를 통과해 배아와 접촉할 수 있다(Larson et al., 1992). 이와 유사하게 neuroblastoma는 비부착 상태에서 apoptosis를 진행하지만 용해된 상태의 ECM 분자에 의해 apoptosis가 억제된다(Bozzo et al., 1997). 이와 유사하게 용해된 상태의 laminin을 주성분으로 하는 Matrigel 내 ECM 분자가 배아 세포의 integrin과 결합하여 하위로 신호를 전달했을 가능성이 있다. Laminin과 특이적인 결합을 형성하는 $\alpha 6 \beta 1$ 은 후기 포배시기에 발현이 증가하며 $\alpha 7 \beta 1$ 은 발현이 시작된다(Klaffky et al., 2001). 따라서 Matrigel 내의 laminin과 이 시기의 배아에서 발현되는 integrin과의 상호작용을 추측할 수 있다.

본 실험에서 초기 포배에 Matrigel 처리 후 10분 이내에 비처리 대조군의 2배 수준으로 증가하여 용해된 상태의 Matrigel에 의한 MAPK 활성화가 매우 신속하게 진행됨을 알 수 있다(Fig. 2). 반면 초기 포배에 Matrigel을 처리한 후 12시간 후 MAPK 활성은 비처리군의 6배 정도로 증가하였다(Fig. 3). 이처럼 Matrigel 처리 후 포배의 MAPK 활성은 단기간 처리와 장기간 처리 후 모두 증가하였지만 그 증가 정도에는 뚜렷한 차이가 있다. 이러한 차이는 초기 포배와 후기 포배 사이에 ECM - integrin 상호작용에 따른 MAPK의 활성 감수성에 차이를 반영한다. 포배는 착상을 진행하는 과정에서 자궁

내막 상피세포 표면의 ECM 분자들과의 상호작용에 필요한 다양한 integrin 분자들을 발현할 뿐 아니라 포배 발달 후기에는 특히 영양외배엽 부위에서 세포질 골격, 세포질 내 free calcium 농도 등에 현격한 변화가 일어난다(Cheon et al., 1999). 근본적으로 ECM - integrin 상호작용을 통한 세포분열 및 분화의 조절은 세포질 골격을 포함한 다양한 세포 내 구조물 및 신호전달에 관여하는 다양한 단백질 인산화 효소들 사이의 상호작용에 의존적일 뿐 아니라, 착상 직전의 배아 주변에는 자체 생성되었거나 생식수관에서 생성 분비된 다양한 성장인자 및 사이토카인들이 존재하며 포배는 이들에 대한 수용체를 발현하므로 이들 성장인자들에 의해 생성된 신호와 ECM과의 결합에 의해 생긴 신호가 상승적으로 작용할 가능성이 있다. 이 가설을 뒷받침하는 증거로 다양한 조직 및 세포주에서 성장인자 등의 활성화분자들이 ECM-integrin 하위의 신호전달 과정에서 MAPK를 상승적으로 활성화시키는 것으로 알려졌다(Hermanto et al., 2002; Howe et al., 2002; Lee & Juliano, 2002; Kawahara et al., 2002). 그러나 착상전 배아를 대상으로 하여서는 아직은 직접적 증거가 없는 상태이다. 한편 두 처리군 사이의 MAPK 활성 증가의 차이의 원인으로 배아에서 발현되는 MAPK(ERK1/2)의 절대량의 변화와의 관련성을 추측할 수 있다. Matrigel 처리 시 포배의 할구수의 유의한 증가 및 사멸세포의 유의한 감소가 일어난다(Chung et al., 2000; Kang et al., 2000). 따라서 Matrigel에 장시간 노출된 배아의 할구수의 증가에 따른 배아 내 MAPK의 절대적인 증가로 인해 12시간이 경과한 시점의 MAPK 활성의 차이를 보였을 가능성이 있다. 그러나 이 때 할구수의 증가는 10% 내외로 MAPK 활성의 600% 증가에는 미치지 못하므로 할구수의 증가보다는 성장인자 등의 작용에 따른 상승효과에 따른 것으로 사료된다.

한편 MEK의 억제제인 PD098059 단독 처리 시 대조군의 MAPK 활성이 유의하게 억제될 뿐 아니라 PD098059를 전 처리한 배아에 Matrigel 처리한 경우 MAPK 활성은 Matrigel 단독 처리군보다 유의하게 낮아 Matrigel에 의한 MAPK cascade의 활성화가 진행되었음을 짐작할 수 있다. 그러나 PD098059를 단독으로 처리한 경우에도 상당한 단백질 인산화효소의 활성이 관찰된다(Fig. 4). 이러한 원인으로 MAPK 이외에 단백질 인산화 효소 활성을 갖는 단백질이 MAPK와 함께 면역침강되어 기질인 MBP를 인산화하였을 것으로 사료된다. 그러나 MEK의 억제제인 PD098059에 의한 MBP kinase 활성의 뚜렷한 감소는 Matrigel에 의한 MAPK cascade 활성화에 명백한 변화가 있음을 의미한다. 따라서 다른 종류의 세포주 또는 배아 및 성체의 조직에서와 마찬가지로 생물학적으로 보존

된 ECM - integrin 상호작용의 하위에 MAPK 활성화가 일어나는 신호전달이 착상 전 배아의 발생과정에 작용하고 있음을 암시한다. 현재까지 본 연구를 통해 밝혀진 MAPK의 활성화 현상을 제외하고는 용해된 상태의 ECM 분자에 의한 초기 배아 세포 내 integrin 하위 신호전달에 관한 구체적인 실험적 증거가 제시되지 않고 있다. 향후 MAPK를 포함한 다양한 신호전달 구성요소들의 상호작용에 대한 연구를 통해 ECM에 의한 착상 전 배아 발달과 초기 착상과정의 조절 기작에 대한 이해가 가능할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Beattie GM, Rubin JS, Mally MI, Otonkoski T, Hayek A (1996) Regulation of proliferation and differentiation of human fetal pancreatic islet cells by extracellular matrix, hepatocyte growth factor, and cell-cell contact. *Diabetes* 45:1223-1228.
- Burghardt RC, Bowen JA, Newton GR, Bazer FW (1997) Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 52:151-164.
- Brenner CA, Adler RR, Rappolee DA, Pedersen RA, Werb Z (1989) Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev* 3:848-859.
- Behrendtsen O, Alexander CM, Werb Z (1992) Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 114:447-456.
- Bozzo C, Bellomo G, Silengo L, Tarone G, Altruda F (1997) Soluble integrin ligands and growth factors independently rescue neuroblastoma cells from apoptosis under nonadherent conditions. *Exp Cell Res* 237:326-337.
- Camejo EH, Rosengren B, Camejo G, Sartipy P, Fager G, Bondjers G (1995) Interferon gamma binds to extracellular matrix chondroitin-sulfate proteoglycans, thus enhancing its cellular response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1456-1465.
- Carnegie J, Claman P, Lawrence C, Cabaca O (1995) Can Matrigel substitute for Vero cells in promoting the *in-vitro* development of mouse embryos? *Hum Reprod* 10:636-641.
- Cheon YP, Gye MC, Kim CH, Kang BM, Chang YS, Kim SR, Kim MK (1999) Role of actin filaments in the hatching process of mouse blastocyst. *Zygote* 7:123-129.
- Chung BM, Choo HS, Kang BM, Gye MC (2000) Development of mouse preimplantation embryos in solubilized Matrigel media. *Kor J Fertil Steril* 27:191-196.
- Desai N, Scarrow M, Lawson J, Kinzer D, Goldfarb J (1999) Evaluation of the effect of interleukin-6 and human extracellular matrix on embryonic development. *Hum Reprod* 14:1588-1592.
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.
- Guillomot M (1999) Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation. *Placenta* 20:339-345.
- Hermanto U, Zong CS, Li W, Wang LH (2002) RACK1, an insulin-like growth factor I(IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix. *Mol Cell Biol* 22:2345-2365.
- Howe AK, Aplin AE, Juliano RL (2002) Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev* 12:30-35.
- Jones JL, Walker RA (1999) Integrins:a role as cell signalling molecules. *Mol Pathol* 52:208-213.
- Kang BM, Shon IP, Chung BM, Choi KW, Gye MC (2000) Preimplantation development and apoptosis of mouse embryos in the medium containing extracellular matrix. *Kor J Fertil Steril* 27:253-259.
- Kapur RP, Johnson LV (1988) Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes. *Anat Rec* 221:720-729.
- Kawahara E, Nakada N, Hikichi T, Kobayashi J, Nakanishi I (2002) EGF and beta1 integrin convergently regulate migration of A431 carcinoma cell through MAP kinase activation. *Exp Cell Res* 272:84-91.
- Kaye PL, Harvey MB (1995) The role of growth factors in preimplantation development. *Prog Growth Factor Res* 6:1-24.
- Klaffky E, Williams R, Yao CC, Ziober B, Kramer R, Sutherland A (2001) Trophoblast-specific expression and function of the integrin alpha 7 subunit in the peri-implantation mouse embryo. *Dev Biol* 239:161-175.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR (1982) Isolation and characteriza-

- tion of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21:6188-6193.
- Larson RC, Ignatz GG, Currie WB (1992) Effect of fibronectin on early embryo development in cows. *J Reprod Fertil* 96:289-297.
- Lazzaroni L, Fusi FM, Doldi N, Ferrari A (1999) The use of Matrigel at low concentration enhances *in vitro* blastocyst formation and hatching in a mouse embryo model. *Fertil Steril* 71:1133-1137.
- Lee JW, Juliano RL (2002) The alpha5beta1 integrin selectively enhances epidermal growth factor signaling to the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1542:23-31.
- McGuire PG, Seeds NW (1989) The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J Cell Biochem* 40:215-227.
- Nagase H, Woessner JF Jr (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494.
- O'Shea KS, Liu LH, Kinnunen LH, Dixit VM (1990) Role of the extracellular matrix protein thrombospondin in the early development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 111:2713-2723.
- Quinn P (1995) Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J Assist Reprod Genet* 12:97-105.
- Schatz F, Krikun G, Runic R, Wang EY, Hausknecht V, Lockwood CJ (1999) Implications of decidualization-associated protease expression in implantation and menstruation. *Semin Reprod Endocrinol* 17:3-12.
- Streuli C (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11:634-640.
- Saito S, Niemann H (1991) Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol Reprod* 44:927-936.
- Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH (1993) Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 119:1175-1186.
- Turpeenniemi-Hujanen T, Feinberg RF, Kauppila A, Puistola U (1995) Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertil Steril* 64:132-138.
- Werb Z, Alexander CM, Adler RR (1992) Expression and function of matrix metalloproteinases in development. *Matrix Suppl* 1:337-343.
- Yanagishita M (1994) Proteoglycans and hyaluronan in female reproductive organs. *EXS* 70:179-190.
- Yoshimura Y (1997) Integrins: expression, modulation, and signaling in fertilization, embryogenesis and implantation. *Keio J Med* 46:16-24.