大韓不妊學會誌: 第29卷 第4號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 4, 2002, 12

임신한 생쥐 자궁에서의 doc-1 발현

일리노이대학교 수의과대학 생물과학과

전 용 필

Expression of doc-1 in Pregnant Uterus of the Mouse

Yong Pil Cheon

Department of Biosciences, College of Veterinary Medicine,
University of Illinois at Urbana-Champaign

Uterine cells carry out proliferation and differentiation for preparation the embryonic implantation during pregnancy. Therefore regulation of the cell proliferation is an essential step for uterine preparation, but there is not much information about the proliferation related genes in pregnant uterus. To identify these implantation specific genes, a PCR-select cDNA subtraction method was employed and got a few genes. One of the identified genes is a novel gene encoding oral tumor suppressor doc-1. To detect the doc-1 expression on the pregnant uterus, dot blotting, RT-PCR, and in situ hybridization were employed. Dot blotting revealed that doc-1 mRNA expression increase after implantation. During normal pregnancy, doc-1 mRNA expression was detected as early as day 1 of pregnancy with RT-PCR. Its expression was increased about 15 times after embryonic implantation. doc-1 transcript was localized in luminal epithelial cells but it was very faint during preimplantation. After starting the implantation, it localized in the stromal cells; heightened expression of doc-1 correlates with intense stromal cell proliferation surrounding the implanting blastocyst on day 6 morning. However in the decidualized cells, the intensity of localized doc-1 mRNA was weak. From those results, it is revealed that doc-1 express at pregnant uterus of the mouse. In addition it is suggested that doc-1 is the gene regulating the proliferation of the luminal epithelial cells and stromal cells during early implantation and decidualization.

Key Words: Doc-1, Decidualization, Implantation, Proliferation

자궁은 생식주기 또는 배아의 착상에 따라 난소 호르몬 등의 영향에 의한 세포 반응과 분자적 반응의 상호조절을 받아 극적인 변화를 보이는 조직이다. 이러한 변화는 정자의 수송이나 착상을 용이하게 하는 역할을 한다.[1,2] 착상과 관련된 가장 큰 변화중의 하나는 탈락막 반응이다.[3] 탈락막 형성과 관련된 분화는 자궁의 스트로마 세포에서 시작되며 결과적으로 배아의 계속적인 성장이 가능해진다. 이러한 자궁의 변화와 배아의 성장을 가능하게 하는 일련의 과정을 이해하기 위한 노력이 오랫동안 경주되어 왔다.[4~9]

착상에 의해 유도되는 자궁의 분화는 스트로마 세포의 증식, 혈관의 확장과 혈액 공급의 확대, 증식된 스트로마 세포의 분화와 자연사멸 등을 수반한다.[10,11] 따라서 이러한 변화를 수행하기 위해서는 여러 유전자와 그 산물이 관여할 것이라는 공감대가 형성되었

주관책임자: Yong Pil Cheon, Department of Veterinary Biosciences, University of Illinois at Urbana-Champaign Urbana, IL 61802. Tel: (217)-333-1731, Fax: (217)-244-1652, e-mail: ypcheon@uiuc.edu

다. 이와 관련된 것들로는 Cox-2,[12,13] Hß58,[14] Hoxa-10,[15] multiple bone morphogenetic proteins,[9] NDF,[16] pleiotrophin[17] 등이 보고되었으나 착상 기작을 이해하기 위해서는 착상에 관여하는 유전자를 보다 많이 동정하고 그 기능을 알아보는 것이 필요하다. 따라서 본 실험에서는 PCR-select cDNA subtraction 방법을 이용하여 얻은 유전자들 중의 하나인 doc-1에 대하여 연구하였다.

doc-1은 진화적으로 잘 보존된 유전자로 햄스터의 구강내 정상적인 케라틴 세포에서 subtractive hybridization 방법으로 동정되고 특성화 되어졌다.[18] 이렇게 보존된 특성은 생쥐, 쥐, 사람, 원숭이, 개, 소, 닭 등에서 관찰된다.[19] 햄스터의 cDNA는 약 1 kb이며 사람과 생쥐의 doc-1 cDNA는 각각 1.6 kb와 1.2 kb이다. 햄스터 doc-1과의 염기서열 유사율은 생쥐와 94%, 사람과 98%이다. 햄스터 DOC-1은 114개의 아미노산으로 구성되어 있고 분자량은 약 12.4 kDa이며, 사람과 설치류와의 단백질 동질성은 97%이나 생쥐와의 경우에 있어서는 동일하다.[18,20] 사람의 doc-1은 정상적인 심장, 대뇌, 태반, 폐, 간, 골격근, 신장, 췌장에서 발현되나 암세포에서는 급격한 감소를 보인다.[19] doc-1의 염기서열은 TU-166 (tumor necrosis factor-a에 의해 초기에 발현되는 전사물)과 일치하며, tumor necrosis factor-a 신호전달계의 하부에 속하는 것으로 보고되었다.[21] 근래 들어 DOC-1은 cyclin-dependent kinase 2와 관련된 단백질로 CDK-2의 활성을 억제하는 것으로 밝혀졌다.[22]

위에서 언급하였듯이, 착상 동안에 배아를 둘러싼 스트로마 세포의 증식과 분화가 진행된다. 이러한 변화는 배아의 자궁내막 침입을 조절하는 기능을 가질 수 있도록 세포분열과 분화가 진행되는 것이 특징이며 결과적으로 암과 같은 이상 현상이 관찰되지 않는다. 이처럼 엄격한 통제하에서 진행되는 탈락막 반응 등 자궁 분화에 관련된 유전자적 수준에서의 연구는 착상의 이해라는 측면뿐만이 아니라 다른 이상 치유에 응용도 가능하다. 그러나 자궁세포의 분열과 분화를 조절하는 유전자적 수준에서의 연구는 미진한 상태이다. 따라서 본 연구에서 기초적인 연구로 암억제 유전자로 알려진 doc-1이 임신한 생쥐의 자궁에서의 발현과 임신과 관련된 발현 추이를 알아보았다.

연구 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 명 14시간 암 10시간을 광주기로 하고 물과 먹이가 충분히 공급되는 표준환경에서 사육한 CD-1 생쥐를 이용하였다. 암컷 생쥐는 생후 6~8주령의 것을 사용하였으며, 수컷 생쥐는 생후 8~12주령의 건강하고 생식력 있는 것을 사용하였다. 임신한 생쥐를 얻기 위하여 발정기의 암컷 생쥐를 수컷 생쥐와 합사하였고 다음날 아침 질전을 확인하여 임신 여부를 확인하였다. 그리고 질전이 확인된 날을 임신 1일로 하였다.

2. cDNA Dot blotting과 역전사 중합반응 (RT - PCR)

cDNA Dot blotting을 수행하기 위하여 착상전 생쥐 자궁 (임신 4일)과 착상 후 생쥐 자궁 (임신 5일)을 각각 수획한 후 total RNA를 추출하고 이를 이용하여 mRNA를 추출하였다. 이후 PCR-Select Differential Screening (CLONTECH, Palo Alto, California) 사용자 설명서에 따라 수행하였으며, 이때 예외적으로 doc-1의 PCR 산물 조각을 ^{32}P-dCTP로 표지하여 사용하였다.

역전사를 위하여 3 µl oligo (dT) (100 ng/µl, STRATAGEN)를 38 µl RNA 용액 (100 ng of poly $(A)^+$ mRNA)에 넣어 65°C에서 5분간 방치하였고 이후 얼음에 넣어 냉각하여 2차 구조를 제거하고 시발체 (primer)가 결합하도록 하였다. 이후 5 µl의 10x 완충용액 (buffer), 1 U/µl moloney murine leukemia virus (MMLV) 역전사 효소 (reverse transcriptase), 0.8 U/µl RNase inhibitor, dNTP 혼합액 (100 µM) 2 µl을 첨가하여 전체 50 µl가 되게 하였다. 이후 1시간 동안 42°C에서 방치하고, 95°C에서 10분간 방치한 후 얼음에 넣어 냉각하고 다음 단계에 이용하였다.

중합반응은 자동온도조절장치 (Thermocycler, Promega)를 이용하였으며, 2 µl cDNA에 다음과 같이 PCR 용액과 물을 넣어 전체 50 µl가 되도록 하였다: 0.4 µl dNTP 혼합액 (100 mM), 각각의 시발체 (primer, 10 µM) 1 µl, 물 40.35 µl, *Taq* 중합효소 (5 U/µl) 0.25 µl을 혼합하여 준비하였다. 중합반응은 제 1회는

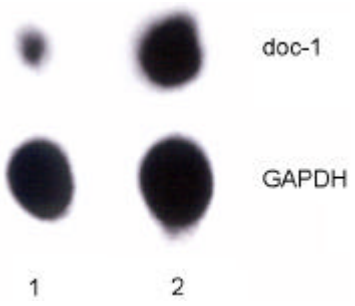

Figure 1. cDNA dot blot analysis of mRNA obtained from day 4 and day 5. Dot blotting was performed as mentioned in Materials and Methods. Lane 1 is day 4 morning; Lane 2 is day 5. Hybridization was performed with ^{32}P-labled doc-1 and GAPDH cDNA probes

94℃에서 5분, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분 하였고, 94℃에서 1분, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 하여 26회 순환 증폭하였으며 마지막 회에서는 72℃에서 7분간 방치하였으며 4℃에 일시 저장하였다. RT-PCR 산물 분석은 1% 아가로즈젤 (agarose gel)을 이용한 전기영동을 실시하였다.

doc-1을 증폭하기 위하여 생쥐의 doc-1 mRNA에 특이적인 시발체를 (Gene Bank^{TM} number AF011644; Sense: 5'-AGCCTGGTTCGGGAGTGCTT-3', AS: 5'-CTTCTGCATGTGTAACCTGTGC-3') 사용하였다. 그리고 상대적인 발현량을 알아보기 위하여 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 이용하였다.

3. In situ hybridization

각 실험군의 자궁조직은 액화질소를 이용하여 급냉동하여 보관하였으며 냉동절편기를 이용하여 조직절편을 준비하였다. 조직절편은 4℃로 유지된 4% paraformaldehyde 용액으로 고정하였으며 사용되기 전까지 -80℃에 보관하였다. 생쥐의 doc-1에 특이적인 357 bp의 PCR 산물을 T3 또는 T7을 이용하여 DIG RNA labeling kit (Roche, Indianapolis, Indiana)로 표지하여 사용하였다.

In situ hybridization은 Chen 등의 방법을 이용하였으며 간략히 다음과 같다.[23] Prehybridization은 55℃, 100% 습도가 유지되는 기구를 이용하여 1시간 동안 prehybridization 완충용액 (50% formamide, 5x SSC, 10% Dextra sulfate, 0.3 M NaCl, 0.2 mg/ml ssDNA, 1x Denhardt's solution, 20 mM Tris-Cl (pH 8.0)) 내에서 진행되었다. Hybridization은 55℃, 100% 습도가 유지되는 기구를 이용하여 16시간 진행하였다. DIG으로 표지된 probe를 표지하기 위하여 5x SSC로 1회 세척하고, 50% formamide, 2x SSC로 3회, 각각 15분 동안, 50℃에서 세척하였다. 그후 anti-DIG alkaline phosphatase 항체와 반응시켰다. 여분의 항체를 제거한 후 발색을 위해 기질 (Nitrblue tetrazolium salt와 5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphate, NBT-BCIP)을 넣은 용액 내에서 방치하여 반응을 유도하였다.

결 과

1. 배아의 착상과 doc-1의 발현

착상과 doc-1의 발현관계를 알아보기 위하여 착상전 자궁과 착상 후 자궁의 mRNA를 이용하여 cDNA Dot blotting을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Figure 1에서 보는 것처럼, doc-1 mRNA 전사량은 임신 5일째 되는 자궁에서 임신 4일째 되는 자궁에 비해 현격히 증가하였다. GAPDH를 이용한 상대적 전사량 비교에서 착상 이후에 전사량이 4배 이상 증가하였다.

2. 임신동안 doc-1의 발현

착상과 함께 doc-1 mRNA의 전사량이 급격한 증가를 보인 결과를 통해 임신기간 동안 자궁의 분화에 따라 전사량이 달라질 수 있음을 추정할 수 있었다. 따라서 역전사 중합반응을 이용하여 정상 임신 동안 doc-1 mRNA 전사량의 변화를 알아 보았다. doc-1의 전사는 임신 1일째부터 관찰되며 임신날짜에 관계없이 관찰한 모든 자궁에서 관찰되었다. doc-1 mRNA 전사량은 임신 1일, 2일, 그리고 3일된 자궁에서 매우 적어 중합반응 산물을 EtBR로 표지하였을 때 매우 희미하였다 (Figure 2A). 그러나 착상이 진행되는 임신 4일 이후 그 전사량이 급격히 증가하여 임신 3일에 비해 15배 이상 증가하였다. 그리고 스트로마 세포의 활발한 증식과 탈락막으로 분화하는 임신 5일에는 doc-1 mRNA 전사량이 임신 4일에 비해 2배 이상 증가하였다. 한편 임신 6일된 자궁에서의 doc-1 mRNA 전사량은 임신 4일에 비해

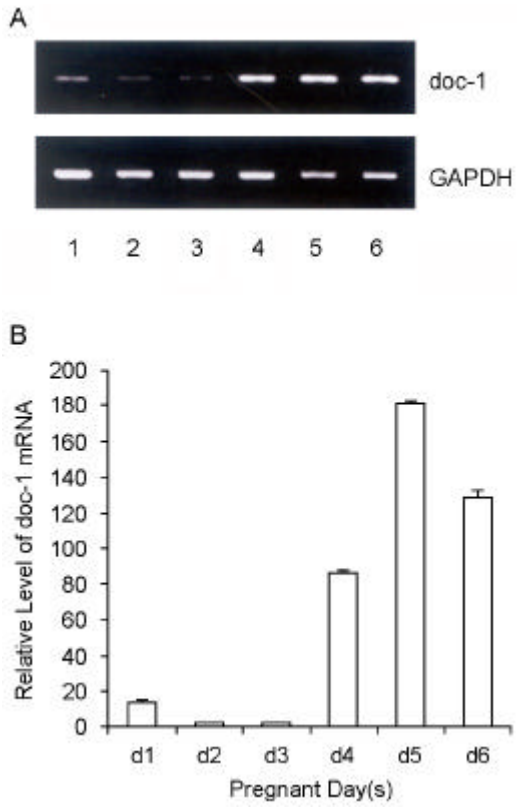

Figure 2. doc-1 mRNA expression in the uteri of normal pregnant mice. **A,** RT-PCR was performed with mRNA isolated from uteri of normal pregnant mice on d1, d2, d3, d4, d5, and d6 (lane 1, 2, 3, 4, 5, 6). **B,** The relative level of doc-1 mRNA transcription was normalized with respect to GAPDH mRNA signal in the same sample. The error bar means SD.

0.5배 정도 감소하였다 (Figure 2B). 이상의 결과를 통해 doc-1 mRNA의 전사가 자궁내막과 스트로마 세포 등의 증식 또는 분화와 관련되어 있음을 추정할 수 있었다.

3. doc-1 mRNA의 분포

doc-1 mRNA의 전사가 자궁내막을 구성하는 세포의 증식 또는 분화와 관계가 있는지를 알아보기 위하여 in situ hybridization 방법을 이용하여 doc-1 전사체의 존재 부위를 알아보았다. 착상전인 임신 1일과 3일째 되는 자궁에서는 doc-1의 전사체가 자궁강 상피세포 (luminal epithelial cell)에 표지되었으나 RT-PCR의 결과처럼 그 표지 정도가 매우 약하였다 (Figure 3A, B). 임신 6일째 되는 자궁강 상피세포에서는 검출되지 않으나 (Figure 3C), 반면 배아를 둘러싼 스트로마 세포에는 doc-1 전사체의 표지가 강하게 분포하였다 (Figure 3D).

고 찰

착상 과정에 대한 분자적 이해를 위하여 PCR-select cDNA subtraction 방법을 이용한 일련의 실험을 통하여 doc-1을 동정하였다. doc-1은 햄스터의 구강 케라틴 세포에서 처음으로 밝혀졌고 생쥐나 사람 등에서도 동정되었으며, 암세포에서 doc-1을 인위적으로 발현시킬 경우 암세포의 성장과 형태의 변화를 유도하는 암억제 유전자이다.[18~20]

doc-1은 구강세포에서 뿐만이 아니라 사람의 정상적인 심장, 뇌, 간 등의 조직에서 발현되는 것으로 보고되었다.[19] 본 실험결과에서 보듯이, doc-1 mRNA가 착상 전·후의 자궁에서 전사되는 것을 확인하였다. 따라서 위에서 언급한 정상적 조직 이외에 임신한 생쥐 자궁에서 doc-1이 발현됨을 알 수 있다.

임신기간 동안 doc-1 mRNA 전사가 어떻게 변화하는 가를 알아보기 위하여 semi-quatitive RT-PCR 방법을 이용하였으며 Figure 2와 같은 결과를 얻었다. doc-1 mRNA 전사체는 임신 1일째부터 검출되었다. 그러나 착상전의 자궁에서는 역전사 중합 산물의 표지가 매우 약하였다. 착상이 진행되는 임신 4일 이후에는 doc-1 mRNA 전사체가 약 15배 이상 증가하였다. 임신 5일과 6일째의 자궁에서도 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 doc-1의 발현이 착상과 관련되어 있음을 추정할 수 있었다.

착상과 관련된 자궁의 변화 중의 하나는 탈락막 반응으로, 탈락막 반응은 스트로마 세포의 증식과 이들 세포가 특정 형태의 세포, 즉 탈락막 세포로 분화되는 특성을 갖고 있다. 포배와 자궁 상피와의 부착 (attachment)과 함께 포배를 둘러싼 스트로마 세포에서 왕성한 세포분열이 시작된다. 반면, 포배가 부착한 부위의 자궁강 상피세포들은 착상의 진행과 함께 자연사멸 과정을 거쳐 사라지게 된다. 임신 5일과 6일 사이에 왕성한 증식을 보이는 포배를 둘러싼 스트로마 세포들은 탈락막 세포로 분화하여 일차 탈락막 (primary decidual zone, PDZ)을 형성한다. 이

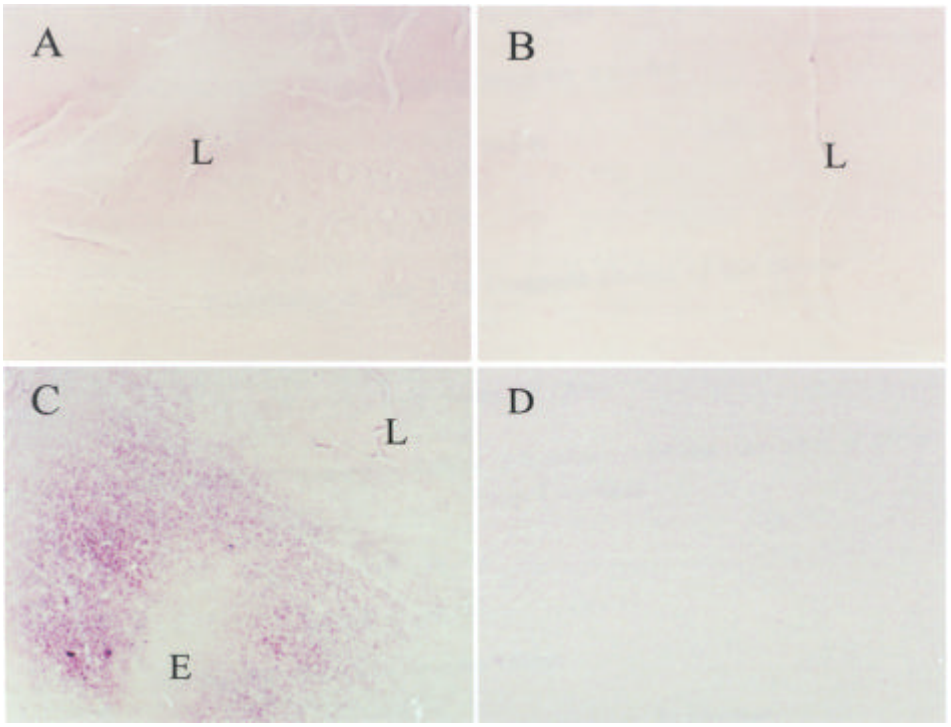

Figure 3. Localization of doc-1 mRNA in the mice uteri by in situ hybridization. The hybridization was performed employing digoxygenin-labled complementary RNA probe specific for doc-1 as described in Materials and Methods. Uterine sections from d1 pregnancy **(A),** d3 pregnancy **(B),** d6 pregnancy **(C),** d6 pregnancy as a control **(D).** L and E indicate the glandular and luminal epithelia, respectively, Magnification, X100.

후 PDZ에 근접한 스트로마 세포가 계속적으로 증식하고 부화하여 2차 탈락막 (secondary decidual zone, SDZ)을 형성한다.[24] 또한 설치류에서 스트로마 세포는 탈락막으로 분화하는데 있어서 다배체 염색체를 갖는 세포, 분화되기 전에 증식하는 세포 등으로 구분되어진다.[25~27] 탈락막 반응과 관련한 세포증식에 대한 연구는 최근에 몇몇 보고가 있으나 이해가 부족한 형편이다.

세포주기는 모든 조직에서 엄격하게 조절되며, 두 개의 특별한 단계, G1-S와 G2-M에서 이루어 진다. 세포주기는 cyclin-dependent kinase (CDK)에 의해 조절된다. Cyclin들과 결합 또는 cyclin-dependent kinase 억제 물질 (CKI)에 의해 활성화 되거나 억제된다.[28,29] 세포주기 G1에서 S로의 진행은 cyclin D, cyclin E, 그리고 cyclin A와 관계된 kinase의 활성에 의해 조절된다. Cyclin B계와 관련된 kinase들은 G2에서 M으로의 진행에 관여한다. CKI는 두 계통이 있는 것으로 알려져 있는데, INK4계 ($p15^{ink4b}$, $p16^{ink4a}$, p18 and p19)는 cyclin D-dependent kinase, 특히 CDK4와 CDK6에 결합한다.[30,31]

Tan 등은 D-type cyclin중 cyclin D3가 자궁의 스트로마 세포의 증식과 분화, 그리고 다배체 염색체를 갖는 세포로의 분화 등에 중요한 역할을 하고 있음을 보고하였다.[32] 예를 들면, 임신 5일 아침에는 포배를 둘러싼 스트로마 세포에서 cdk4와 관련된 cyclin D3이 아주 많이 발현된다. 반면, 임신 5일 오후에 배아 주변의 스트로마 세포에서는 cdk4와 cyclin D3의 발현이 감소함을 보고하였다.

세포분열 조절은 cyclin과 CDK 이외에 암세포억제 유전자 산물도 관여한다. doc-1은 암억제 유전자로 알려졌으며, pol-a: primase binding domain을 가지고 있으며 DNA 복제 초기단계 (initiation step)에서 복제를 억제한다. DOC-1의 DNA 복제 억제는 pol-a: primase를 직접적으로 억제하는 것과 cyclin depen-

dent kinase 2 (CDK2)에 영향을 주는 것에 의한 것으로, DOC-1은 CDK2에 의해 매개되는 pol-a: primase의 인산화 반응을 억제한다.[13] 또한, DOC-1은 CDK2의 단백질분해 (proteolysis)를 유도함으로써 CDK2의 활성을 억제한다.[22] DOC-1은 체내에서 ubiquitinization 되어져 있으며 Nedd-4의 기질임이 밝혀졌다. 즉 세포내 DOC-1은 ubiquitin을 매개로한 단백질분해 (proteolysis)에 의해 엄격하게 조절된다.[33,34] 따라서 유전자내 binding domain, 그리고 세포내 proteolysis에 의한 조절 등의 특성을 갖는 doc-1이 자궁의 세포분화 또는 세포증식에 관여할 것으로 추정된다.

유전자의 역할을 알아보기 위한 방법 중의 하나는 그 유전자가 발현되는 세포를 알아보는 것이다. 따라서 doc-1의 역할을 추정하고자 doc-1이 전사되는 자궁내 조직을 in situ hybridization 방법으로 살펴보았다. doc-1의 mRNA가 임신 1일 또는 임신 3일째는 그 표지가 매우 약하며, 자궁강 상피세포에 주로 분포하였다. 한편 임신 6일째된 자궁에서 착상된 배아를 바로 둘러싼 스트로마 세포에서는 doc-1의 발현이 바깥 부위에 비해 그 표지 정도가 약하였다. 이는 배아 주변의 스트로마 세포가 분열을 멈추고 PDZ을 형성하는 것과 정확하게 일치한다. 아마도 이는 PDZ이 완성된 이후 자연적인 사멸을 하기 때문일 것으로 사료된다. 한편, 분화가 되지 않은 PDZ 주변의 스트로마 세포는 계속적으로 분열하는데 이들 세포에서 doc-1의 발현이 이루어진다. 따라서 탈락막 반응이 일어나는 착상 부위의 스트로마 세포에서 세포의 증식을 촉진하는 cyclin D3와 cdk의 발현[32] 이외에 CDK2의 활성을 조절하는 doc-1이 발현됨을 알 수 있었다.

탈락막 세포로 스트로마 세포가 분화함에 있어서 세포증식과 그 조절에는 불가분의 관계에 있다.[32,35] 따라서 종합적으로, 본 연구 결과를 바탕으로 doc-1은 착상전 자궁의 상피세포와 착상 후 자궁의 스트로마 세포의 세포주기 조절에 관여함으로서 착상과 관련된 자궁의 분화를 조절하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구를 수행함에 있어 협력을 아끼지 않으신 일리노이대학교 Indrani C Bagchi 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Ferenczy A. Regeneration of the human endometrium. In: Genoglio CM, Wolff LM, editor. Progress in surgical pathology. New York: Masson; 1980. p. 157-77.
2. Pedykula HA, Coles LG, McCracken JA, King NW, Jr Longcope C, Kaiserman-Abramof IR. A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus endometrium during the estrogen surge. Biol Reprod 1984; 32: 1103-18.
3. Leavitt WW. Cell biology of the endometrium. In: Wynn RM, Jollie WP, editor. Biology of the uterus. New York: Plenum Medical Book Company; 1989. p. 131-73.
4. Ben-Zimra M, Koler M, Melamed-Book N, Arensburg J, Payne AH, Orly J. Uterine and placental expression of steroidogenic genes during rodent pregnancy. Mol Cell Endo 2002; 187: 223-31.
5. Chantakru S, Miller C, Roach LE, Kuziel WA, Maeda N, Wang WC, et al. Contri- butions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. J Immun 2002; 168: 22-8.
6. Croy BA, Chankakru S, Esadeg S, Ashkar AA, Wei Q. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). J Reprod Immun 2002; 57: 151-68.
7. Robb L, Li R, Hartley L, Nandurkar HH, Koentgen F, Begley CG. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. Nat Med 1998; 4: 303-8.
8. Xiao LJ, Chang H, Ding NZ, Ni H, Kadomatsu K, Yang ZM. Basigin expression and hormonal regulation in mouse uterus during peri-implantation period. Mol Reprod Dev 2002; 63: 47-54.
9. Ying Y, Zhao GQ. Detection of multiple bone morphogenetic protein messenger ribonucleic acids and their signal transducer, Smad1, during mouse deci-

dualization. Biol Reprod 2000; 63: 1781-9.
10. Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Implantation and decidualization in rodents. J Exp Zool 1993; 266: 603-28.
11. Finn CA, McLaren A. A study of the early stages of implantation in mice. J Reprod Fert 1967; 13: 259-67.
12. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. Cell 1997; 91: 197-208.
13. Matsumoto H, Ma W, Dailoku T, Zhao X, Paria BC, Das SK, et al. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. J Biol Chem 2002; 277: 29260-7.
14. Rider V, Jones SR, Foster RT, Imakawa K. Changes in the temporal and spatial expression of HB58 during formation and maturation of the chorioallantoic placenta in the rat. Biol Reprod 2000; 63: 1735-46.
15. Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. Development 1996; 122: 2687-96.
16. Reese J, Brown N, Das SK, Dey SK. Expression of neu differentiation factor during the periimplantation period in the mouse uterus. Biol Reprod 1998; 58: 719-27.
17. Bany B, Schultz GA. Peiotrophin messenger ribonucleic acid levels in mouse endometrial stromal cells during decidualizaiton. Endocronology 2001; 142: 955-8.
18. Todd R, McBride J, Tsuji T, Donoff RB, Nagai M, Chou MY, et al. Deleted in oral cancer-1 (doc-1), a novel oral tumor suppressor gene. FASEB J 1995; 9: 1362-70.
19. Tsuji T, Duh FM, Latif F, Popescu NC, Zimonjic DB, McBride J, et al. Cloning, mapping, expression, function, and mutation analysis of the human ortholog of the hamster putative tumor suppressor gene doc-1. J Biol Chem 1998; 2733: 6704-9.
20. Shintani S, Mihara M, Terakado N, Nakahara Y, Matsumura T, Kohno Y, et al. Reduction of $p12^{DOG1}$ expression is a negative prognostic indicator in patients with surgically resected oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2001; 7: 2776-82.
21. Gordon HM, Kucera G, Salvo R, Boss JM. Tumor necrosis factor induces genes involved in inflammation, cellular and tissue repair, and metabolism in murine fibroblasts. J Immunol 1992; 148: 4021-7.
22. Shintani S, Ohyama H, Zhang X, McBride J, Matsuo K, Tsuji T, et al. $p12^{DOG1}$ is a novel cyclin-dependent kinase 2-associated protein. Mol Cell Biol 2000; 20: 6300-7.
23. Chen D, Xu X, Zhu LJ, Angervo M, Li Q, Bagchi MK, et al. Cloning and uterus/oviduct-specific expression of a novel estrogen-regulated gene (ERG1). J Biol Chem 1999; 274: 32215-24.
24. Dey SK. Implantation. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, editor. Reproductive endocrinology, surgery and technology. New York: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 421-34.
25. Ansell JD, Barlow PW, McLaren A. Binucleate and polyploid cells in the deciduas of the mouse. J Embryol Experi Morphol 1974; 31: 223-7.
26. Das SK, Lim H, Paria BC, Dey SK. Cyclin D3 in the mouse uterus is associated with the dediualization process during early pregnancy. J Mol Endocrinol 1999; 22: 91-101.
27. Sachs L, Shelesnyak MC. The development and suppression of polyploidy in the developing and suppressed deciduoma in the rat. J Endocrinol 1995; 12: 146-51.
28. Morgan DO. Principles of CDK regulation. Nature 1995; 374: 131-4.
29. Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science 1996; 274: 1672-7.
30. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell 1994; 79: 573-82.
31. Murray AW. Creative blocks: cell-cycle checkpoints

and feedback controls. Nature 1992; 359: 599-604.
32. Tan J, Raja S, Davis MK, Tawfik O, Dey SK, Das SK. Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation. Mech Devel 2002; 111: 99-113.
33. Hatakeyama S, Jensen JP, Weissman AM. Subcellular localization and ubiquitin-conjugation enzyme (E2) interactions of mammalian HECT family ubiquitin protein. J Biol Chem 1997; 272: 15085-92.
34. King RW, Deshaies RJ, Reters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. Science 1996; 274: 1652-9.
35. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulation of G1-phase progression. Genes Dev 1999; 13: 1501-12.