

ANALISIS CEL.LULAR PER HIBRIDACIO 'IN SITU' E IMMUNOCALITZACIO
DE L'EXPRESSIO I DISTRIBUCIO DE LA LIPOPROTEINA LIPASA EN OVARI
DE CONILL D'INDIES

Laura Camps; Manuel Reina; Miquel Llobera i Senén Vilaró

Unitats de Biologia Cel.lular i de Bioquímica i Biologia
Molecular; Dept. Bioquímica i Fisiologia. Universitat de
Barcelona. Avda. Diagonal 645, 08028-Barcelona.

CELLULAR ANALYSIS BY "IN SITU HYBRIDIZATION AND
IMMUNOCALIZATION OF EXPRESSION AND DISTRIBUTION OF LIPOPROTEIN
LIPASE IN GUINEA PIG OVARY

ABSTRACT

An important ovarian function is the synthesis of steroid hormones for menstrual cycle regulation. Blood substrate for these hormones are large lipoprotein complex, unable to cross the cellular membrane without previous hydrolysis to fatty acids. The question is what are the mechanisms that aid the lipid uptake by the ovary?. In this work we study the presence of the lipoprotein lipase (LPL) which is the enzyme responsible of the hydrolysis of lipoproteins in other tissues like heart or adipose tissue. In the present work we use "in situ" hybridization and immunocalization to know the cellular types which synthesized LPL and where the protein is located within the ovary.

In "situ" hybridization showed LPL mRNA in cells of the follicular wall of the cortex, and in granulosa and theca lutein cells of the mature corpus luteum. By immunocalization LPL was visualized at the vascular endothelium of capillaries and large vessels of the cortical region as well capillaries in the stroma of corpus luteum. These result suggest that in the guinea pig LPL has an important function for delivery of lipids from lipoproteins to ovarian cells.

Key words: Lipoprotein lipase; Ovary; "in situ" hybridization;
immunocalization; steroid hormones.

INTRODUCCIO

Una de les funcions importants de l'ovari és la síntesi i alliberació d'hormones esteroides (estrògens i progesterona) per la regulació del cicle menstrual. Els substrats per aquestes hormones circula per la sang en forma de lipoproteïnes (complexes que per la seva grandaria impossibilita la captació directa per la cèl.lula). Una qüestió, avui per avui, encara per resoldre es el coneixement dels mecanismes responsables de aquesta captació en l'ovari.

En el metabolisme lipoproteic si troben implicades dues lipases, la lipoproteïna lipasa (LPL) i la lipasa hepàtica (HL). Les seves respectives estructures es coneixen a partir de la seqüència de cDNA (Wion i col., 1987; Komaromy i Schotz, 1987) i, és clar que ambdues procedeixen d'un gen ancestral comú, però que és diferencien tenint un paper complementari en el metabolisme lipoproteic. La LPL actua sobre les lipoproteïnes riques en triacilglicèrids i es troba en teixits amb altes necessitats de àcids grassos (vegueu per revisió Borensztajn, 1987). La lipasa hepàtica actua principalment en lipoproteïnes de mida més petita, com les HDL i també romanents de VLDL i quilomicros (Jansen i Hülsmann, 1980; Bamberger i col., 1985).

En l'actualitat hom coneix que la lipoproteïna lipasa és una proteïna sintetitzada per les cèl.lules parenquimàtiques dels teixits on es presenta i posteriorment es alliberada a l'espai extracel.lular, unint-se a la membrana luminal de la cèl.lula endotelial (vegueu Borensztajn, 1987 per revisió). Es precisament en aquest lloc on actua sobre els lípids de les lipoproteïnes alliberant els àcids grassos, que així poden atravesar la membrana plasmàtica i esser metabolitzats per la cèl.lula.

En aquest treball estudiem la possible presència de la lipoproteïna lipasa (LPL) que és l'enzim responsable de la captació de lipoproteïnes en altres teixits. Per això utilitzem tècniques de immunolocalització per tal de conèixer la distribució de la proteïna i de hibridació "in situ" per conèixer els tipus cel.lulars responsables de la seva síntesi a l'ovari de conills d'índies.

MATERIALS I METODES

Hibridació "in situ".

Hem utilitzat la cadena sense sentit del RNA per la LPL, produït i marcat amb S^{35} per transcripció amb la T7 RNA polimerasa a partir de DNA. Aquest era derivat per inserció d'un fragment de 2,2 Kb del cDNA de la LPL (descriu per Enerback i col., 1988) al lloc Eco R1 d'un plàsmid PGEM^R 3Zf (-) (Promega). Aquest fragment es troba en la seqüència codificant del mRNA per la LPL, corresponent a la meitat C-terminal de la proteïna madura. Els plàsmids van ésser linealitzats amb SmaI. Les reaccions de marcatge es varen realitzar amb el kit "Paired-promotor SP6 an T7 systems" de Amersham. La longitud mitja de la sonda utilitzada va ésser de 400 bp, amb una activitat específica de $2 \cdot 10^8$ cmp/ μ g. Com a control negatiu i per tal de coneixer els nivells de marcatge inespecífic es va utilitzar la cadena amb sentit de RNA, marcada amb el mateix sistema i la mateixa activitat específica.

Per la hibridació hem utilitzat el protocol descrit per Shivers i col. (1986) amb algunes modificacions. Breument, els ovaris i peces de cor es varen fixar amb 4 % de paraformaldehid en 0.1 M de tampó fosfats salí (PBS) a 4°C durant 12 hores, rentat dos cops en PBS durant una hora i immersos en 30 % de sucrosa en PBS a 4°C durant dues hores, congelats i tallats en un criostat Reichert-Jung. Les seccions obtingudes (de 8-10 μ m de gruix) varen montar-se en portes previament gelatinats i foren conservades a 30°C fins la seva utilització. El dia del experiment les seccions varen calentar-se a 37°C durant 10 min, hidratades amb 0.1 M de glicina en PBS durant 20 min, desproteïnitades amb 0,2 M HCl durant 10 min; postfixades amb 4% de paraformaldehid en PBS durant 20 min, rentades amb 0.1 M de glicina en PBS i acetilades en acètic anhidre/trietanolamina, pH: 8.0 durant 10 min. Posteriorment, es varen incubar en presència de la solució de prehibridació (1,2 M NaCl, 20 mM tris-HCl, 2x de la solució Denhardt's, 2 mM EDTA, 0.1 % RNA de llevat, 0.01% tRNA de Escherichia Coli, 0.1% pirofosfat inorgànic, 20 mM dietilpirocarbonat, 20 mM L-metionina, 0.04% DNA de salmó i 50% de formamida) en una cambra d'humitat a 48°C durant 2 hores. Per el pas d'hibridació, la sonda de RNA- S^{35} es va afegir a una solució idèntica complementada amb 20% de dextra sulfat. La barreja de tampó/sonda es va aplicar a les seccions, que es varen cobrir, segellar amb laca i incubar durant 12 hores a 48°C en una cambra d'humitat. Cada porta objectes va rebre 40 μ l del tampó de hibridació presentant $2 \cdot 10^6$ cpm de la sonda sense sentit (LPL5) o amb sentit (LPL3). Sempre es varen utilitzar seccions consecutives per cada sonda, per tal de que els resultats fosin el màxim de comparables. Després de la hibridació les seccions varen rentar-se tres vegades durant 60 min amb 0.1 x SSC, 0.05 % de pirofosfat sòdic inorgànic, 30 % de formamida a 42°C. Posteriorment es varen tractar amb ribonucleasa A (20 μ g/ml) durant 30 min a temperatura ambient i es varen rentar tres vegades amb les mateixes condicions anteriors. Després d'això les

seccions es varen hidratar amb 0.03 M d'acetat amònic en etanol i varen assecar-se al aire. Per l'autorradiografia els porta objectes es varen sucuar en l'emulsió Ilford G5, previament diluïda 1:1 en aigua, assecar a l'aire i guardar a 4° C de 5 a 20 dies. Les autorradiografies es varen revelar amb Kodak D-19 i tenyir amb hematoxilina-eosina. La visualització del senyal autorradiogràfic es va fer amb microscopia de camp clar i fosc en un microscopi Leits (Dialux). Les fotografies dels resultats obtinguts es presenten en camp clar, per tal de visualitzar l'estructura i distribució dels tipus cel·lulars del teixit i la mateixa àrea amb camp fosc per tal de observar la distribució del senyal autorradiogràfic.

Immunolocalització de la lipoproteïna lipasa

Per la immunolocalització s'han utilitzat anticossos policlonals obtinguts en conill, a partir de LPL purificada de llet de conill d'indies. Aquests anticossos identifiquen una banda senzilla per Western Blot en homogenats de teixit adipós i han estat previament utilitzats en immunoprecipitació per tal de estudiar la síntesi de LPL (Semb i Olivecrona, 1987) i per identificar clons que presenten síntesis de LPL en una llibreria genòmica de cDNA (Enerback i col., 1988).

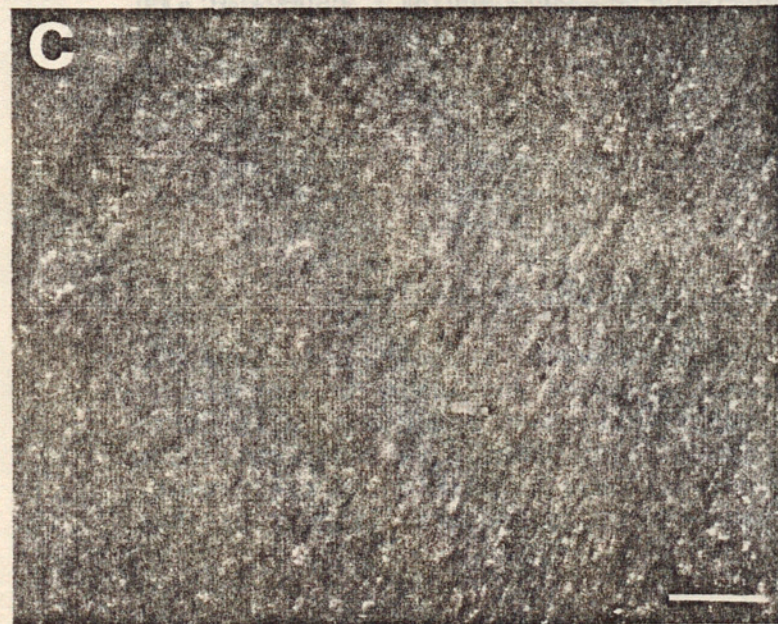
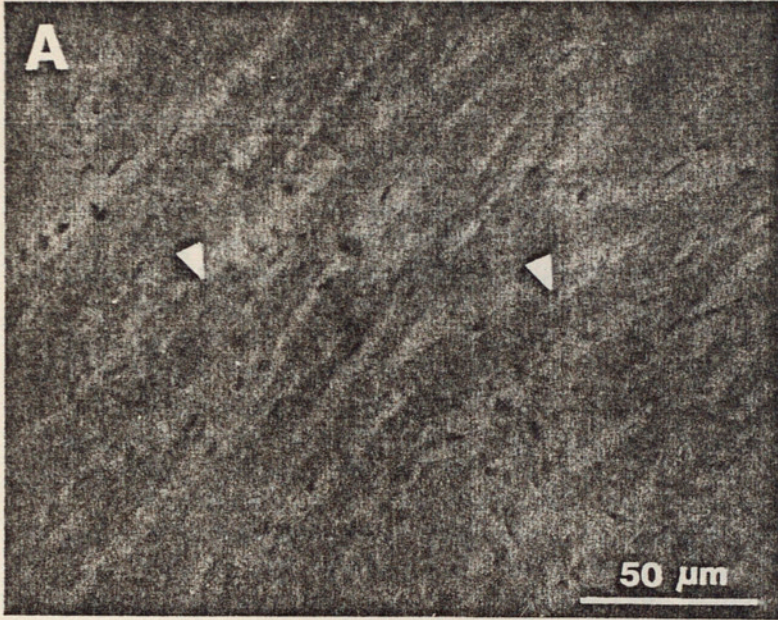
Per tal de que els resultats obtinguts en la hibridació "in situ" i l'immunolocalització fossin el màxim comparables, aquesta es va realitzar en seccions consecutives a les utilitzades per la hibridació. Per la localització de la proteïna es va utilitzar immunofluorescència indirecta (Vilaró i col., 1988). Les seccions es varen hidratar amb 0.1 M glicina en PBS, permeabilitzar en 1 % de tritó X-100 en 0.1 M glicina en PBS, rentar amb 0.1 % tritó X-100 en 0.1 M de glicina en PBS (tampó A), incubades amb anti-LPL o serum control en presència de 1 % de BSA durant 2 hores a temperatura ambient. Aleshores les seccions varen rentar-se amb tampó A i incubar amb IgG de cabra anti-conill conjugades amb FTIC en 1% de BSA en tampó A durant 2 hores a temperatura ambient. Després es varen rentar i el montatge es va fer amb 5% de n-propil galleate en 70 % de glicerol tamponat. La immunotinció es va visualitzar i fotografiar en microscopi Zeiss Axioplan.

Figura 1.

Hibridació "in situ" amb la cadena marcada amb S³⁵ del R A sense sentit (A i B) i amb sentit (C) en crioseccions de cor de conill d'indies.

Els panels A (camp clar) i B (camp fosc), mostren que el senyal autorradiogràfic (punts brillants en B) es localitza en l'endocardi. El senyal es troba concentrat sobre el citoplasma dels miocits (fletxes).

El panel C (camp fosc), mostra la hibridació obtinguda amb la cadena amb sentit. El marcatge obtingut és baix i homogeni i cal interpretar-lo com no específic.



RESULTADOS
El presente estudio se realizó en el laboratorio de Anatomía Histológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Santiago, Chile.
Materiales y Métodos
Se utilizaron ratones de la raza Wistar-Kyoto, machos, de 4 semanas de edad, con un peso promedio de 25 g. Los animales fueron mantenidos en condiciones de laboratorio controladas (temperatura de 22 ± 2°C, humedad relativa de 50-60%, ciclo de luz de 12 h).
Los animales fueron sacrificados por asfixia con gas cloroformo. Los órganos fueron fijados en formalina al 10% durante 24 h. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de rutina y se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina (H&E) para la observación de la morfología general de los tejidos.
Los cortes de tejido fueron montados en portaobjetos y cubiertos con una capa fina de resina de montaje. Posteriormente, se realizaron cortes ultrafinos (1 μ m) de las áreas de interés y se realizaron tinciones con uranio acetato y plomo citrato para la observación de la ultraestructura.
Los cortes ultrafinos fueron montados en grillas de cobre y observados en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) modelo JEM-100B, operando a 100 kV. Las imágenes fueron capturadas en película fotográfica y procesadas digitalmente para mejorar el contraste y la resolución.
Los resultados se expresan como la presencia o ausencia de determinadas estructuras, así como su morfología y distribución en los tejidos estudiados.
Los datos obtenidos se expresan en forma de porcentajes y se analizaron estadísticamente con el test de chi-cuadrado.
Los resultados se expresan en forma de porcentajes y se analizaron estadísticamente con el test de chi-cuadrado.
Los resultados se expresan en forma de porcentajes y se analizaron estadísticamente con el test de chi-cuadrado.

RESULTATS.

Localització del mRNA de la LPL en cor.

El cor presenta una alta taxa de síntesi de LPL (Enerback i col., 1988). Per això varen utilitzar aquest teixit com a control positiu de l'hibridació "in situ". Els resultats obtinguts es presenten en la Figura 1. Es pot veure que la expressió gènica de la LPL es troba localitzada en el miocardi (Fig. 1a-1b) i que són els miocits els responsables d'aquesta síntesi, a més el senyal autorradiogràfic es concentra en àrees citoplasmàtiques perinuclears. Contràriament al que s'esdeu en el miocardi, l'endocardi no presenta un senyal significatiu per la sonda utilitzada (Fig. 1a-b). Quan s'utilitza la cadena amb sentit com a sonda d'hibridació (Fig. 1c) no es detecta cap tipus de distribució específic del senyal i la que es detecta cal interpretar-la com a soroll de fons degut, a l'emulsió o bé a l'unió inespecífica de la sonda utilitzada.

Localització del mRNA de la LPL en ovaris.

Quan la cadena sense sentit de RNA de la LPL (LPL5) es va hibridar en seccions de ovari de conill d'índies, va detectar-se un senyal significatiu en algunes regions, que queden reflectides en les Figures 2a, 2b i 3. Els nivells de senyal inespecífic varen detectar-se mitjança l'utilització de la cadena amb sentit, que presenta una seqüència idèntica al mRNA endògen de la LPL. Quan es va utilitzar aquesta sonda, només va detectar-se un senyal de fons homogènea en tota la secció del ovari, sense presentar cap tipus d'especificitat (Fig. 2c).

La presència del mRNA de la LPL fou detectada en regions corticals del ovari, principalment associada a cèl.lules que envolten els folicles en creixement (Fig 3a-b), presumiblement es corresponent a cèl.lules foliculars de la teca. Contràriament, les cèl.lules granuloses dels diferents estadis de maduració dels folicles foren negatives a l'hibridació (Fig 3a-b i resultats no presentats). També va detectar-se un senyal específic en cèl.lules del cos luti, principalment en cèl.lules granuloses (Fig 3a-b i 4c-d) i de la teca (Fig 4e-f). En algunes ocasions va ésser possible d'observar que cèl.lules positives en l'hibridació presenten inclusions lipídiques en el seu citoplasma, suggerint que són productores de hormones esteroidals. No es va detectar cap tipus de senyal positiva en les cèl.lules endotelials de capilars i grans vasos sanguinis, en tot l'ovari (Fig 3c-d).

Localització immunocitoquímica de la LPL en ovaris.

La immunoreactivitat als anticossos anti-LPL detectada per immunofluorescència fou present en àrees corticals dels ovaris de conill d'índies (Fig. 4a) majoritàriament associada a la xarxa vascular (Fig. 4a i c). L'immunofluorescència va ésser detectada en capilars i cèl.lules que envolten els folicles en creixement, però no en les cèl.lules granuloses foliculars (Fig. 4b). Una

reacció molt intensa va detectar-se en capilars i cèl.lules de les capes granulars (Fig 4d) i de la teca (Fig. 4e) del cos luti. L'especificitat de la immunofluorescència obtinguda va estudiar-se mitjança l'incubació de seccions consecutives amb sèrum preimmune. El patró del soroll de fons obtingut amb aquest sèrum (Fig 4f) fou clarament molt més baix que l'obtingut amb l'anti-LPL (Fig 4a fins 4e).

Figura 2.

Hibridació "in situ" amb la cadena marcada amb S^{35} del RNA sense sentit (A i B) i amb sentit (C) en crioseccions de ovari de conill d'indies.

Els panels A (camp clar) i B (camp fosc), mostren quel senyal autorradiogràfic (punts brillants en B) es localitza en les cèl.lules granulars dels cos luti. El senyal es troba concentrat sobre el citoplasma de les cèl.lules granulars (fletxes).

El panel C (camp fosc), mostra la hibridació obtinguda amb la cadena amb sentit. El marcatge obtingut és baix i homogeni i cal interpretar-lo com no específic.

Barra : 50 μ m

Figura 3.

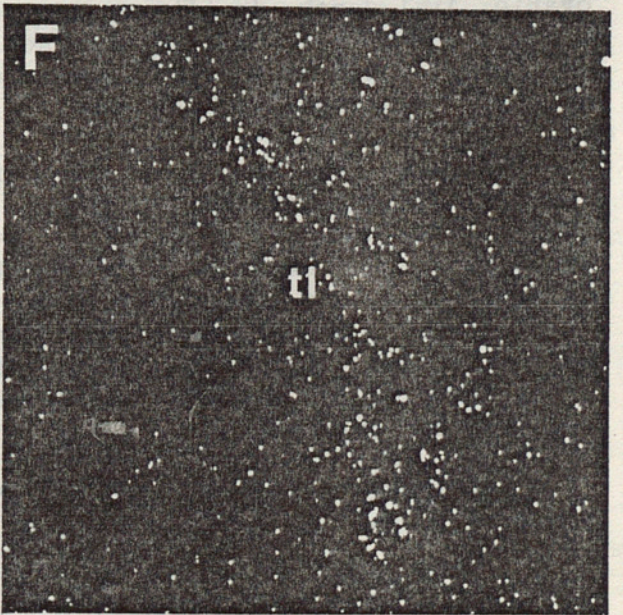
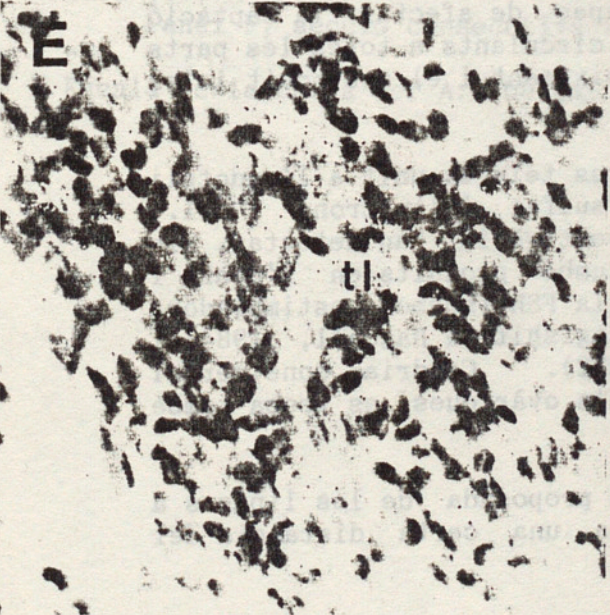
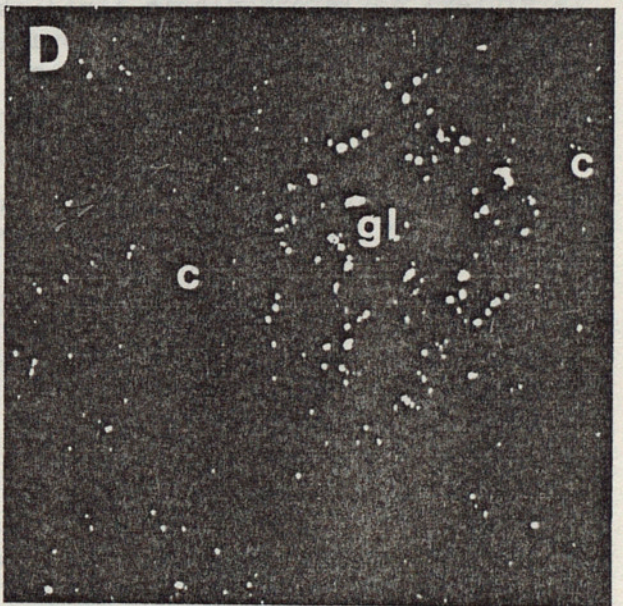
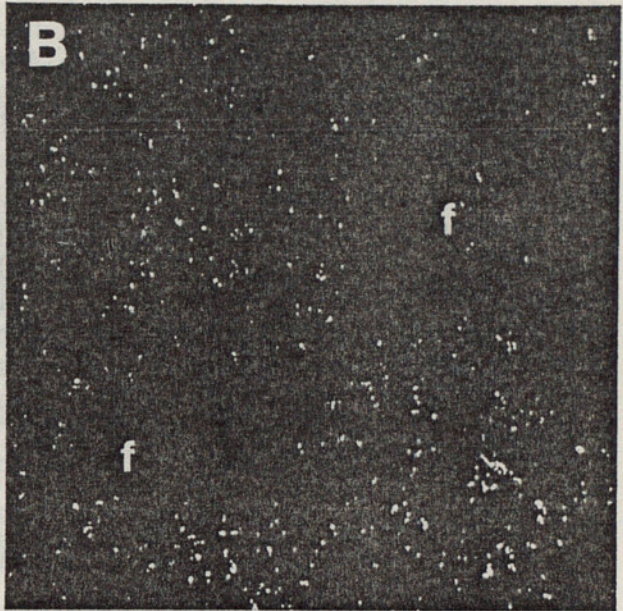
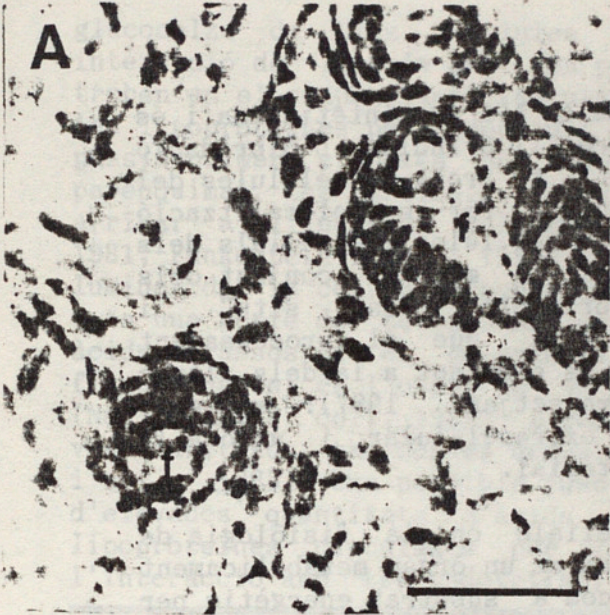
Resultats de la hibridació "in situ" amb la cadena sense sentit en diferents regions de l'ovari de conill d'indies. Els panels de la dreta son fotografies en camp clar de les mateixes àrees presentades en els panels de l'esquerra en camp fosc.

Els panels A i B, corresponen a la regió cortical de l'ovari. El senyal específic es localitza sobre cèl.lules de la perifèria dels folicles primars (f). Notis l'absència de marcatge en les cèl.lules granuloses del folicle.

Els panels C i D, corresponen a la regió granulosa del cos luti. El senyal es localitza en cèl.lules granulars (gl) i no en les cèl.lules endotelials que formen els capilars (c).

Els panels E i F, corresponen a la capa luteica que envolta el cos luti. El senyal es troba concentrat sobre cèl.lules de la periferia (tl).

Barra: 50 μ m.



DISCUSSIO

En aquest treball demostrem que la LPL és sintetitzada i és possiblement funcional en ovaris de conill d'indies. L'hibridació "in situ" mostra que el mRNA de la LPL es troba en cèl.lules del cos luti i també de la pared folicular. Per immunolocalització l'enzim LPL es detecta associat a les cèl.lules endotelials dels capilars i de arterioles i venules. A més El conjunt dels resultats obtinguts en l'hibridació "in situ" i l'immunolocalització posen de manifest que el processament cel.lular de la LPL en els ovaris és semblant a la dels altres teixits (per revisió vegeu, Borensztjan, 1987): síntesi, transport, alliberació a l'espai extracel.lular i unió a la membrana luminal de la cèl.lula endotelial.

El paper de les lipases endotelials en la fisiologia de l'ovari es molt poc coneguda. L'ovari es un òrgan metabòlicament molt actiu i precisa d'àcids grassos com a substrat energètic per la síntesi de intermediaris lipídics, i colesterol per la síntesi d'hormones. En aquest sentit l'ovari de rata es altament depenent de l'oxidació d'àcids grassos per la formació d'ATP, creixement i esterogènesi (Tan i Robinson, 1981).

Paral·lelament al creixement del folicles preovulatoris, s'acumulen inclusions lipídiques en la capa avascular granulosa (Turkey i col., 1984). Això indica que el transport de lípids des de les lipoproteïnes circulants por ser vital no només pel metabolisme de les cèl.lules granuloses, sino també pel creixement de l'oocit, tal com ho suggerix Benson i col., 1975. Durant aquest període l'oocit incrementa el seu metabolisme. Així doncs una funció important de les lipases endotelials pot ésser la captació dels àcids grassos de les lipoproteïnes per les cèl.lules ovàriques. El nostre treball demostra que la LPL és sintetitzada primàriament en cèl.lules de la pared dels folicles en creixement, que estan altament vascularitzades. L'immunofluorescència evidencia que l'enzim LPL es troba en alevades quantitats en l'endoteli vascular de tot el cortex ovàric. Així doncs, la LPL por ser, capaç de afectar la captació d'àcids grassos de les lipoproteïnes circulants a totes les parts de l'ovari incloent el folicle en creixement i el seu oocit i les cel.lules granuloses avasculares.

L'enzim LPL es troba en altres teixits unit a l'endoteli vascular mitjança cadenes d'heparan sulfat (Olivecrona i col., 1977). Tal com varis grups d'investigació han detectat, els proteoglicans de heparan sulfat són també produïts en l'ovari i la seva producció està regulada per la FSH (hormona estimuladora del folicle) (Lenz i col., 1982; Yanagishita & Hascall, 1984) i per el calci (Lenz i col., 1982). Caldria coneixer si l'expressió de les lipases endotelials ovàriques es troba també regulada per hormones.

Un aspecte important de l'unió proposada de les lipases a l'endoteli, és que situa l'enzim a una certa distància del

glucocalze de les cèl.lules endotelials. Això facilita la interacció de l'enzim amb les partícules lipoproteïques que es troben en el compartiment vascular. La utilització dels lípids de les lipoproteïnes per endocitosi de les partícules, requereix que passin primer a través de l'endoteli per arribar a la cèl.lula parenquimal. Les partícules lipoproteïques son massa grans per arribar a l'interior del compartiment ovàric (Strauss i col., 1981; Funkestein i col., 1984). Les lipases unides a la cara luminal de la cèl.lula endotelial poden ser el primer pas, de tota una sèrie de mecanismes necessaris per la captació dels àcids grassos i el colesterol per les cèl.lules ovàriques. El fluxe sanguini en l'ovari és un dels més alts de l'organisme (Norjavaara i col., 1987) i cada cèl.lula lutèica està altament vascularitzada, tal com es demostra morfomètricament (Dharmarajan i col., 1985). Una possible funció per això és el suministrament d'elevades quantitats d'àcids grassos i colesterol de les lipoproteïnes circulants per la esterogènesi cèl.lular, via l'interacció amb LPL endotelial.

Figura 4.

Distribució de la lipoproteïna lipasa en crioseccions d'ovari de conill d'indies detectada per immunofluorescència indirecta.

Panel A, distribució general de la LPL en la regió cortical (c). La fletxa marca la immunofluorescència en una artèria cortical. Ta, túnica albugínea, f, folícul.

Panel B, Regió cortical observada a més grans augments. La immunofluorescència es troba en la perifèria dels folícles primaris (f) en part associada a capilars (c).

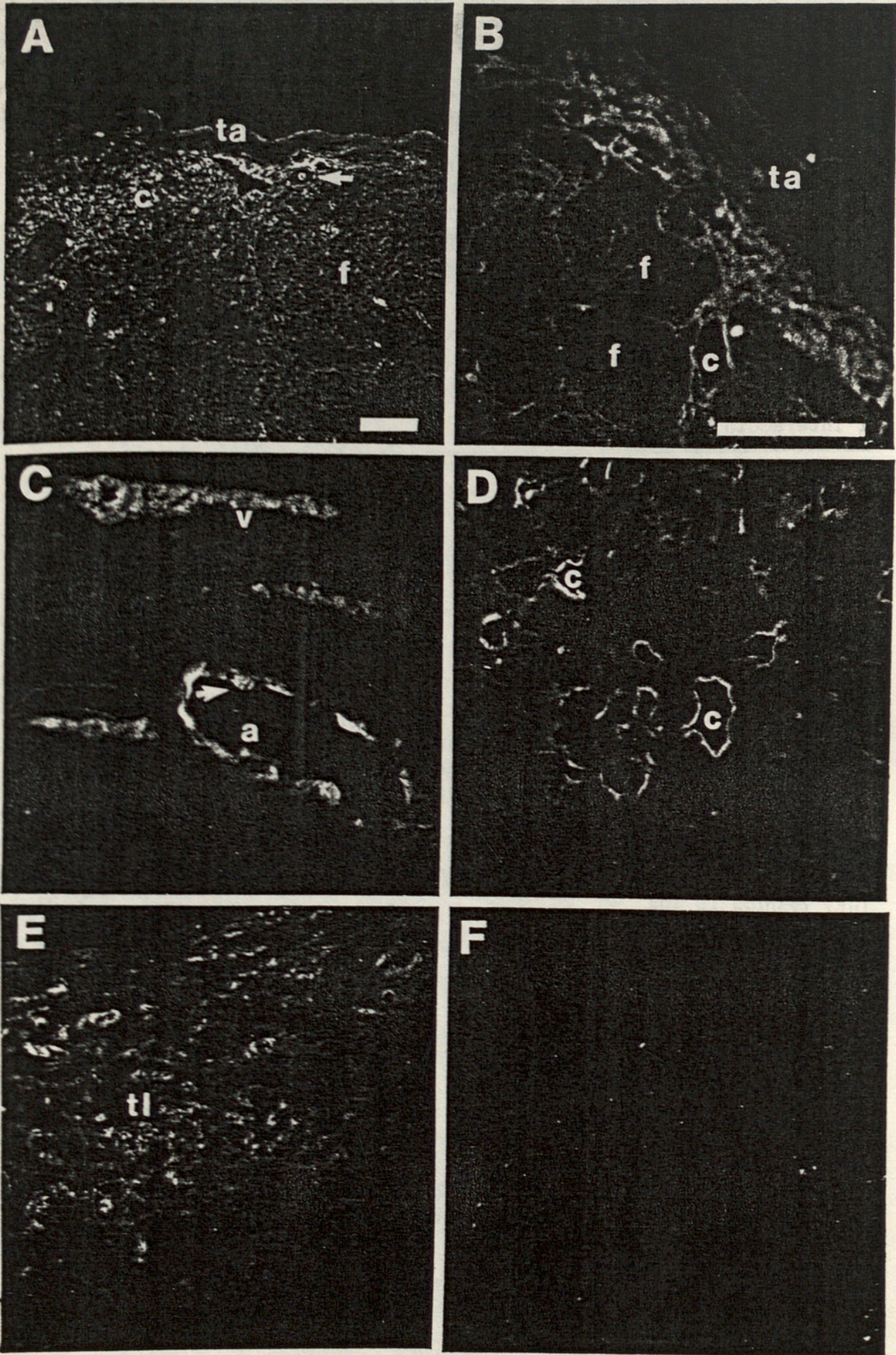
Panel C, immunofluorescència en artèries (a) i venes (v) del córtex ovàric. El marcatge es present en cèl.lules endotelials (fletxa).

Panel D. Immunofluorescència en la capa granular del cos luti, associada a la red capilar (c).

Panel E, Immunoreacció en les cèl.lules de la teca del cos luti (tl).

Panel F, secció consecutiva incubada amb sèrum preimmune.
rum.

Escala de la barra per A: 100 μm , de B a F: 50 μm .



BIBLIOGRAFIA

- Bamberger, M., Lund-Katz, S., Phillips, M.C. & Rothblat, G.H. (1985) Mechanism of the hepatic lipase induced accumulation of high-density lipoprotein cholesterol by cells in culture. *Biochemistry* 24:3693-3701.
- Benson, J.D., Bensadoun, A. & Cohen, D. (1975) Lipoprotein lipase of ovarian follicles in the domestic chicken (*Gallus Domesticus*). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:347-350.
- Borensztajn, J. (ed) (1987) *Lipoprotein lipase*. Evener Publishers, Inc. Chicago.
- Dharmarajan, A.M., Bruce, N.W. & Meyer, G.T. (1985) Quantitative ultrastructure characteristics relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of the pregnant rat. *Anat. Rec.* 172:87-99.
- Enerback, S., Semb, H., Bengtsson-Olivecrona, G.; Carlsson, P. Hernansson, M-L. Olivecrona, T. & Bjursell. (1988). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding lipoprotein lipase in guinea pig. *GENE* 58:1-12.
- Funkenstein, B., Waterman, M.R. & Simpson, E.R. (1984) Induction of synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin by follicle-stimulating hormone, 8-bromo-cyclic AMP, and low density lipoprotein in cultured bovine granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 259:8572-8577.
- Jansen, H. i Hülsmann, C. (1980) Heparin-releasable (liver) lipase(s) may play a role in the uptake of cholesterol by steroid-secreting tissue. *TIBS*, october, pp.265-268.
- Komaromy, M. C. & Schotz, M. C. (1987) Cloning of rat hepatic lipase cDNA: evidence for a lipase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1526-1530.
- Lenz, R.W., Ax, R.L. & First, N.L. (1982) Proteoglycan production by bovine granulosa cells in vitro is regulated by calmodulin and calcium. *Endocrinology* 110:1052-1054.
- Norjavaara, E., Olofsson, J., Gafvels, M & Seltam, G. (1987). Redistribution of ovarian blood flow after injection of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone in the adult rat pseudopregnant rat. *Endocrinology* 120:107-114.
- Olivecrona, T., Bengtsson, G., Marklund, S.-E., Lindahl, U. & Hk, M. (1977) Heparin-lipoprotein lipase interactions. *Fed. Proc.* 36:60-65.
- Semb, H. i Olivecrona, T (1987) Mechanisms for turnover of lipoprotein lipase in guinea pig adipocytes. *Biochim. Biophys.*

Acta 878:330-337.

Shivers, B. D., Schachter, B. S., & Pfaff, D. W. (1986). In situ hybridization for the study of gene expression in the brain. *Methods Enzymol.*, 124, 497-510.

Strauss, J.F., Schuler, L.A., Rosenblum, M.F. & Tanaka, T. (1981) Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv. Lipid Res.* 18:99-157.

Tan, C.H. & Robinson, J. (1981) Effect of 2-bromopalmitate on LH-stimulated ovarian steroidogenesis. *IRCS Med. Sci.* 9:647-648.

Tuckey, R.C., Lee, G., Costa, N.D. & Stevenson, P.M. (1984) The composition and distribution of lipid granules in the rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 38:187-195.

Vilaro, S., Llobera, M., Bengtsson-Olivecrona, G. & Olivecrona, T. (1988) Synthesis of lipoprotein lipase in the liver of newborn rats and localization of the enzyme by immunofluorescence. *Biochem. J.* 249:549-556.

Yanagishita, M. & Hascall, V.C. (1984 a) Proteoglycans synthesized by rat ovarian granulosa cells in culture. Isolation, fractionation, and characterization of proteoglycans associated by the cell layer. *J. Biol. Chem.* 259:10260-10269.

Wion, K. L.; Kirchgessner, T. G., Lusic, A. J., Schotz, M. C. & Lawn, R. M. (1987) Human lipoprotein lipase complementary cDNA sequence. *Science* 235:1635-1641.