

소의 난소주기 동안 과립막세포와 황체조직에서 단백질 패턴의 변화

송은지¹ · 이용승¹ · 이상희¹ · 유한준¹ · 박정준² · 정희태³ · 양부근¹ · 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²명품한우 컨설팅, ³강원대학교 수의과대학

Change of Protein Patterns in Granulosa Cells and Corpus Luteum during the Ovarian Cycle in Cows

Eun-Ji Song¹, Yong-Seung Lee¹, Sang-Hee Lee¹, Han-jun Yoo¹, Joung-Jun Park²,
Hee-Tae Cheong³, Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{1,*}

¹College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Myung-poom Hanwoo Consulting, Hoengseung 225-808, Korea

³College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the changes of protein patterns in granulosa cells and corpus luteum in ovaries during the estrus cycle in cows. The estrus cycle was divided into five steps of follicular, ovulatory, early-luteal, mid-luteal and late-luteal phases. In results, 61 spots of total 85 spots were repeated on follicular phase and 51 spots of total 114 spots were repeated on ovulatory phase. The 40 spots of total 129 spots were repeated on early-luteal phase and 49 spots of total 104 spots were repeated on mid-luteal phase. Also 41 spots of total 60 spots were repeated on late-luteal phase. On the other hands, the 16 spots were indicated difference in follicular phase and ovulation phase had a difference 10 spots. It was showed difference No. 103 spot in ovulation phase, No. 135 spot in early-luteal phase and No. 175 and 176 spots in mid-luteal phase. Also, the 11 spots were expressed specifically in mid-luteal phase and No. 178 and 179 spots were difference of expression in late-luteal phase. We confirmed that there were 7 spots for ovulation, 4 spots for luteinization and 2 spots for luteolysis. Spot No. 89~93 in ovulation phase were transferrin, and spot No.94~98 were HSP60. Spot No. 103 was Dusty PK, spot No. 135 was OGDC-E2, and spot No. 175 and 176 were Rab GDI beta from luteinization. Spot No. 178 and 179 in luteolysis were vimentin. This results suggest that will be help to basic data about infertility.

(Key words : 2-DE, Granulosa cells, Corpus luteum, Ovarian cycle, Cows)

서 론

일반적으로 성성숙에 도달한 소의 난소는 발정주기 동안 난포의 성장과 퇴화를 반복하며(Rajakoski, 1960), 발정주기 전 기간에 걸쳐 난포가 성장하는데, 소는 매 발정주기마다 2회의 난포발육과가 황체기에서 단계적으로 발현되어 발육난포를 계속 보충한다는 보고가 있다(Rajakoski, 1960). 난포발육과에 의해 다수의 난포가 발육을 시작하지만, 그 가운데 1개 또는 2개의 난포만이 우세난포로 선정되어 발육이 계속되고, 나머지 난포는 발육이

정지되어 폐쇄된다(Sirois와 Fortune, 1990). 소에서는 황체기에 7일을 주기로 난포발육과가 나타나며, 난포가 발달하여 그 직경이 5 mm 이상에 이르고(Scaramuzzi 등, 1980), 황체가 퇴행되기 직전에 발현된 난포발육과에서 배란이 일어난다. 난포에서 배란이 일어나면 난포로부터 일시적으로 황체가 형성된다. 황체는 초기 임신의 설립과 유지에 필수적이며, 임신이 되지 않으면 황체는 퇴화를 일으켜 발정휴지기의 난포를 정상적인 발정이 일어나도록 한다.

발정주기에서 난소의 형태학적인 변화는 크게 세 단계로 나누어 볼 수 있는데, 배란되기 전까지의 난포내 과립

* 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(Grant No. 109007-3)의 지원에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-33-252-8689, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

막세포의 형태와 황체기의 황체조직 그리고 황체퇴행기의 백체이다. 난포의 과립막 세포는 스테로이드 호르몬을 분비하는 주요 장소이며, 난포기에서 황체기에 도달할 때까지 형태적으로 많은 변화를 나타내는 세포이다. 배란이 일어난 후에 과립막세포는 그 형태를 황체조직으로 변화시키고, 임신에 실패하면 황체조직은 체계적으로 퇴화가 일어난다. 이러한 과정에 스테로이드 호르몬이나 각종 단백질들이 영향을 미칠 것으로 생각된다. 또한, 이전의 연구에서 스테로이드 호르몬뿐만 아니라, 국소적으로 분비되는 몇 가지 cytokine에 의해 조절된다는 사실이 보고되었다(Okuda와 Sakumoto, 2003).

따라서 본 연구는 소의 발정주기에 따른 난소의 형태학적 변화에 영향을 미치는 단백질의 변화를 분석하고자 난소 내 과립막세포와 황체조직 및 황체퇴행기의 백체에서 유래한 각각의 단백질을 분석하여 황체의 발달과 퇴행에 대한 이해를 돕고자 하였다.

재료 및 방법

난포기 세포와 황체기 조직의 준비

인근 도축장에서 도축된 소의 난소를 4°C에서 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 주기별로 난포기, 배란기, 황체발달기, 황체기, 황체퇴행기(Fig. 1)로 나누어 난포기와 배란기에서는 난포 내 난포액을 제거하고, 과립막세포를 1.5 ml 튜브에 회수하였고, 황체발달기와 황체기 그리고 황체퇴행기의 조직을 1.5 ml 튜브에 수집하여 실험에 사용되기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

과립막세포와 황체조직은 이차원 전기영동에 사용하기 위해 생체조직분쇄기(TISSUE HOMOGENIZER, USA)를 이용하여 균질화한 후, Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER, Thermo, USA)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 clean-up kit (Amersham Biosciences, USA)을 이용해 정제한 후 Bradford method를 이용하여 총 단백질량이 750 µg/µl가 되도록 정량하여 300 µl의 Rehydration buffer (GE Healthcare, Sweden)를 넣었다. 단백질이 용해된 rehydration buffer를 18 cm, pH 3~11 NL Immobiline DryStrip (GE Healthcare, Sweden)을 이용하여 20°C에서 16시간 동안 흡수시켰다.

이차원 전기영동

Isoelectric Focusing (IEF)는 Protean IEF cell (Bio-Rad, USA)을 이용하여 hold 500 V에서 1시간, gradient 1,000 V에서 1시간, gradient 8,000 V에서 3시간, hold 8,000 V에서 1시간 30분, gradient 10,000 V에서 3시간 및 hold 10,000 V에서 1시간으로 순차적으로 총 10시간 30분 동안 수행하였다. IEF가 끝난 Drystrip은 먼저 equalization buffer [1.5 M Tris (pH 8.8), urea, glycerol, SDS, DDW] 5 ml에 1,4-dithiothreitol (DTT) 0.08 g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 반응시킨 후, equalization buffer 5 ml에 Iodoacetamide (IAA) 0.1 g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 평형시켰다. SDS-PAGE는 10%

acrylamide gel을 사용하였고, Protean II xi 2-D cell (Bio-Rad, USA)을 이용하여 150 V에서 10분 및 50 mA로 6시간 30분 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 CBB (Comassie Brilliant Blue R-250, Sigma, USA)를 이용하여 시각화하였고, 육안으로 검토한 후 이미지 분석 프로그램인 Melanie 7 (GE Healthcare, Sweden)을 이용하여 분석하였으며, 각각의 실험은 5반복하였다.

단백질 동정

Gel에서 떼어낸 조각을 destaining 하기 위해 50% ACN, 25 mM NH₄ bicarbonate를 400 µl씩 분주하여 15분 동안 침지시켜 상층액을 제거하는 과정을 3회 반복한 뒤, 50% ACN, 10 mM NH₄ bicarbonate를 40 µl씩 분주하여 15분 동안 침지시킨 후 상층액을 제거하였다. Gel을 건조시키기 위해 100% ACN에 5분 동안 침지 후, ACN을 제거하고, 20~30분 동안 speed-vac을 실시하였다. 건조시킨 gel에 cold trypsin solution[NH₄ bicarbonate (pH 8.8), promega sequencing grade modified trypsin 20 µg/µl] 20 µl를 넣고, 37°C에서 20시간 동안 배양하였다. 그 후, gel 조각을 50% ACN과 5% TFA를 20 µl씩 분주하여 침지시킨 후 실온에서 50분 동안 배양하여 상층액을 회수하는 과정을 3번 반복하여 peptides를 추출하여 수집하였다. Peptides가 용해되어 있는 용액을 speed-vac을 이용하여 1~2시간 동안 건조시킨 후, peptides는 0.1% TFA 및 acetonitrile 혼합액과 0.1% TFA, acetonitrile, 물 혼합액으로 Zip-Tip (Zip-Tip C18, Millipore, USA)을 세척하였고, 0.1% TFA와 물 혼합액으로 Zip-Tip을 평형시킨 후, 0.1% TFA 10 µl에 녹인 시료를 pipetting하여 빠르게 Zip-Tip을 통과시켜 resin으로 시료를 붙게 하였다. 그 이후 0.1% TFA, 물의 혼합액으로 Zip-Tip을 세척하였고, Zip-Tip으로부터 시료를 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (0.3% TFA, 50% acetonitrile) 1.8 µl에 용해하여 MALDI-TOF/MS에 이용하였다.

MALDI-TOF/MS는 applied biosystems voyager system 4372를 이용하여 실시하였으며, 모든 결과는 matrix로 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid를 이용하여 reflector-positive mode로 얻었다. 또한, MALDI-TOF/MS를 통해 얻어진 스펙트럼은 MASCOT program으로 NCBI에서 database를 검색하였다.

결 과

난포기에서는 총 85개의 spots을 확인하였고, 그 중 62개의 spots이 재현성을 보였다. 배란기와 비교하였을 때 난포기에서는 43~52번 10개의 spots과 53, 56, 62~65번 총 16개의 spots이 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 배란기에서는 총 114개의 spots이 확인되었고, 그 중 51개의 spots이 재현성을 보였으며, 난포기와 비교하였을 때, 89~98까지 총 10개의 spots이 새롭게 확인되었다(Fig. 1B).

Fig. 2는 배란기와 황체발달기 및 황체기에서의 단백질

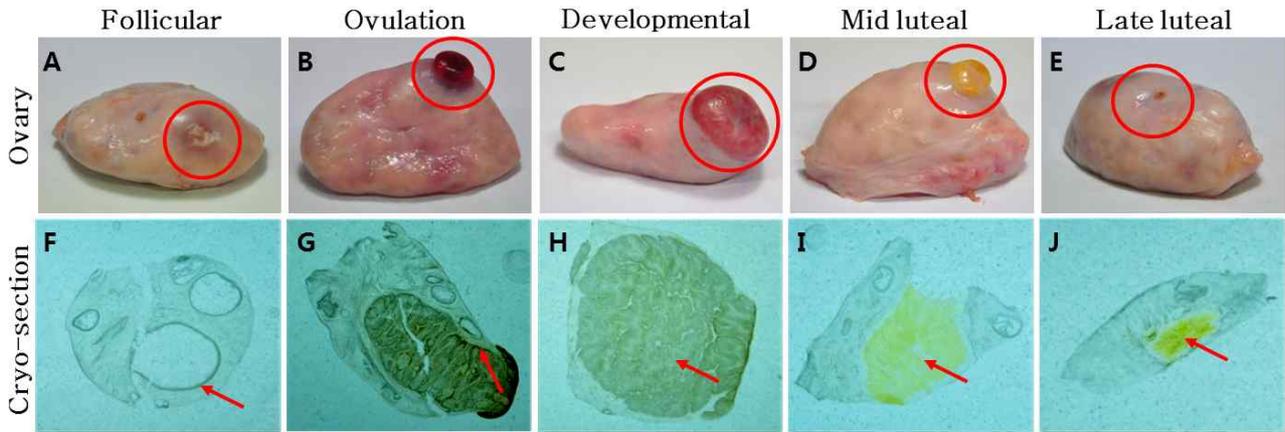


Fig. 1. The image of bovine ovaries on different stages of the estrous cycle.

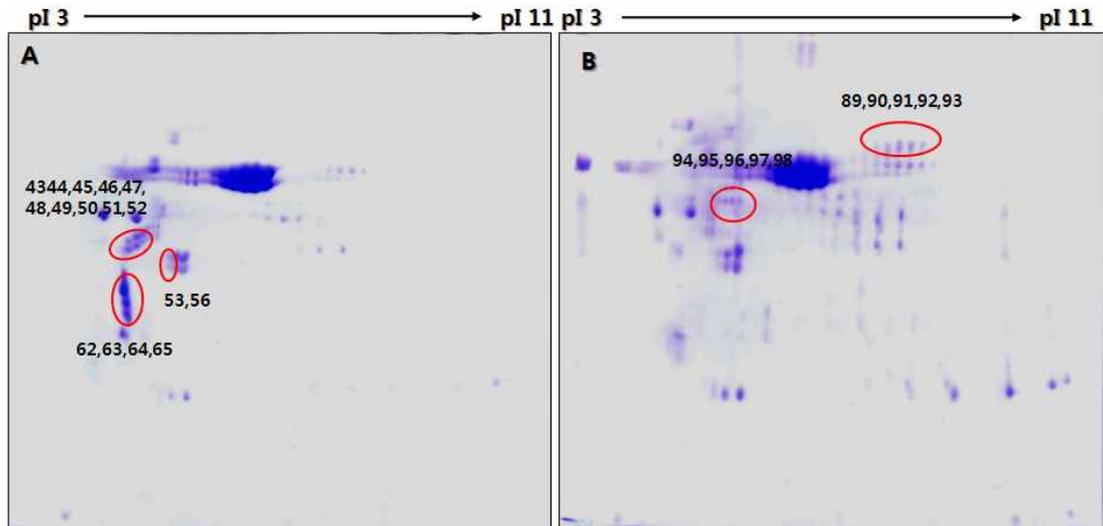


Fig. 2. 2-DE master images of protein isolated from follicular (A) and ovulation phase (B) of bovine ovaries.

변화를 나타냈으며, 다른 두 주기와 비교하였을 때 배란기에서는 103번 spot이 차이를 보였다(Fig. 2A). 황체발달기는 총 129개의 spots이 확인되었고, 이 중 40개의 spots만이 재현성을 보였으며, 다른 두 주기와 비교하였을 때 135번 spot이 차이를 보였다(Fig. 2B). 또한, 황체기에서는 총 104개의 spots을 확인하였으며, 이 중 49개의 spots이 재현성을 보였다. 황체기에서만 특이적으로 발현한 spots은 175번 및 176번이었다(Fig. 2C).

황체기와 황체퇴행기를 비교하여 황체퇴행과정에서의 변화를 분석하기 위한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 황체퇴행기와 비교하여 황체기에서는 1, 2, 4, 5, 8~10번, 37, 38, 175번 및 176번의 11개 spots이 차이를 보였다(Fig. 3A). 황체퇴행기에서는 총 60개의 spots을 확인하였고, 이 중 41개의 spots이 재현성을 보였으며, 황체기와 비교하여 178번 및 179번 spots이 차이를 보였다(Fig. 3B).

각 실험구에서 재현성을 가진 spots 중 단백질의 발현

의 차이를 보인 spots을 선별하여 MALDI-TOF/MS와 NCBI database 검색을 이용하여 동정하였다. 난포기와 배란기를 비교하여 난포기에서 차이를 보인 43, 44, 45, 47, 49~53, 56, 62, 63, 64 및 65번 spots과 배란기에서 차이를 보인 89~98번 spots을 동정한 결과, 43~47, 49, 51, 53번 및 56번 spots은 vimentin으로 확인되었고, 50번 spot은 actin, aortic smooth muscle, 52번 spot은 ATP synthase subunit beta, 62번 63번 spots은 tropomyosin beta chain으로 확인되었다. 또한, 64번 spot은 tropomyosin alpha-1 chain, 65번 spot은 aspartyl-tRNA synthetase으로 확인되었으며, 89~93번 spots은 serotransferrin, 94~98번 spots은 60kDa heat shock protein(HSP-60)으로 확인되었다(Table 1).

한편, 배란기, 황체발달기 및 황체기를 비교하여 차이를 보인 103, 135, 175번 및 176번 spots을 동정한 결과, 103번 spot은 dual serine/threonine and tyrosine protein ki-

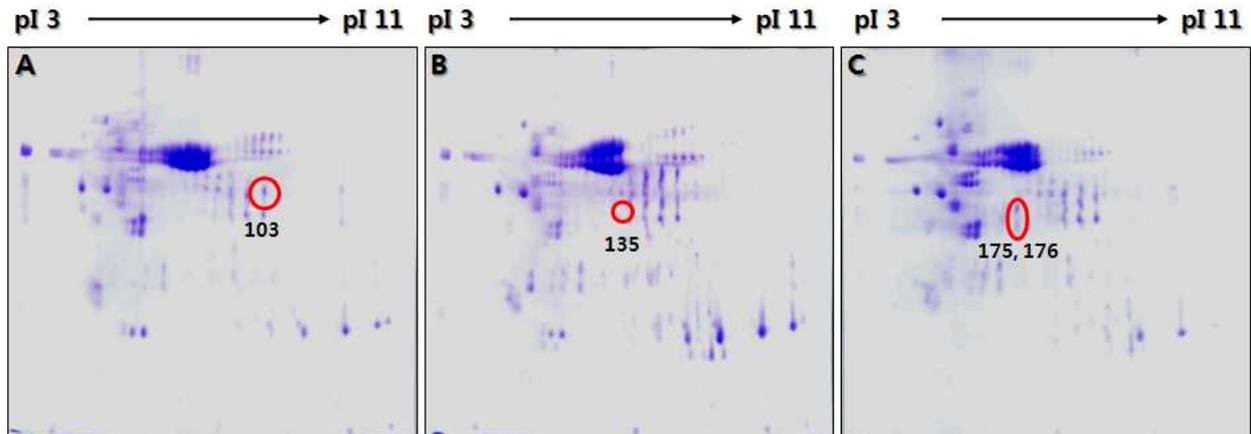


Fig. 3. 2-DE master images of protein isolated from ovulation (A), developmental (B) and mid-luteal phase (C) of bovine ovaries.

Table 1. Comparison of protein in follicular and ovulation phases of bovine ovaries

Phase	Spot No.	Protein name	Cov. (%)	Accession No.	MOWSE score	pI
Follicular	43~47, 49, 51, 53, 56	Vimentin	69.3	P48616	6.11e+21	5.1
	50	Actin, aortic smooth muscle	61.3	P62739	1.38e+14	5.2
	52	ATP Synthase subunit beta, mitochondrial	32.1	P00829	3.32e+18	5.1
	62, 63	Tropomyosin beta chain	52.5	Q5KR48	2.27e+8 6555	4.7
	64	Tropomyosin alpha-1 chain	23.6	Q5KR49	6555	6.4
	65	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	12.6	Q3SYZ4	6555	6.4
Ovulation	89~93	Serotransferrin	52.0	Q29443	6.50e+18	6.8
	94~98	60KDa heat shock protein, mitochondrial	40.0	P31081	1.28e+13	5.6

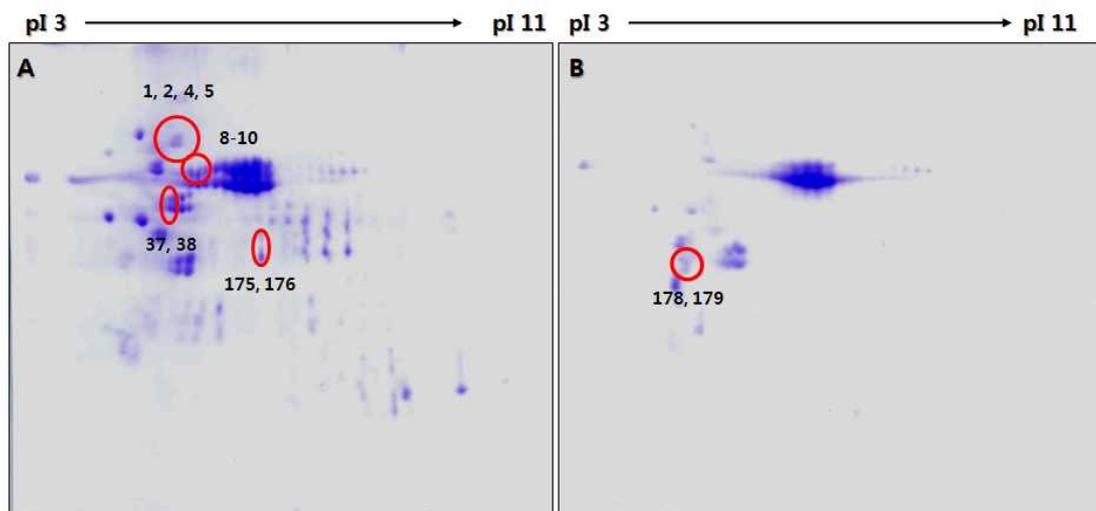


Fig. 4. 2-DE master images of protein isolated from mid-luteal phase (A) and last-luteal (B) of bovine ovaries.

Table 2. Comparison of protein in ovulation, developmental and mid luteal phases of bovine ovaries

Phase	Spot No.	Protein name	Cov. (%)	Accession No.	MOWSE score	pI
Ovulation	103	Dual serine/threonine and tyrosine protein kinase	3.4	Q4TVR5	1.39e+15	6.4
Developmental	135	Dihydrolypolylysine-residue succinyltransferase component of 20 oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	36.5	P11179	3.56e+12	9.1
Mid luteal	175,176	Rab GDP dissociation inhibitor	35.7	P50397	3.23e+8	5.9

Table 3. Comparison of protein in mid luteal and late luteal phases of bovine ovaries

Phase	Spot No.	Protein name	Cov. (%)	Accession No.	MOWSE score	pI
Mid luteal	1, 2, 4	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	37.5	Q3ZBT1	1.38e+14	5.1
	5	Heat shock protein HSP 90-alpha	16.6	Q76LV2	7.95e+6	4.9
	8, 9, 10	Heat shock cognate 71 kDa protein	42.6	P19120	5.40e+16	5.4
	37, 38	Vimentin	64.4	P48616	7.99E+18	5.1
	175, 176	Rab GDP dissociation inhibitor	35.7	P50397	3.23e+8	5.9
Late luteal	178, 179	Vimentin	62.9	P48616	7.99E+18	5.1

nase(Dusty PK)로 확인되었고, 135번 spot은 dihydrolypolylysine-residue succinyltransferase component of 20 oxoglutarate dehydrogenase complex(OGDC-E2)이며, 175번 및 176번 spots은 Rab GDP dissociation inhibitor(Rab GDI beta)로 확인되었다(Table 2).

황체기와 황체퇴행기에서 차이를 보인 spots 1, 2, 4, 5, 8~10, 37, 38, 175, 176, 178 및 179번 spots을 동정한 결과, 1, 2 및 4번 spots은 transitional endoplasmic reticulum ATPase(TER ATPase)로 확인되었고, 5번 spot은 heat shock protein HSP 90-alpha, 8~10번 spots은 heat shock cognate 71 kDa protein으로 확인되었다. 또한, 37번 및 38번 spots은 vimentin으로 확인되었고, 178번 및 179번 spots 또한 vimentin과 일치하였다(Table 3).

고 찰

본 연구는 발정주기 동안 소의 난소에서 과립막세포가 황체조직으로 변화하고, 황체조직이 퇴행하는 과정에서 단백질 발현의 차이를 분석하기 위하여 이차원 전기영동과 MALDI-TOF/MS를 실시하였다. 이차원전기영동을 통해 재현성을 보인 spots을 대상으로 실험군 간에 차이를 보인 36개의 spots을 분석 및 동정하여 15개의 단백질을 확인하였다.

본 연구의 결과에서 난포기에서만 발현된 43~37, 51, 53번 및 56번 spots은 vimentin과 일치하였는데, vimentin은 간엽세포에서 발현되는 중간섬유 단백질이다(Schweitzer와 Evans, 1998). Vimentin은 부신과 난소에서 스테로이드 합성에 관여하며, 쥐의 부신과 난소에서 vimentin이 스테로이드 호르몬 합성에 관여하는 것을 확인하였

다(Shen 등, 2012). 한편, 62, 63 및 64번 spots은 tropomyosin으로 모든 진핵생물에 존재하는 액틴 관련 단백질로, 예쁜꼬마선충의 생식계에서 배란 동안 근상피의 수축을 조절하는 필수적인 조절자로 보고된 바 있다(Kanako와 Shoichiro, 2004).

배란기에서만 발현된 spots은 7개로 단백질을 동정하여 2개의 단백질과 일치하는 것을 확인하였다. 89~93번 spots은 serotransferrin으로 확인되었는데, 이는 transferrin 계열의 단백질로 세포의 증식과 DNA 합성에 필수적이라는 보고가 있다(Robbins와 Pederson, 1970). 또한, 성인 여성과 설치류의 난소에서 난포의 성숙과 스테로이드 합성이 진행되는 것과 동시에 난포액의 증가에서 transferrin 농도의 증가를 확인하였다(Mantzavinos 등, 1993). 이러한 결과들로 볼 때, 배란기에서 transferrin은 계속되는 난포의 발달에 영향을 미쳐 배란기의 과립막세포가 황체조직으로 발달하는데 도움을 줄 것이라고 추측된다. 한편, 94~98번 spots은 HSP-60로 확인되었다. Heat shock protein(HSP) 단백질은 열 변성 단백질의 변성과 잘못된 접힘을 방지하고, 스트레스 반응에서 유전적 변이를 안정화시키고, 세포의 증식과 생존 그리고 세포사를 방지하는 기능을 한다(Alexander 등, 2011). 또한 돼지의 난소 세포에서 합성된다는 보고가 있으며, 과립막세포에서 뿐만 아니라 난포 전체에서 HSP의 존재가 확인되었고, 난포 전체에서 생산되지만 과립막세포에서 더 많은 양이 생산된다는 보고가 있다(Driancourt 등, 1999). 이러한 기능을 바탕으로 HSP 단백질은 열 스트레스로부터 배란기 난포를 보호하고, 난포발육에 도움을 줄 것으로 생각된다.

황체발달기에서만 발현된 spot은 135번으로 Dusty PK이고, 이 단백질은 세포사를 조절하는 기능을 한다고 알려져 있다(Peng 등, 2006). 황체기에서만 발현된 175 및

176번 spots은 Rab GDI beta으로 확인되었다. Rab GDI beta는 소낭 중간체로 세포의 이동을 조절한다(Bachner 등, 1995). 이는 배란 후에 세포의 이동을 용이하게 하여 과립막세포가 황체조직으로 발달하는데 도움을 줄 것으로 생각된다. 마지막으로 황체퇴행기에서만 발현된 spots은 178번 및 179번으로 spots을 동정하여 난포기에서 발현한 vimentin과 일치하는 것을 확인하였다.

결론적으로 배란기에서는 세포의 증식과 관련된 transferrin(89~93번)과 HSP60(94~98번) 단백질이 발현된 것을 알 수 있었다. 이는 계속해서 난포가 발육하는데, 이들 단백질이 관여하여 난포의 발육을 돕는다고 생각할 수 있다. 또한, 황체형성기에서 세포사를 조절하는 단백질(Dusty PK)과 succinyl-CoA를 촉매하는 단백질(OGDC-E2), 소낭 중간체로 세포의 이동을 조절하는 단백질(Rab GDI beta)들이 확인된 것 역시 난포내 과립막 세포의 성장이 계속되고 있음을 의미하고, 이들 단백질들이 과립막세포의 성장에 도움을 줄 것으로 생각되며, 세포사 조절을 하는 Dusty PK 단백질은 황체가 다 형성되고, 황체 퇴행기로 접어들기 직전에 발현된 것으로 생각된다. 마지막으로 황체퇴행기에서는 vimentin이 특이적으로 발현하였는데, 이는 스테로이드 호르몬을 합성하여 황체가 퇴행할 수 있도록 돕고, 또한 vimentin의 다른 기능인 세포를 부착시켜 황체 세포가 융해되는 것을 도울 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 발정주기에서 소 난소의 과립막세포와 황체조직의 변화에 따른 단백질들의 변화를 확인할 수 있었고, 연구 결과를 바탕으로 향후 비정상적인 발정주기에 대한 치료 또는 불임 연구에 있어 유용한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

단백질의 추출과 분석에 있어 강원대학교 동물자원공동연구소에 도움을 받았습니다.

인용문헌

- Alexander V Sirotkin, Miroslav Bauer (2011): Heat shock proteins in porcine ovary: synthesis, accumulation and regulation by stress and hormones. *Cell Stress and Chaperones* 16:379-387.
- Bächner D, Sedlacek Z, Korn B, Hameister H, Poustka A (1995): Expression patterns of two human genes coding for different rab GDP-dissociation inhibitors (GDIs), extremely conserved proteins involved in cellular transport. *Hum Mol Genet* 4:701-708.
- Driancourt MA, Guet P, Reynaud K, Chadli A, Cattelli MG (1999): Presence of an aromatase inhibitor, possibly heat shock protein 90, in dominant follicles of cattle. *J Reprod Fertil* 115:45-58.
- Kanako Ono, Shoichiro Ono (2004): Tropomyosin and troponin are required for ovarian contraction in the *Caenorhabditis elegans* reproductive system. *Mol Biol Cell* 15: 2782-2793.
- Mantzavinos T, Dalamanga N, Hassiakos D, Dimitriadou F, Konidaris S, Zourlas PA (1993): Assessment of autoantibodies to the zona pellucida in serum and follicular fluid in *in-vitro* fertilization patients. *Clin. Exp Obstet Gynecol* 20:32-36.
- Okuda K, Sakumoto R (2003): Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. *Reprod Biol Endocrinol* 10:95-104.
- Peng J, Dong W, Chen Y, Mo R, Cheng JF, Hui CC, Mohandas N, Huang CH (2006): Dusty protein kinases: primary structure, gene evolution, tissue specific expression and unique features of the catalytic domain. *Biochim Biophys Acta* 1759:562-572.
- Rajakoski E (1960): The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 34:1-68.
- Robbins E, Pederson T (1970): Iron: Its intracellular localization and possible role in cell division. *Proc Natl Acad Sci* 66:1244-1251.
- Scaramuzzi RJ, Turnbull KE, Nancarrow CD (1980): Growth of Graafian follicles in cows following luteolysis induced by the prostaglandin F₂α analogue, cloprostenol. *Aust. J Biol Sci* 33: 63-69.
- Schweitzer SC, Evans RM (1998): Vimentin and lipid metabolism. *Subcell Biochem* 31:437-462.
- Shen WJ, Zaidi SK, Patel S, Cortez Y, Ueno M, Azhar R, Azhar S, Kraemer FB (2012): Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis. *Endocrinology* 153:3249-3257.
- Sirois J, Fortune JE (1990): Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127: 916-925.

(Received: 12 September 2013/ Accepted: 23 September 2013)