# Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens

# II. Glykosidasen

### H. W. DENKER

Anatomisches Institut der Universität Marburg a.d. Lahn (Direktor: Prof. Dr. G. Petry)

Eingegangen am 30. November 1970

# Enzyme Topochemistry of the Early Development and Implantation in the Rabbit

### **II.** Glycosidases

Summary. Early stages of development and the surrounding tissues of the Fallopian tube and the uterus are studied in the rabbit from ovulation to implantation. The topochemistry of the following glycosidases is demonstrated:  $\beta$ -galactosidase, neuraminidase, glucosaminidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase. The distribution given for neuraminidase is the result of preliminary attempts to develop histochemical procedures for this enzyme.

Results. In cleaving eggs, the activities of  $\beta$ -glucuronidase and glucosaminidase are dominant. The epithelium of the *Fallopian tube* shows an activity of glucosaminidase and  $\beta$ galactosidase possibly correlated to the formation of the mucoproteid layer. These enzymes are also demonstrated in the epithelium of the *uterus* in all stages, whereas  $\beta$ -glucuronidase has its maximum activity before eggs enter the uterus and at implantation. In the *trophoblastic knobs*, these three enzymes could have a physiological role in the processes of dissolution of blastocyst coverings and implantation. Neuraminidase activity is found in the epithelium of the uterus.

Zusammenfassung. Untersucht werden Frühstadien der Entwicklung des Kaninchens von der Ovulation bis zur Implantation, einschließlich Tube und Uterus. Registriert wird die Verteilung von Glykosidasen ( $\beta$ -Galaktosidase, Neuraminidase, Glukosaminidase,  $\beta$ -Glukuronidase,  $\alpha$ -Glukosidase), vor allem im Hinblick auf den Stoffwechsel von Mukosubstanzen. Die verwendete Methode zum Neuraminidasenachweis ist ein erster Versuch zur histochemischen Lokalisation dieses Enzyms.

Ergebnisse. In Furchungsstadien sind  $\beta$ -Glukuronidase und Glukosaminidase auffällig aktiv. Eine Funktion bei den wichtigen morphogenetischen Prozessen dieser Phase wird vermutet. Das Epithel der Tube zeigt vor allem eine Aktivität von Glukosaminidase und  $\beta$ -Galaktosidase, die möglicherweise eine Beziehung zur Bildung der Mukoproteidschicht haben. Im Uterusepithel sind in allen Stadien  $\beta$ -Galaktosidase und Glukosaminidase aktiv;  $\beta$ -Glukuronidase tritt vor allem vor dem Eintritt des Keims in den Uterus und bei der Implantation hervor. Für die Auflösung der Blastozystenhüllen und für die Implantation ist wahrscheinlich die  $\beta$ -Galaktosidase-,  $\beta$ -Glukuronidase- und Glukosaminidaseaktivität der Trophoblastsprosse von Bedeutung. Neuraminidase ist dagegen vor allem im Uterusepithel lokalisiert.

# Einleitung

Mit dieser Arbeit werden Untersuchungen über den Stoffwechsel hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens fortgesetzt. Sie bauen auf der Kenntnis der Substratverteilung auf (Denker, 1969). In einer ersten Mitteilung (Denker, 1971a) wurde die Topochemie von Enzymen des Glykogenstoffwechsels abgehandelt. Nun soll die Verteilung von Glykosidasen, die im Stoffwechsel von Mukosubstanzen (Spicer u. Mitarb., 1965) eine Rolle spielen können, aufgezeigt werden. Einige neue Methoden, die dabei angewendet werden mußten, werden beschrieben und diskutiert. — Zur Definition der verwendeten Begriffe vgl. Denker (1969).

#### Material und histologische Technik

Verwendet wurden Kryostatnativschnitte von Tuben bzw. Uteri des Kaninchens mit Keimen verschiedener Entwicklungsstadien. Nähere Angaben über dieses Material und die histologische Verarbeitung finden sich in der ersten Mitteilung (Denker, 1971a). Für den Nachweis von  $\beta$ -Galaktosidase nach Rutenburg u. Mitarb. und  $\beta$ -Glukuronidase wurden die Schnitte in Formol-Ca, für Glukosaminidase in Äthanol nachfixiert (jeweils bei 4°C).

Chemikalien (vgl. Denker, 1971a). Abweichende Quellen: N-Acetyl-Neuraminic Acid Lactose, crystalline 99% pure: General Biochemicals; 6-Bromo-2-naphthyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid: Serva; Fast blue B salt (tetrazotiertes di-o-Anisidin ·ZnCl<sub>2</sub>): Serva; Formaldehydlösung säurefrei min. 37 Gew.-% für die Histologie: Merck;  $\beta$ -Galaktosidase aus Hefe, B-grade, Act. 250 NPG units/mg: Calbiochem; Gelatine: Merck; Glukose-Oxydase 10000 E/g für biochemische Zwecke: Merck; Neuraminidase 500 E/ml: Behring-Werke; Pararosanilin: Bayer; Phenazinmethosulfat rein: Serva.

## Resultate

### 1. $\beta$ -Galaktosidase (EC 3.2.1.23)

Für die Spaltung der  $\beta$ -galaktosidischen Bindungen kommen mehrere verschiedene Enzyme in Frage. Sie unterscheiden sich hinsichtlich des pH-Optimums, der Strukturgebundenheit, der Resistenz gegenüber Fixierung und der Inhibitoren (Lojda, 1970), vielleicht auch in gewissem Umfang hinsichtlich der Substratspezifität (Dahlqvist u. Brun, 1962). In dieser Arbeit werden die Ergebnisse von zwei Methoden verglichen: a) künstliches Substrat, b) "natürliches" Substrat; verschiedene Bedingungen. Die Bestimmung mit "natürlichem" Substrat dient vor allem als Kontrolle für den Neuraminidase-Nachweis (S. 273). Die neuen indogogenen Verfahren (Lojda, 1970) konnten noch nicht berücksichtigt werden.

### a) Methode nach Rutenburg u. Mitarb.

Methodik. Substrat: 6-Brom-2-naphthyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid. "Post-incubation coupling", Azofarbstoffbildung (s. Rutenburg u. Mitarb., 1958; Pearse, 1960).

Ergebnisse (vgl. Tabelle 1; Abb. 1a, b). Tubeneier aller Stadien zeigen im Zytoplasma eine leichte Aktivität. Die Zona war in den 2 Fällen von besamten Eiern schwach, aber doch deutlich angefärbt, während sie bei unbesamten Eiern und Furchungsstadien so gut wie nicht reagiert, ebenso die Mukoproteidschicht. Das Sekret der Tube verhält sich praktisch negativ, das Epithel wird mittelstark gefärbt, und zwar erscheint die Aktivität in der Pars ampullaris vorwiegend

				Tabe	lle 1. $\beta$ -Gala	ktosidase					
	Unbesam	t Besamt	35 h	45 h	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	7 d 10 h	8 d
Keim insgesamt	+	+	+	+	+						
Keimscheibe									+ + + + + +	+ + bis	++ bis
Trophoblast						+ +	+ +	+ + + + bis	+ +	+ +	+ +
Hüllen	Ũ	(+)	ũ	Ø	Ø	Q.	0	Q	0 bis +	0 bis +	
Tube					-						
Sekret	<u>0</u>	0	Q	Ø	<u>0</u>						
Epithel	+ +	+ +	+ +	++	+ +						
Stroma	+	+	+	+	+						
Uterus											
Sekret			Ŧ	+	+	0 bis +	0 bis +	0 bis +	0 bis +	0 bis +	0 bis +
Epithel			+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + ≁	+ + +	+ + +	++ +++	++ ++ ++	++ ++ ++
Stroma			(+)	(+)	(+)	+	÷	+ + + +	++ +	+ + sid +	+ + + +
	++++	Positiver b	is sehr star. schen ++-	k positiver . + und ++	Ausfall der 1 + +, oder 1	Reaktion. Stärke der F	teaktion an	verschieden	en Orten w	echselnd.	

9: Negativer Ausfall der Reaktion.
(+): Eingeklammerte Werte stehen für unsichere Reaktionsausfälle.

# H. W. Denker:



Abb. 1a u. b.  $\beta$ -Galaktosidase nach Rutenburg u. Mitarb. Keim im Uterus, 5 d p.c. a  $30 \times$ . Das Uterusepithel ist stark, der Keim nur sehr schwach angefärbt. b  $180 \times$ . Das Uterusepithel reagiert stark, der Trophoblast mäßig, die Blastozystenhüllen negativ

apikal, in der Pars isthmica in den Schleimzellen vorwiegend basal, in den Flimmerzellen in ihrer ganzen Ausdehnung. Das Stroma reagiert besonders subepithelial leicht positiv, die glatte Muskulatur der Tube wie die des Uterus ist in allen Stadien mäßig positiv. Bei Blastozysten wird der Trophoblast stets besonders deutlich gefärbt (Abb. 1b), 71/8 d p.c. vor allem die Trophoblastsprosse. Die Keimscheibe zeigt ab 7 d p.c. eine starke Aktivität der äußeren Oberfläche des Ektoblastems; im übrigen ist sie nur angedeutet positiv, ebenso verhalten sich zu allen Zeiten die Blastozystenhüllen (Abb. 1). Das Uterussekret reagiert 35 h bis 3 d p.c. schwach, aber deutlich positiv, danach nur angedeutet und wechselnd. Das Uterusepithel wird bis 3 d p.c. leicht, ab 4 d p.c. stark gefärbt; bis 5 d p.c. ist allenthalben eine Betonung der apikalen Partien des Zytoplasmas deutlich. Ab 6 d p.c. ist die Anfärbung mesometral generell stärker als antimesometral; 6 und 7 d p.c. reagieren in den oberflächlichen und mittleren Abschnitten der Falten bzw. Krypten besonders stark die basalen Zellteile, in den tiefen Abschnitten und in den unmittelbar dem Keim anliegenden Zellen die apikalen. Ab 7<sup>1</sup>/<sub>3</sub> d p.c. liegt das Maximum überall apikal. Im Stroma des Endometriums ist die Anfärbung besonders subepithelial in der Nähe des Lumens und in der glatten Gefäßmuskulatur zu finden.

Zur Kritik der Methode ist anzuführen, daß es sich hierbei um einen Nachweis handelt, der in zwei zeitlich getrennten Schritten durchgeführt wird ("Postincubation coupling"), wobei es stets zu Diffusionsartefakten kommen kann. Auch besteht eine Affinität des hier verwendeten Naphtholderivates zu bestimmten Gewebsstrukturen (bestimmte Proteine; Lipidlöslichkeit; vgl. Pearse, 1968; Lojda, 1970; S. 276). Eine zytochemische Lokalisation (lysosomal) erhält man daher nicht.

#### H. W. Denker:

## b) Methode nach Dahlqvist u. Brun

Methodik. Substrat ist Laktose ("natürliches Substrat"). Die durch die Enzymwirkung freigesetzte Glukose wird mit Glukoseoxydase durch gekoppelte Formazanbildung nachgewiesen (Dahlqvist u. Brun, 1962; Lojda, 1965). Damit sind die Probleme der Dehydrogenasen-Histochemie zu beachten (vgl. Reiß, 1967).

Mit dieser Prozedur werden demnach die Orte demonstriert, an denen eine Freisetzung von Glukose erfolgt. Das System ist sehr kompliziert (vgl. auch Abb. 2, S. 273). Auf allen Stufen ist die Entstehung von Diffusionsartefakten möglich, vor allem wenn eine der beteiligten Komponenten eine besondere Affinität zu bestimmten Gewebsstrukturen hat. Die Diffusion kann vermindert werden durch Zusatz von Polyvinylpyrrolidon (PVP) oder durch Ausführung in einem Agargelmedium (s. Lojda, 1965). Im übrigen konnte Lojda (1965)  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mit dieser Methode nur dann deutlich nachweisen, wenn die Inkubation in besonderen Inkubationskammern (s. Bartonicek u. Lojda, 1963) unter annähernd anaeroben Bedingungen erfolgte. Sie wurden auch hier verwendet.

In der vorliegenden Arbeit diente dieser  $\beta$ -Galaktosidasenachweis nach Dahlqvist und Brun vor allem zur Kontrolle der Ergebnisse des Neuraminidasenachweises (S. 273). Einzelheiten der Methode wurden daher der NAase-Prozedur angepaßt.

Material. I. Ausgangslösungen (bis auf A. frisch bereitet): A. Veronalacetatpuffer nach Michaelis 0,1 m pH 6,0; B. Laktoselösung in Aqua dest. 10% (w/v); C. Phenazinmethosulfatlösung (PMS) in Puffer A. 0,033 mg/ml; D. Nitro-BT-Lösung in Aqua dest. 2 mg/ml. II. Inkubationsmedium: Das Inkubationsmedium wird aus entsprechenden Volumina der Ausgangslösungen (I.) in der folgenden Weise hergestellt: Glukoseoxydase in der PMS-Lösung lösen, dann Nitro-BT-Lösung (D.), Puffer (A.), zur Volumenkorrektur ggf. Aqua dest. und zuletzt Laktoselösung (B.) zugeben.

Konzentrationen im Inkubationsmedium: Laktose 1,5 (oder 10) mg/ml; Glukoseoxydase 10000 E/g 1 mg/ml; PMS 0,01 mg/ml; Nitro-BT 0,2 (oder 0,4) mg/ml; Puffer 0,05 m.

Kontrollen. Ebenso ohne Laktose, Glukoseoxydase oder Nitro-BT.

Ausführung. Auf Objektträgern montierte Nativschnitte werden mit einer Inkubationskammer (s. o.) bedeckt, die mit dem Inkubationsmedium gefüllt ist; Luftblasen sind zu vermeiden. Inkubation bei 37° C 14 h, spülen in Aqua dest., fixieren in Formol (Formaldehydlösung etwa 40 Gew.-% 10 ml, Aqua dest. 90 ml) 10 min, fließend Leitungswasser 10 min, Aqua dest., Einschluß in Glyceringelatine.

Resultat. Die blauschwarze Färbung des reduzierten Nitro-BT zeigt die Orte der Enzymaktivität an.

Ergebnisse. In den Versuch kamen nur Keime und Uteri der Stadien  $6^2/_3$  und 7 d p. c. Gewertet wurden ausschließlich blauschwarze Granula, die stets feingranulär sind. Braune Färbungen zeigen sich im gesamten Uterusepithel, mit einer Betonung der Furchen und der basalen Zellpartien, wo sich grob granuläre Strukturen tingieren, die auch im ungefärbten Präparat durch anderes Brechungsvermögen erkennbar sind. Diese Strukturen speichern viele Farbstoffe und werden bei verschiedenen Enzymreaktionen dargestellt; es dürfte wohl die Region der Lysosomen sein. In Kontrollen zu dieser  $\beta$ -Galaktosidasereaktion (ohne Substrat, ohne Glukoseoxydase) ist hier die braune Anfärbung ebenfalls, wenn auch etwas schwächer, erkennbar, während die blauschwarzen Granula fehlen. In Abwesenheit von Nitro-BT bleiben die Präparate praktisch völlig farblos. Bei der braunen Färbung mag es sich daher um eine unspezifische Anlagerung von Nitro-BT handeln; sie wurden nicht als Zeichen einer Enzymaktivität gewertet.

Die Ergebnisse entsprechen hinsichtlich der blauschwarzen Präzipitate im Prinzip denen, die man mit der Methode von Rutenburg u. Mitarb. (S. 269) erhält: Der Farbstoff findet sich im Bereich des Uterusepithels, weniger im Bereich des Myometriums und nur angedeutet im Uterus-Stroma und im Keim. Die Keimhüllen reagieren negativ, über dem Uterussekret sind in den Schleimhautfurchen Granula vorhanden, doch ist wegen der allgemein unscharfen Lokalisation der Methode eine Bewertung nicht gut möglich. Auffällig ist eine allgemeine Betonung der Region der Paraplazentarfurchen. Die blauschwarzen Formazanniederschläge sind hier über das Epithel und das subepitheliale Stroma ziemlich regellos verteilt. Eine schärfere Lokalisation ergibt sich auch nicht bei kürzeren Inkubationszeiten. Die Lokalisation wird offenbar durch Diffusionsartefakte stark beeinträchtigt. Da die Methode als Kontrolle bewußt eng an das Vorgehen beim Neuraminidase-Nachweis (S. 274) angeglichen wurde, wurde auf eine Diffusionsminderung in Gelmedien (Lojda, 1965) verzichtet. Von den verschiedenen Konzentrationen an Substrat und Nitro-BT bringt jeweils die geringere einen stärkeren Reaktionsausfall.

### 2. Neuraminidase (NAase; N-Acetylneuraminat-Glykohydrolase; EC 3.2.1.18)

Eine histochemische Prozedur zum Nachweis von NAase-Aktivität ist in der Literatur bislang nicht angegeben. Ich habe mich im Rahmen dieser Arbeit bemüht, eine solche Methode zu finden, da meine früheren Kohlenhydrat-Substrat-Untersuchungen eine Beteiligung von NAase bei der Auflösung der Blastozystenhüllen und der Implantation denkbar erscheinen ließen (Denker, 1969). Die Ergebnisse dieser Versuche sollen hier vorgelegt werden.

Methodik. Zur Spezifität des Enzyms vgl. Gottschalk (1957), Rafelson u. Mitarb. (1966), Drzeniek (1967). Ein geeignetes synthetisches Substrat steht zur Zeit nicht zur Verfügung, Synthesen mit der Neuraminsäure sind schwierig und erst in jüngster Zeit möglich. Daher



Abb. 2. NAase-Nachweis

wurden Versuche mit dem einfachsten verfügbaren natürlichen Oligosaccharid der Neuraminsäure unternommen: der Sialyllaktose (NANA-Laktose), einem Trisaccharid vom Aufbau N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA)-Galaktose-Glukose (vgl. Trucco u. Caputto, 1954; Schneir u. Rafelson, 1966). Verwendet wird das Prinzip von Dahlqvist u. Brun (S. 272). Durch die Aktion von NAase entstehen NANA und Laktose. Soll nach dem Prinzip von Dahlqvist u. Brun freigesetzte Glukose (oder Galaktose) nachgewiesen werden, so muß zunächst die Glykosidbindung der Laktose gespalten werden. Deswegen wird dem Inkubationsmedium  $\beta$ -Galaktosidase zugesetzt. Damit nimmt das verwendete System die in Abb. 2 dargestellte Form an. Es ist gegenüber dem von Dahlqvist u. Brun verwendeten um eine Stufe erweitert und damit noch komplexer.

Hier liegt der Grund für eine Reihe von Problemen und Schwierigkeiten: 1. Die Lokalisation wird schlecht sein wegen der Möglichkeit der Entstehung von Diffusionsartefakten. 2. Für dieses System müssen Bedingungen gewählt werden, unter denen drei Enzyme gleichzeitig aktiv sind: NAase,  $\beta$ -Galaktosidase und Glukoseoxydase. Die bisher bekannten NAase-Präparationen haben ihr pH-Optimum fast alle im Sauren (vgl. Ada, 1963; Cook u. Ada, 1963; Di Donato u. Tettamanti, 1967; Kuratowska u. Kubicka, 1967; Mahadevan u. Mitarb., 1967; Sandhoff u. Jatzkewitz, 1967; Taha u. Carubelli, 1967; Wilson u. Rafelson, 1967). Allerdings ist eine Varianz gegeben durch eine deutliche Abhängigkeit von verschiedenen Komponenten des Inkubationsmediums, u.a. vom Substrat (Rafelson u. Mitarb., 1966; Schneir u. Rafelson, 1966). Bei stärker sauren pH-Werten ( $\leq 6$ ) war die mir zur Verfügung stehende  $\beta$ -Galaktosidasepräparation instabil. Andererseits sollte auch geprüft werden, ob eine NAase-Aktivität bei dem leicht alkalischen pH der Uterusflüssigkeit demonstrabel ist. Daher habe ich pH-Werte zwischen 6,0 und 7,3 verwendet. Leider wurde mein  $\beta$ -Galaktosidasepräparat auch durch andere Komponenten des Gemischs inaktiviert, nämlich durch Nitro-BT und das Substrat, Sialvllaktose, ferner durch PVP und Agarose. Auch die Art des Puffers spielte eine Rolle. Ca<sup>++</sup>-Ionen inaktivierten die  $\beta$ -Galaktosidase ebenfalls, aus diesem Grunde mußte ein solcher Zusatz fortfallen, den ich geplant hatte, da eine Aktivierung der NAase durch Ca++ in den meisten untersuchten Fällen beobachtet worden ist (Boschman u. Jacobs, 1965; Wilson u. Rafelson, 1967; vgl. dagegen zu einem fördernden Einfluß von EDTA: Wooley u. Gommi, 1964). Um gewebseigenes Ca++ nicht noch zu fällen, habe ich keinen Phosphatpuffer, sondern Veronal-Acetat-Puffer benutzt.

In Reagenzglas-Vorversuchen mit NAase,  $\beta$ -Galaktosidase, Glukoseoxydase und den anderen Bestandteilen des Inkubationsgemischs wurden folgende Kompromißansätze entwickelt:

I. Ausgangslösungen (bis auf Puffer frisch hergestellt): A. Veronalacetatpuffer nach Michaelis 0,1 m pH 6,0; 6,5; 7,0 oder 7,3; oder Phosphatpuffer nach Sörensen 1/15 m pH 6,0; B. Sialyl-Laktose-Lösung: Sialyl-Laktose (N-Acetyl-Neuraminsäure-Laktose, NANA-Laktose) wird im Puffer (A.) des gewünschten pH gelöst und der pH durch Zugabe von 0,1 n KOH unter Kühlung in Eiswasser korrigiert. Endkonzentration der Sialyl-Laktose etwa 9 mg/ml; C. PMS-Lösung in Puffer (A.) 0,033 mg/ml; D. Nitro-BT-Lösung in Aqua dest. 2 mg/ml; E.  $\beta$ -Galaktosidaselösung (250 NPG units/mg) 13,3 mg/ml.

II. Inkubationsmedium. Ansatz unter Mischung der oben angegebenen Ausgangslösungen (I.) in der Reihenfolge: B, C, Zugabe und Lösen von Glukoseoxydase (Substanz), D, E. Endkonzentrationen im Inkubationsmedium: Sialyl-Laktose 3,8 mg/ml;  $\beta$ -Galaktosidase 2,6 mg/ml; Glukoseoxydase 1,5 mg/ml; PMS 0,01 mg/ml; Nitro-BT 0,2 mg/ml; Veronalacetatpuffer 0,05 m (oder Phosphatpuffer 0,037 m).

Kontrollen. 1. Ohne  $\beta$ -Galaktosidase; 2. ohne Substrat Sialyl-Laktose; 3. ohne  $\beta$ -Galaktosidase und ohne Substrat; 4. ohne Glukoseoxydase bzw. andere Komponenten des farbstoffbildenden Systems.

Ausführung. Kryostat-Nativschnitte montieren. Inkubation in Inkubationskammern (S. 272) bei 37° C 15—22 Std. Waschen in 2mal Aqua dest., fixieren in Formol (Formaldehydlösung 40 Gew.-% 10 ml, Aqua dest. 90 ml) 10 min, waschen in fließend Leitungswasser 10 min, Aqua dest., Einschluß in Glyceringelatine.

Resultat. Die Orte einer NAase-Aktivität werden im Präparat (im Gegensatz zu den Kontrollen) durch blauschwarze Granula dargestellt.



Keim

Abb. 3a u. b. Neuraminidase. Keim im Uterus 7 d p. c. a Mesometrales Endometrium und Keim, 75×. Die Formazangranula liegen vorwiegend über dem Uterusepithel in der Tiefe der Krypten, dagegen kaum im Bereich des Keims. b Mesometrales Endometrium, 180×. Feine Formazangranula (oben) und grobgranuläre, unspezifische (im Original braune) Anfärbungen (unten)

Ergebnisse (Abb. 3). Nach Inkubation in einem Medium mit Veronal-Acetat-Puffer von pH 6,0 treten bei den geprüften Stadien von  $6^2/_3$  und 7 d p.c. die typischen blauschwarzen Nitro-BT-Formazan-Granula auf, und zwar vor allem über dem Endometrium der Paraplacentarfurchen, besonders in den tieferen Abschnitten der Furchen. Die Granula reichen in das Gebiet des subepithelialen Stromas und andererseits des Sekrets hinein und sind über all diese Orte ziemlich regellos verstreut. Die übrigen Abschnitte des Endometriums und der Keim zeigen nur spärliche Granula. Die oben unter  $\beta$ -Galaktosidase (S. 273) beschriebenen braunen Färbungen sind in diesem Fall ebenso zu sehen (Abb. 3b), aber wiederum auch bei Kontrollen ohne  $\beta$ -Galaktosidase und ohne Substrat.

Bei den Kontrollen ohne Substrat fehlen die blauschwarzen Granula praktisch vollständig; dagegen sind sie bei Inkubation mit Substrat, aber ohne  $\beta$ -Galaktosidase zwar vermindert, aber doch deutlich vorhanden und wie im Hauptversuch verteilt. Die Überprüfung des Inkubationsmediums nach der Inkubation auf die Aktivität der einzelnen Komponenten zeigt, daß die  $\beta$ -Galaktosidase so gut wie nicht mehr aktiv ist. Die Aktivität ist in Vergleichstests schon nach wenigen Stunden sehr stark abgefallen. Andererseits entspricht die erhaltene Lokalisation der Formazan-Granula recht gut dem Maximum der Aktivität der uteruseigenen

<sup>19</sup> Histochemie, Bd. 25

 $\beta$ -Galaktosidase, wie sie sich in den Nachweisen nach Dahlqvist/Lojda (gleiches Prinzip) und nach Rutenburg u. Mitarb. (anderes Prinzip) darstellt (S. 273). Es ist damit die Möglichkeit gegeben, daß die Granula bei diesem NAase-Nachweis am Ort der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Endometriums entstehen, da sie die instabile  $\beta$ -Galaktosidase des Inkubationsmediums ersetzt hat. Ich habe  $\beta$ -Galaktosidase während der Inkubation nachgegegen; dies führte zu einer Intensivierung der Färbung, aber zu keiner wesentlichen Änderung des Befundes. Es ist bei der Komplexität des verwendeten Systems also möglich, daß NAase an einem anderen Ort als dem dargestellten aktiv ist, daß dort die Sialyl-Laktose gespalten wird und daß Laktose wegen nur geringer  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Inkubationsmediums unverändert diffundieren kann zum Ort der gewebseigenen  $\beta$ -Galaktosidase; dort käme es dann zur Glukosefreisetzung und Formazanbildung. Andere Möglichkeiten für die Entstehung von Artefakten scheinen mir unwahrscheinlich: Glukose oder Laktose des Schnitts können keine Rolle spielen, da die Kontrollen ohne Substrat negativ ausfielen; Glukose oder Laktose des Inkubationsmediums waren in den Testansätzen nicht nachweisbar; eine bevorzugte Bindung von Nitro-BT an bestimmte Gewebsstrukturen gibt es zwar offenbar bei den hier untersuchten Objekten (eigene Beobachtung), das resultierende Verteilungsmuster ist aber ein anderes. Diese Tatsache spricht ebenfalls gegen die Annahme einer Verfälschung durch Glukose oder Laktose des Inkubationsmediums.

Da eine Reaktion nur bei Anwesenheit des Substrats zustandekommt, scheint es mir gerechtfertigt anzunehmen, daß dieser Test tatsächlich eine *NAase*-*Aktivität* demonstriert; ob die erhaltene Lokalisation mit der Lokalisation der NAase übereinstimmt oder durch den Ort der gewebseigenen  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt ist, ist nicht sicher zu entscheiden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß beide Orte sehr weit auseinander liegen. Das würde bedeuten, daß ein Laktosetransport diese Kluft überbrücken müßte; spätere Zugabe von  $\beta$ -Galaktosidase demonstriert keine solche Laktoseansammlung an bestimmten Orten.

Bei pH-Werten von 7—7,3 (Veronal-Acetat-Puffer) wurden nur schwächere Ausfälle der oben angegebenen Färbungen bei gleichem Verteilungsmuster beobachtet. Bei Anwendung von Phosphatpuffer habe ich auch auf dem Trophoblasten Formazangranula erhalten, doch waren die Ergebnisse der Kontrollen widersprüchlich. Diese Versuche sollen deswegen nur am Rande erwähnt sein.

# N-Acetyl-β-D-Glukosaminidase (β-Acetylaminodeoxyglukosidase; ,,Glukosaminidase''; EC 3.2.1.30)

Methodik. "Simultaneous capture" nach Hayashi (1965a, b).

Ergebnisse (vgl. Tabelle 2; Abb. 4, 5). Zum Nachweis dieses Enzyms erwies es sich als vorteilhaft, die Schnitte auf einem dünn mit Gelatine überzogenen Objektträger zu montieren (s. Denker, 1971a). Offenbar wurde dadurch eine Diffusion des Enzyms behindert.

Die Lysosomen sind in den verwendeten nachfixierten Kryostatschnitten beschädigt. Dadurch treten mehr diffuse Anfärbungen hervor.

Der Keim zeigt in allen Stadien eine Aktivität; sie ist besonders stark in den mittleren und späteren Furchungsstadien und in den Trophoblastsprossen. Die Keimhüllen werden bei Tubeneiern (bis auf eine gelegentlich schwache Reaktion

				Tabelle 2. N	1-Acetyl-B-D	)-glukosami	nidase		l		
	Unbesam	it Besamt	35 h	45 h	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	7 d 10 h	8 d
Keim insgesamt	+	+	+++++	+	+						
Keimscheibe									+	+	+
Trophoblast						+	+	+	+	+ + bis * + *	+ + 8 + 8
Hüllen	ğ	Ø	Ø bis + <sup>b</sup>	ũ bis + <sup>b</sup>	Ø	Ø	Ũ	a + +	ο + +	+ bis $+ + \mathbf{c}$	,
Tube Sekret	Ø bis +	Ø bis +	+	Ø bis +	Ø(bis +)						
Epithel	$(+)$ bis $++^{d}$	(+) bis ++d	+ +	+ +	+ +						
Stroma	- sid (+)	+ (+) +	+ (+) his +	- (+) bis +	- (+) bis +						
Uterus Sekret			0 bis +	Ø bis +	Ø bis +	Ø bis +	0 bis +	Ø bis +	Ø bis +	Ø bis +	Ø bis +
Epithel			+ +	+ + + +	+ + aid +	+ +	+ +	++ (bis ++-	++ + (biis +++	+++	+ +
Stroma			(+)	(+) bis +	(+) bis +	(+) bis +	(+) bis +	Ø bis +	Ø bis +	0 bis +	Ø bis +
<sup>a</sup> Trophoblast <sup>b</sup> Mukoproteic	sprosse. Ischicht.										

Frühentwicklung und Implantation. II

<sup>10</sup> Mukoprotentastutout. e Aussagekraft fraglich, vgl. Text. d Pars ampullaris. Erklärung der Symbole und Abkürzungen s. Tabelle I.

19\*



Abb. 4. N-Acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidase. Tube, Pars isthmica,  $12^{1}/_{4}$  h p.c., besamt.  $160 \times$ . Positive Reaktion der basalen Abschnitte der Epithelzellen





Blastozystenhöhle

der Mukoproteidschicht) nicht, bei Blastozysten aber ab 6 d p.c. leicht gefärbt (Abb. 5). Allerdings kommt es bei der Entwässerung (die hier im Gegensatz zu den anderen Enzymtests durchgeführt wurde) zu einer Schrumpfung der Hüllen, wodurch eine stärkere Anfärbung vorgetäuscht werden kann. Die Coronazellen sind sehr schwach positiv, ebenso, und zwar wechselnd, das Sekret von *Tube* und *Uterus*. Das Tubenepithel dagegen reagiert deutlich positiv, und zwar vorwiegend in den basalen Zellpartien (Abb. 4). Das Stroma von Tube und Uterus zeigt nur sehr schwache Aktivität, im Uterus reagieren besonders die Stromazellen der epithelnahen Partien; es ist eine deutliche Betonung der Umgebung der Furchen zu sehen. Das Uterusepithel wird in den Frühstadien gleichmäßig gefärbt (Abb. 5),  $7^{1}/_{3}$  d p.c. fällt auf, daß es in der Tiefe der Krypten allgemein stärker reagiert als oberflächlich; innerhalb der Zellen ist ein Färbungsmaximum apikal zu erkennen beim Uterusepithel, das mesometral das Uteruslumen begrenzt; 8 d p.c. ist dies auch antimesometral deutlich.

# 4. β-Glukuronidase (EC 3.2.1.31)

Methodik. Siehe Hayashi (1964), Hayashi u. Mitarb. (1964).

Ergebnisse (vgl. Tabelle 3; Abb. 6—11). Die mit dieser Methode erhaltene Lokalisation ist relativ scharf, obwohl bei den verwendeten nachfixierten Kryostatschnitten mit einer gewissen Schädigung der Lysosomen gerechnet werden muß.

Alle Tubenkeime reagieren mäßig bis stark positiv (vgl. Abb. 6), ebenso Granulosaepithelzellen, wenn sie nach der Besamung offenbar in Nekrobiose begriffen sind (zuvor sind sie nur schwach positiv). Das Tubenepithel wird in allen Stadien schwach gefärbt, in der Pars isthmica stellenweise, besonders tief

				Tabell	le 3. β-Gluku	tronidase					
	Unbesam	t Besamt	35 h	45 h	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	7 d 10 h	8 d
Keim											8
insgesamt	+ + + +	+ + + + +	+++ +++	+ + bis	+++ +++						
Keimscheibe								(+)	+ +	÷	(+)
Trophoblast						+	(+)	(+)	(+)	+ bis +++ <sup>8</sup>	(+) bis $+a$
Hüllen	Ũ	ũ	Ø	, Ø	Ď	Ø	Q	Ø bis (+)	+	(+)	
Tube											
Sekret	0	Ø	Ø	<u>0</u>	0						
Epithel	Ŧ	Ŧ	+	+	4						
Stroma	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)						
Uterus											
Sekret			Ø bis +++	$\emptyset$ bis ++++	0 bis ++	0 bis +	Ø bis (+)	Ø bis +	Ø bis +++	Ø bis +++	Ø bis +
Epithel			+ <del> </del> + + +	+ bis + + +	+ + + +	+	ø bis +	ø bis +	$(+)$ bis $++^{b}$	(+) bis $+++$ b	(+)
Stroma			+	+	+	+	++	++	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	+ + +	++++
<sup>a</sup> Trophoblastsp	rosse.										

<sup>b</sup> Antimesometral. Erklärung der Abkürzungen und Symbole s. Tabelle 1.



Uterussekret Blastozystenhüllen

Keimscheibe

Abb. 6.  $\beta$ -Glukuronidase. Keim in der Tube, 35 h p.c.,  $100 \times$ . Starke Reaktion des Keims Abb. 7.  $\beta$ -Glukuronidase. Uterus. 7 d p.c., mesometral.  $100 \times$ . Stark angefärbtes globulöses Sekret. Myometrium schwach positiv

Abb. 8.  $\beta$ -Glukuronidase. Keim im Uterus, 6 d p.c., 160×. Stark reagieren einige Stromazellen und das an die Blastozystenhüllen angelagerte Uterussekret

Abb. 9.  $\beta$ -Glukuronidase. Keim im Uterus, 7 d p.c., Keimscheibe. 160×. Starke Reaktion der Oberfläche der Keimscheibe und der Stromazellen des Uterus

in den Krypten, mäßig stark, die glatte Muskulatur der Tube ist allenthalben sehr schwach positiv, das Sekret negativ. Das *Uterus*epithel ist 35 h p.c. besonders in der Tiefe der Krypten reich an mäßig bis stark positiven tropfig-granulären Einschlüssen, das Sekret dort stark gefärbt; diese Reaktionen nehmen in den folgenden Stadien an Intensität ab, so daß 5 d p.c. nur noch wenig Aktivität in den tiefsten Teilen der Krypten und praktisch kein positives Sekret zu erkennen ist. Ab 6 d p.c. ist wieder positiv reagierendes Sekret zu sehen, das in einzelnen globulös geformten Körpern hier und da im Lumen der Krypten liegt (Abb. 7) oder an die Außenseite der Blastozystenhüllen angelagert ist (Abb. 8). Das Epithel wird von 7 d p.c. bis  $7^{1}/_{3}$  d p.c. zunehmend positiv, vor allem antimesometral, mit einer Betonung wieder der tiefen Abschnitte der Krypten, wo das Maximum Throphoblastsprosse beim Durchdringen der Blastozystenhüllen Trophoblastsproß



Myometrium

Abb. 10.  $\beta$ -Glukuronidase. Keim im Uterus, 7 d p.c., antimesometral. 160×. Stark reagieren Stromazellen, weniger Uterusepithel und Trophoblastsprosse. Keimhüllen negativ Abb. 11.  $\beta$ -Glukuronidase. Keim im Uterus, 7<sup>1</sup>/<sub>3</sub> d p.c., antimesometral. 160×. Starke Reaktion des Trophoblastsprosses

intrazellulär basal liegt. 71/3 d p.c. sind auch die mehr oberflächlichen Zellen des antimesometralen Endometriums gut positiv, und zwar mit Betonung der apikalen Zellpartie. 8 d p.c. reagieren Uterusepithel und Sekret nur noch schwach. Junge Blastozysten zeigen so gut wie keine Aktivität (im Gegensatz zu den Furchungsstadien), allenfalls noch 4 d p.c. im Trophoblasten. 7 d p.c. dagegen ist eine deutliche Reaktion der oberflächlichen Region des Ektoblastems zu erkennen (s. Abb. 9), sie ist 7<sup>1</sup>/<sub>3</sub> d p.c. abgeschwächt, aber noch deutlich, 8 d p.c. dagegen nicht mehr wahrnehmbar. Meso- und Entoblastem ergeben maximal (7-71/3 d p.c.) nur eine schwache Reaktion. Der Trophoblast wird nur sehr leicht gefärbt mit Ausnahme der Trophoblastsprosse, die 71/3 d p.c. oft stark positiv sind (Abb. 11); 8 d p.c. sind nur noch geringe Reste dieser Reaktion erhalten. Die Keimhüllen reagieren stets negativ bis auf 7-71/3 d p.c., wo sie geringfügige Färbungen zeigen. Im Stroma des Uterus finden sich mäßig bis stark positive 35 h p.c. in geringer Zahl, ab 5 d p.c. mesometral reichlicher, ab Stromazelle antimesometral, und zwar dort besonders dicht gelagert (Abb. 8 6 d p.c. au bis 10). Das Myometrium reagiert stets schwach, 7 d p.c. ist eine Betonung der Ringmuskulatur deutlich. 8 d p.c. sind die Reaktionen aller Strukturen bis auf die Stromazellen stark abgeschwächt.

# 5. $\alpha$ -Glukosidase (EC 3.2.1.20)

Methodik. "Simultaneous capture", s. Lojda (1965).

Ergebnis. Weder im Keim noch in der Tube oder im Uterus ließ sich in irgendeinem Stadium  $\alpha$ -Glukosidase nachweisen.

# Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchten Glykosidasen wurden unter dem Gesichtspunkt ausgewählt, daß sie im Stoffwechsel von Mukosubstanzen (MS) eine Rolle spielen können (zum Begriff "Mukosubstanzen" s. Denker, 1969). Proteasen, die für den Abbau des in den MS meist vorhandenen Proteinanteils in Betracht kommen, werden in einer weiteren Mitteilung besprochen (Denker, 1971b). Für die meisten dieser Enzyme kommen als physiologische Substrate auch niedermolekulare Stoffe in Frage. Da über die topochemische Verteilung dieser Stoffe in den hier interessierenden Strukturen aber gegenwärtig nichts bekannt ist, soll dieser Gesichtspunkt vorläufig unberücksichtigt bleiben.

Der Keim ist in Furchungsstadien vor allem auffällig reich an  $\beta$ -Glukuronidase. Für dieses Enzym wird sowohl eine Rolle im Stoffwechsel der sauren Mukosubstanzen (sMS) als auch der Steroide diskutiert (vgl. Fishman u. Fishman, 1944; Pearse, 1960; Barka u. Anderson, 1965). Dem sMS-Stoffwechsel kann in diesen Stadien insofern eine besondere Bedeutung zukommen, als hier die Scheidung von zwei Kategorien von Blastomeren erfolgt: präsumptive Embryonalknotenzellen und präsumptive Trophoblastzellen (Denker, 1969). Diese Blastomeren unterscheiden sich möglicherweise durch die Ladung der sMS ihrer Zelloberflächen. Neben  $\beta$ -Glukuronidase ist auch Glukosaminidase in Furchungsstadien sehr aktiv. Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung ist zu beachten, daß das letztere Enzym auch N-Acetyl- $\beta$ -D-galaktosaminide hydrolysiert ("N-Acetyl- $\beta$ -hexosaminidase") (Walker, 1966).

Im Sekret der Tube kommt den MS beim Kaninchen eine besondere Bedeutung für die Physiologie des Keims zu. Während der Tubenwanderung wird auf die Zona eine weitere, tertiäre Keimhülle aufgelagert, die Mukoproteidschicht. Sie entsteht aus diesem Sekret, das sich auch um verschiedene Fremdkörper zu ähnlichen geschichteten Massen verdichten kann (vgl. Greenwald, 1958). Sicher hat sie spezielle physiologische Aufgaben für den Keim: Ganz ohne diese Hüllen ist er nicht lebensfähig. Welcher Art diese Aufgaben sind, ist aber noch unklar (vgl. Denker, 1969). Ebensowenig geklärt sind die physikalisch-chemischen Grundprozesse ihrer Bildung. Gesichert ist nur eine Abhängigkeit vom Hormonhaushalt, die aber bereits die Sekretion selbst betrifft (Greenwald, 1958). Als rein passiver Vorgang ist die Ablagerung aber nicht zu verstehen: Eine Beteiligung des Keims wird nahegelegt durch die Beobachtung von Yoshinaga und Adams (1967), daß auf Mäuseblastozysten in der Tube des Kaninchens keine Mukoproteidschicht aufgelagert wird. Nennenswerte Enzymaktivitäten konnte ich allerdings in den Hüllen nicht nachweisen. Das Tubenepithel besitzt eine relativ hohe Glukosaminidaseaktivität; das Enzym geht offenbar in das Sekret über.  $\beta$ -Galaktosidase ist mäßig und  $\beta$ -Glukuronidase nur schwach aktiv. Die letztere findet sich dagegen reichlich in einzelnen degenerierenden Follikelepithelzellen, die frei im Lumen liegen. Diese Zellen scheinen auch bei anderen biochemischen Prozessen eine Bedeutung für die Physiologie des Keims zu haben. So können sie zumindest in vitro Pyruvat liefern (Kennedy u. Donahue, 1969). Das erst kürzlich entdeckte Enzym, das an der Bindung der Kohlenhydratbausteine der MS an die Proteinkomponente angreift, die 0-Seryl-N-acetylgalactosaminid-glykosidase, besitzt nach Schauer u. Gottschalk (1967) im Ovidukt des Frosches kurz vor dem Laichen eine relativ hohe Aktivität.

Im Uterus des Kaninchens ist  $\beta$ -Glukuronidase vor allem in Stromazellen und Sekret lokalisiert. Während des Beobachtungszeitraums sind Veränderungen der Aktivität deutlich: Im Epithel und Sekret zunächst ein Abfall, dann erneuter Anstieg (gleiche Beobachtung bei biochemischer Bestimmung, die allerdings das Stroma mit erfaßte, an der Ratte: s. Wood u. Psychoyos, 1967; zum Östrogeneinfluß s. ebenda und Fishman u. Fishman, 1944; zum Vorkommen in der Uterusflüssigkeit allgemein s. Ringler, 1961). Im Stroma steigen Zahl und Färbungsintensität der reagierenden Zellen zum Zeitpunkt und Ort der Implantation hin an.

 $\beta$ -Galaktosidase und Glukosaminidase zeigen im Uterus keine Auffälligkeiten.  $\beta$ -Galaktosidase scheint in das Uterussekret überzutreten. Zum Vorkommen dieses Enzyms im Uterus vgl. auch Bulmer (1964), zur Glukosaminidase Coleman u. Mitarb. (1967). Für beide Enzyme ist an eine Funktion im Stoffwechsel der sMS zu denken. Die histochemische Charakteristik dieses sMS ist im Uterussekret in allen Stadien relativ konstant. Sie ändert sich dagegen in den Blastozystenhüllen. Ferner lassen sich mit biochemischer Methodik Verschiebungen im Spektrum der Uterussekretproteine (Glykoproteine!) in den einzelnen Stadien zeigen. Eine Bedeutung der Glykosidasen bei diesen Prozessen darf zwar vermutet werden, läßt sich aber durch die histochemischen Tests mit den erhaltenen gleichförmigen Reaktionsausfällen nicht belegen.

Eine Bedeutung haben die Glykosidasen vermutlich für die Auflösung der Blastozystenhüllen und für das Eindringen der Trophoblasten zwischen die Uterusepithelzellen bei der *Implantation*, denn diese Strukturen sind reich an sMS (vgl. Denker, 1969). Die Beobachtung einer Aktivität von  $\beta$ -Glukuronidase,  $\beta$ -Galaktosidase und Glukosaminidase in den Trophoblastsprossen stützt diese Vorstellung. Neuraminidase andererseits läßt sich nicht in diesen Strukturen, sondern im Uterusepithel demonstrieren. Sollte diese Lokalisation richtig sein, was aus methodischen Gründen nicht sicher ist (S. 275 f.), so müßte man sich vorstellen, daß die Neuraminidase der Uterusflüssigkeit (Schwick, 1963) vom Endometrium sezerniert wird und dann in diesem Sekret ubiquitär, d.h. nicht lokal wirkt. Für die streng lokalisierte Invasion des Trophoblasten in das Uterusepithel ist wahrscheinlich die hohe proteolytische Aktivität der Trophoblastsprosse wesentlich (Denker, 1971b).

## Literatur

- Ada, G. I.: Purification and properties of avian neuraminidase. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 73, 276-284 (1963).
- Barka, T., Anderson, P. J.: Histochemistry. Theory, practice, and bibliography. New York-Evanston-London: Hoeber 1963, 1965.
- Bartonicek, V., Lojda, Z.: Incubation chambers made of plastic. Acta histochem. (Jena) 51, 389-391 (1963).
- Beier, H. M.: Biochemisch-entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Proteinmilieu für die Blastozystenentwicklung des Kaninchens (Orycytolagus cuniculus). Diss. Nat. Fak. Marburg, 1967. Zool. Jb. Abt. Anat. u. Ontog. 85, 72–190 (1968).
- Boschman, T. A. C., Jacobs, J.: The influence of ethylenediamine tetraacetate on various neuraminidases. Biochem. Z. 342, 532-541 (1965).
- Bulmer, D.: The histochemical distribution of  $\beta$ -galactosidase activity in the ovary and female genital tract. Anat. Rec. 149, 699-705 (1964).
- Cassidy, J. T., Jourdian, G. W., Roseman, S.: The sialic acids. VI. Purification and properties of salidase from Clostridium perfringens. J. biol. Chem. 240, 3501-3506 (1965).

- Coleman, R. L., Scroggs, R. A., Whittington, A.: Purification and properties of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from bovine uterus. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 146, 290–292 (1967).
- Cook, B., Ada, G. L.: Neuraminidase in tissues of the chick embryo and chick. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 73, 454-461 (1963).
- Dahlqvist, A., Brun, A.: A method for the histochemical demonstration of disaccharidase activities: application to invertase and treahalase in some animal tissues. J. Histochem. Cytochem. 10, 294-302 (1962).
- Denker, H. W.: Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. Diss. Nat. Fak. Marburg 1969. Zool. Jb. Abt. allg. Zool. u. Physiol. 75, 141-245 und 246-308 (1970).
- Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. I. Glykogenstoffwechsel. Histochemie 25, 256-267 (1971a).
- Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. III. Proteasen. Histochemie im Druck (1971b).
- DiDonato, S., Tettamanti, G.: Ricerche sulla localizzazione endocellulare della sialidasi cerebrale. Boll. Soc. ital. Biol. sper. 43, 1032–1035 (1967).
- Drzeniek, R.: Differences in splitting capacity of virus and V. cholerae neuraminidases on sialic acid type substrates. Biochem. biophys. Res. Commun. 26, 631-638 (1967).
- Fishman, W. H., Fishman, L. W.: The elevation of uterine  $\beta$ -glucuronidase activity by estrogenic hormones. J. biol. Chem. 152, 487–488 (1944).
- Gottschalk, A.: Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and Vibrio cholerae. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 23, 645-646 (1957).
- Greenwald, G. S.: Endocrine regulation of the secretion of mucin in the tubal epithelium of the rabbit. Anat. Rec. 130, 477-496 (1958).
- Hayashi, M.: Distribution of  $\beta$ -glucuronidase activity in rat tissues employing the naphthol AS-BI glucuronide hexazonium pararosanilin method. J. Histochem. Cytochem. 12, 659—669 (1964).
- Histochemical demonstration of N-acetyl-β-glucosaminidase employing naphthol AS-BI N-acetyl-β-glucosaminide as substrate. J. Histochem. Cytochem. 13, 355–360 (1965a).
- The cytologic demonstration of N-acetyl-β-glucosaminidase employing naphthol AS-BI N-acetyl-β-glucosaminide and hexazonium pararosanilin. J. Histochem. Cytochem. 13, 26 (1965 b).
- Nahajima, Y., Fishman, W. H.: The cytologic demonstration of  $\beta$ -glucuronidase employing naphthol AS-BI glucuronide and hexazonium pararosanilin; a preliminary report. J. Histochem. Cytochem. 12, 293—297 (1964).
- Kennedy, J. F., Donahue, R. P.: Human oocytes: maturation in chemically defined media. Science 164, 1292—1293 (1969).
- Kuratowska, Zofia, Kubicka, T.: Purification and some properties of the neuraminidase from rabbit kidney. Acta biochim. pol. 14, 255-259 (1967).
- Lojda, Z.: Some remarks concerning the histochemical detection of disaccharidases and glucosidases. Histochemie 5, 339-360 (1965).
- --- Indigogenic methods for glycosidases. II. An improved method for  $\beta$ -D-galactosidase and its application to localization studies of the enzymes in the intestine and in other tissues. Histochemie **23**, 266–288 (1970).
- Mahadevan, S., Nduaguba, J. C., Tappel, A. L.: Sialidase of rat liver and kidney. J. biol. Chem. 242, 4409-4413 (1967).
- Pearse, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied, 2nd ed., 1960, 3rd ed., part I. London: Churchill 1968.
- Pearson, B., Standen, A. C., Esterly, J. R.: Histochemical β-glucuronidase distribution in mammalian tissue as detected by 5-bromo-4-chloroindol-3-yl-β-D-glucopyruroniside. Lab. Invest. 17, 217-224 (1967).
- Rafelson, E. M., Jr., Schneir, M., Wilson, V. W., Jr.: Neuraminidase. The amino sugars, vol. II, part B (Balazs, E. A., Jeanloz, R. W., eds.), p. 171-179. New York-London: Academic Press 1966.
- Reiß, J.: Grundlagen und neuere Ergebnisse des histochemischen Nachweises von Dehydrogenasen mit Tetrazoliumsalzen. Z. wiss. Mikr. 68, 169–189 (1967).
- Ringler, I.: The composition of rat uterine luminal fluid. Endocrinology 68, 281-291 (1961).

- Rutenburg, A. M., Rutenburg, S. H., Monis, B., Teague, R., Seligman, A. M.: Histochemical demonstration of  $\beta$ -galactosidase in the rat. J. Histochem. Cytochem. 6, 122–129 (1958).
- Sandhoff, K., Jatzkewitz, H.: A particle-bound sialyl lactosidoceramide splitting mammalian sialidase. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 141, 442–444 (1967).
- Schauer, Huberta, Gottschalk, A.: On the distribution of 0-seryl-N-acetylgalactosaminide glycosidase and N-acetyl-β-D-hexosaminidase in vertebrates and invertebrates. Z. Naturforsch. 22 b, 1030-1032 (1967).
- Schneir, M. L., Rafelson, M. E., Jr.: Isolation and characterization of two structural isomers of N-acetylneuraminyllactose from bovine colostrum. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 130, 1—11 (1966).
- Taha, B. H., Carubelli, R.: Mammalian neuraminidase: Intracellular distribution and changes of enzyme activity during lactation. Arch. Biochem. 119, 55-61 (1967).
- Trucco, R. E., Caputto, R.: Neuramin-lactose, a new compound isolated from the mammary gland of rats. J. biol. Chem. 206, 901-909 (1954).
- Walker, P. G.: Hexosaminidases. The amino sugars, vol. II, part B (Balazs, S. A., Jeanloz, R. W., eds.), p. 155–169. New York-London: Academic Press 1966.
- Wilson, V. W., Jr., Rafelson, M. E., Jr.: Studies on the neuraminidase of influenza virus. III. Stimulation of activity by bivalent cations. Biochim. bipohys. Acta (Amst.) 146, 160-166 (1967).
- Wood, C., Psychoyos, A.: Activité de certaines enzymes hydrolytiques dans l'endomètre et le myomètre au cours de la pseudogestation et de divers états de réceptivité utérine chez la Ratte. C. R. Acad. Sci., Sér. D 265, 141-144 (1967).
- Wooley, D. W., Gommi, B. W.: Serotonin receptors: V. Selective destruction by neuraminidase plus EDTA and reactivation with tissue lipids. Nature (Lond.) 202, 1074–1075 (1964).
- Yoshinaga, K., Adams, C. E.: Reciprocal transfer of blastocysts between the rat and rabbit. J. Reprod. Fertil. 14, 325-328 (1967).

Dr. H. W. Denker Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. H. M. Gottschewski Max-Planck-Institut für Immunbiologie BRD-7800 Freiburg i. Br. Stefan-Meier-Str. 8 Deutschland