Histochemie 25, 344—360 (1971)
© by Springer-Verlag 1971

Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens

III. Proteasen

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

III. Proteases

Summary. Proteinases and LAP are demonstrated histochemically in early stages of development in the rabbit: in the egg, the Fallopian tube, and the uterus.

For *proteinases* a new substrate film technique is used. Its value is compared with that of various other methods. It demonstrates a high proteolytic activity of the trophoblast, which is timed to the dissolution of blastocyst coverings and to implantation.

A high *LAP* activity is observed in the epithelium of the uterus rising at the time when the eggs enter the uterus and dropping at the time of implantation. A physiologic role in the preparation of specific uterine secretion proteins is discussed.

Zusammenfassung. An Frühstadien der Entwicklung des Kaninchens (Keim, Tube und Uterus von der Ovulation bis zur Implantation) wird die histochemische Verteilung von Proteinasen und LAP untersucht.

Zum Proteinasennachweis dient ein neuer Substratfilmtest. Sein Wert wird mit dem anderer Methoden verglichen. Der Test demonstriert eine hohe proteolytische Aktivität des Trophoblasten, die örtlich und zeitlich korreliert ist mit der Auflösung der Blastozystenhüllen und der Implantation; ein Kausalzusammenhang wird vermutet.

Im Uterusepithel tritt beim Übertritt des Keims aus der Tube eine hohe LAP-Aktivität auf, die noch vor der Implantation wieder abfällt. Eine Bedeutung für die Bereitstellung der spezifischen Sekretproteine wird diskutiert.

Einleitung

Über die Topochemie von Glykoproteinen während der Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens liegen schon ausführliche Untersuchungen vor (Denker, 1969a). Aus ihnen wurden einige hypothetische Vorstellungen über den Stoffwechsel dieser Substanzen abgeleitet. Durch die Feststellung der Verteilung korrelierter Enzymaktivitäten sollen diese Vorstellungen überprüft werden. Eine frühere Mitteilung behandelte Glykosidasen, die an den Kohlenhydratbau-

Abkürzungen: EDTA = Äthylendiamintetraazetat, FA = Formol-Alkohol, FAE = Formol-Alkohol-Eisessig, HgBPB = Hg-Bromphenolblau (-färbung), LAP = Leucinaminopeptidase, MPS = Mukopolysaccharid, -e, MS = Mukosubstanz, -en, NA = Neuraminsäure, Sialinsäuren, NAase = Neuraminidase, nMS = neutrale Mukosubstanz, -en, PAS = Perjodsäure-Schiff-Reaktion, p.c. = post coitum, h p.c., d p.c. = Stunden p.c., Tage p.c., sMS = saure Mukosubstanz, -en, v/v = Mischungsverhältnis zweier Volumina, w/v = Gewicht pro Endvolumen.

steinen angreifen können (Denker, 1971b). Hier wird nun die Verteilung von Proteasen geschildert, wodurch eine Diskussion der *Biochemie des Implantationsvorgangs* und der Physiologie der *Uterusschleimhaut* möglich wird. Speziell für diese Untersuchungen entwickelte *Substratfilmtests* waren ein wichtiges Hilfsmittel. — Zur Definition der verwendeten Begriffe vgl. Denker (1969a).

Material und histologische Technik

Von Kaninchentuben und -uteri mit Keimen verschiedener Entwicklungsstadien wurden Kryostat-Nativschnitte hergestellt. Zu den Einzelheiten vgl. die 1. Mitteilung dieser Serie (Denker, 1971a).

Chemikalien. 8-Amino-1-naphthol-3,6-disulfonsäure, Mono-Na-Salz (H-Säure, Mono-Na-Salz) techn.: Fluka; Fast blue B salt (tetrazotiertes di-o-Anisidin·$ZnCl_2$): Serva; Formaldehydlösung säurefrei min. 37 Gew.-% für die Histologie: Merck; Gelatine: Merck; Bacto-Gelatin: Difco; Glykogen für biochemische Zwecke: Merck. Im übrigen wurden, soweit erhältlich, p.a.-Präparationen verwendet.

Resultate

1. Proteinasen: Substratfilmtests

Abbau ungefärbter Gelatinefilme

Methodik. Hier kam in erster Linie ein Substratfilmtest zur Anwendung, der speziell für die Verhältnisse beim Kaninchenkeim entwickelt wurde (Denker, 1969b). Zu den allgemeinen Prinzipien von Substratfilmtests vgl. Denker (1971a). Bei diesem Test werden als Substrat Ausstriche von Gelatine verwendet, deren Abbau durch nachträgliche Färbung verfolgt wird. Da natürliche Proteine von einer ganzen Reihe von Proteasen abgebaut werden könnnen. kann man für den demonstrierten Effekt zunächst kein bestimmtes Enzym namhaft machen, sondern muß allgemein von proteolytischer Aktivität sprechen.

Wesentlich ist die Art der *Herstellung der Substratfilme*, vor allem deren *Fixierung*. Eine Fixierung ist notwendig, vielleicht weil eine Inkubation von 38° C notwendig, Gelatine aber bei dieser Temperatur flüssig ist, während sie nach den hier verwendeten Fixierungen höchstens eine leicht pastöse Beschaffenheit bekommt. Jedenfalls habe ich mit Ausstrichen unfixierter Gelatine und Inkubation bei Zimmertemperatur keine klar positiven Resultate erzielt. Solche Ergebnisse zeigen sich aber nach Fixierung des Filmes mit Formol-Alkohol (FA), FAE, Gendre, Rossman oder Bouin. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde mit einem Gemisch aus Formol und 96% Äthanol (FA) bei Kühlschranktemperatur fixiert, da sich dabei eine hohe Empfindlichkeit des Nachweises bei guter Lokalisation ergibt. Eine schärfere Lokalisation ist bei Anwendung höherer H_2O-Konzentrationen im Fixierungsgemisch zu erzielen (vgl. Denker, 1969b). Die Empfindlichkeit ist dann aber geringer. Rein wäßrige Formollösung macht den Substratfilm weitgehend resistent, so daß nur am Ort und zum Zeitpunkt des Maximums der enzymatischen Aktivität ein leichter Effekt zu sehen ist (s. Ergebnisse).

Die (Nativ-) Schnitte müssen direkt auf dem Film *montiert* werden; werden sie nach Daoust zunächst auf einem Glycerin-Gelatine-Ausstrich auf einem zweiten Objektträger montiert, der dann in Kontakt mit dem Film gebracht wird, so gibt es keine klar positiven Ergebnisse. Dies ist vielleicht auf eine starke Diffusibilität des Enzyms (s. unten), vielleicht auch auf die Notwendigkeit einer Inkubation bei 38° C, die dabei nicht möglich ist, zurückzuführen. Als vorteilhaft erweist sich die Anwesenheit einer geringen Konzentration von niedermolekularen Stoffen, vielleicht wegen eines osmotischen Effekts. Höhere Konzentrationen verschlechtern die Lokalisation. Ich habe in der Regel die fertigen (trockenen) Substratfilme vor der Montage des Schnitts in *Phosphatpufferlösung* quellen und anschließend trocknen lassen. Ob und in welchem Umfang allerdings dieser pH-Wert wirklich aufrechterhalten wird, vor allem unter Einfluß der Puffersysteme des Schnitts, ist gewiß in keinem Fall sicher zu sagen.

Zu weiteren Einzelheiten der Methodik vgl. Denker (1969b).

Ergebnisse (vgl. Tabelle 1; Abb. 1—7). Mit diesem Substratfilmtest ist eine außerordentlich hohe proteolytische Aktivität des Keims demonstrabel, die in sehr schöner zeitlicher und räumlicher Korrelation steht zu den Vorgängen der *Auflösung der Blastozystenhüllen* und der *antimesometralen Implantation.*

Alle anderen histologischen Orte zeigen entweder keine oder nur eine sehr schwache und ziemlich konstante Reaktion (Zu den Kriterien für die Stärke der Reaktion, der „Aktivität", s. die Erörterungen bei Denker, 1971a; es sind dies: Grad der Färbbarkeitsminderung, Größe der Abbauzone und benötigte Zeiten). So ist das *Uterussekret* in allen untersuchten Stadien angedeutet oder schwach positiv. Ein schwächerer Ausfall der Färbung im Bereich einzelner, disseminiert liegender Stromazellen von Tube und Uterus und Uterusepithelzellen ist auch immer wieder zu beobachten; er ist recht scharf auf den Ort der betreffenden Zellen beschränkt und bei Färbung durch den Schnitt hindurch oft nicht eindeutig von Aufhellungen zu unterscheiden, die durch Diffusionsverzögerung unter besonders fettreichen Zellen auftreten können.

Im *Keim* dagegen tritt, nachdem Tubeneier und junge Blastozysten negativ gewesen waren (Abb. 1, 2), ab 6 d p.c. eine Aktivität auf, die 7 d p.c. sehr stark ist und $7^1/_3$ d p.c. überraschend hohe Werte erreicht (Abb. 3, 4). Zu diesem Zeitpunkt ist die Aktivität auch nach reiner Formolfixierung, die den Film recht resistent macht, demonstrabel. 6 d p.c. konnte ich keine Bevorzugung bestimmter Partien der Blastozyste bemerken. 7 d p.c. ist immer wieder eine Betonung des antimesometralen Bereichs deutlich, der Film wird aber im gesamten Trophoblastbereich abgebaut (Abb. 3a). Der Keimscheibenbereich jedoch reagiert nur schwach; bei längerer Inkubation wird der Film auch hier aufgelöst (Abb. 3b). $7^1/_3$ d. p.c. ist die Aktivität auf die abembryonale Hemisphäre beschränkt; nicht nur die Keimscheibe, sondern auch der sie umgebende Trophoblast ist negativ (Abb. 4). 8 d p.c. ist die Reaktion wieder geringer als 7 d p.c. Die abembryonale Lokalisation ist erhalten, doch treten hier auch fast negative Partien auf, und es ist nun andererseits eine leichte Aktivität der embryonalen Hemisphäre erkennbar (Abb. 5).

Die Lokalisation war in diesen Tests nie sehr scharf (vgl. S. 345). Eine Zuordnung zu feineren Strukturen des Keims, etwa den Trophoblastsprossen, ist daher nicht sicher möglich; Formol-H_2O-fixierte Filme, die $7^1/_3$ d p.c. auch angegriffen werden, zeigen aber Abbauzonen besonders in der Umgebung der Trophoblastsprosse, so daß hier ein Aktivitätsmaximum vorliegen mag (Abb. 6). Auffällig ist, daß die Reaktion an Orten, an denen sich die Trophoblastsprosse bereits mit dem Uterusepithel verbunden haben, meist abgeschwächt oder negativ ist, ebenso dort, wo Trophoblastgewebe sich bei der Montage auf Endometrium geschlagen hat.

Die wirksamen Faktoren des Keims sind *sehr leicht diffusibel.* Bereits eine Spülung des auf den Film montierten Schnitts in physiologischer oder hypertoner NaCl-Lösung wie in konzentrierter Saccharose-Lösung führt zu einem völlig negativen Reaktionsausfall; die Aktivität des Uterussekretes und der Stromazellen bleibt dagegen erhalten.

Damit ist eine Inkubation in einem flüssigen Medium nicht möglich, und dies stellt ein schweres Handikap für die Austestung weiterer Eigenschaften dar (pH-Optimum, Wirkung von Aktivatoren und Hemmstoffen, Hitzeinaktivierung).

Tabelle 1. *Proteinasen (Substratfilmtests)*

	Unbesamt	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 +	+	∅	+
Trophoblast						∅	∅	(+) bis +	+++	++++[a]	+ bis ++
Hüllen	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	[b]	[b]	[b]	
Tube											
Sekret	∅	∅	∅	∅	∅						
Epithel	∅	∅	∅	∅	∅						
Stroma	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]						
Uterus											
Sekret			(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+
Epithel			∅	∅	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]
Stroma			∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]	∅[c]

+, ++, +++, ++++: positiver bis sehr stark positiver Ausfall der Reaktion. +++ bis ++++: Zwischenwert zwischen +++ und ++++, oder Stärke der Reaktion an verschiedenen Orten wechselnd. ∅: negativer Ausfall der Reaktion. (+): Eingeklammerte Werte stehen für unsichere Reaktionsausfälle.

[a] antimesometral.

[b] wegen der starken Diffusion des Enzyms nicht gesondert bewertbar.

[c] leichter Abbau im Bereich einzelner, disseminiert liegender Zellen.

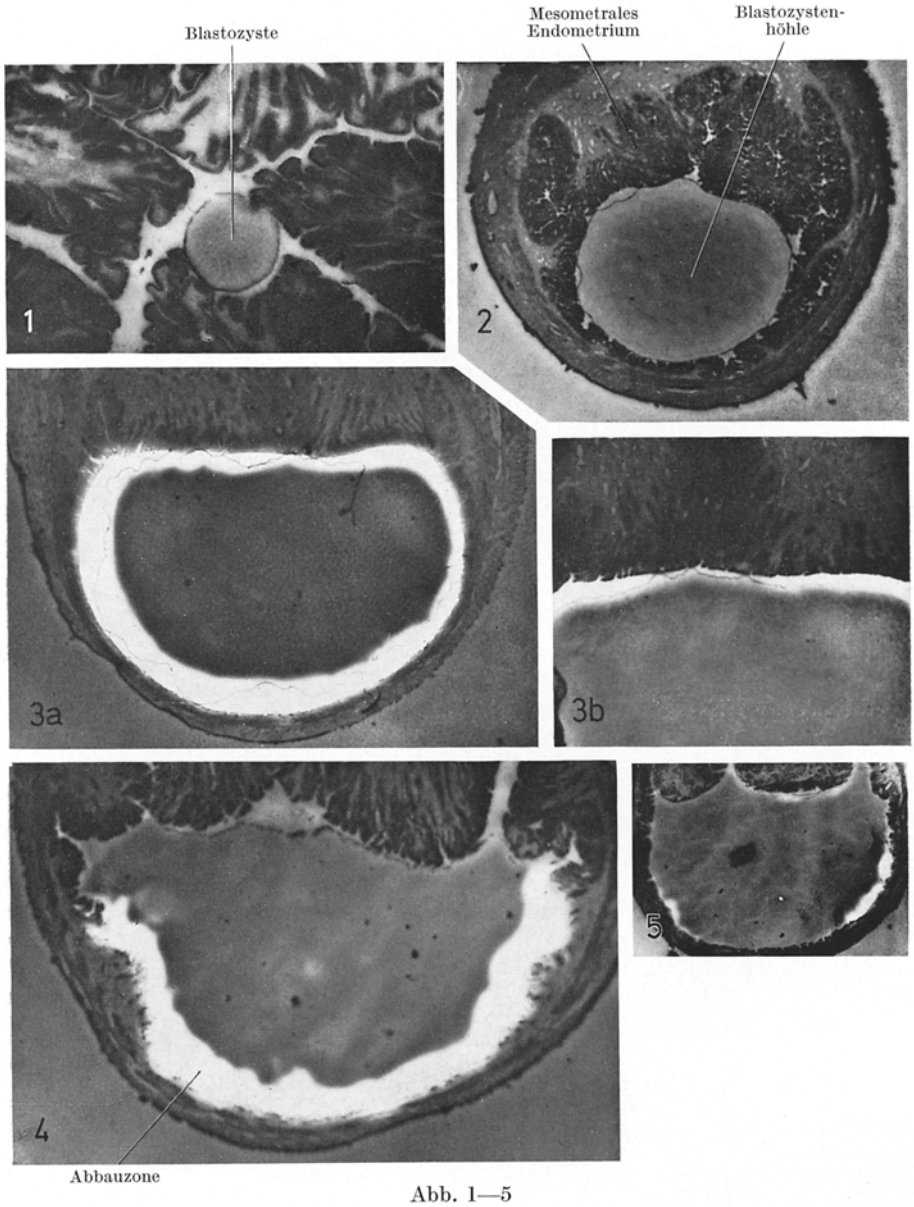

Abb. 1—5

Abb. 1. Proteolytische Aktivität: Gelatine-Substratfilmtest. Keim im Uterus, 5 d p.c. pH 5,2; Inkubation 5 h. 25×. Leichte Aufhellung des Films im Bereich des Uteruslumens, keine Aktivität des Keims

Abb. 2. Proteolytische Aktivität: Gelatine-Substratfilmtest. Keim im Uterus, 6 d p.c. pH 5,2; Inkubation $4^1/_2$ h. 10×. Keine deutliche Aktivität des Keims

Abb. 3a u. b. Proteolytische Aktivität: Gelatine-Substratfilmtest. Keim im Uterus, 7 d p.c. a Übersicht, 10×. pH 5,2; Inkubation 5 h. Breite Abbauzone im Bereich des Keims, besonders antimesometral. b Keimscheibe, 10×. pH 7,4; Inkubation $3^1/_2$ h. Aktivität im Bereich des Trophoblasten deutlich, im Bereich der Keimscheibe nur sehr gering

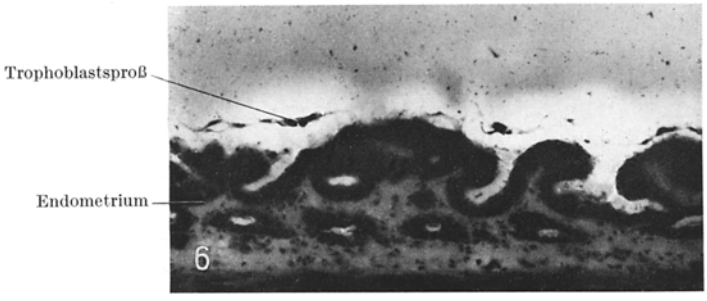

Abb. 6. Proteolytische Aktivität: Gelatine-Substratfilmtest, aber Fixierung des Films hier in alkoholfreier (wäßriger) Formollösung. Inkubation 2 h. Keim im Uterus, $7^1/_3$ d p.c., antimesometral. 100×. Abbauzone um den Trophoblasten, besonders im Bereich von Trophoblastsprossen

Eine *pH-Abhängigkeit* habe ich sehr grob dadurch zu prüfen versucht, daß ich die Substratfilme vor der Montage des Schnitts in Phosphat-Puffer-Lösung habe quellen und anschließend wieder trocknen lassen. Das quantitative Verhältnis der beiden Komponenten des Puffers dürfte dabei an allen Orten des Films einigermaßen erhalten bleiben, da beide nicht flüchtig sind. Allerdings ist die Pufferkapazität gering und es ist nicht sicher, inwieweit sie effektiv ist, wenn nun der Schnitt mit seinen eigenen Puffersystemen auf dem Film montiert wird. Immerhin zeigt sich bei Testung von Puffern mit pH-Werten zwischen 5,2 und 8,0 ein verschieden starker Reaktionsausfall (nämlich verschiedene Aufhellungsgrade, eine verschiedene Breite der Abbauzone und eine verschiedene Geschwindigkeit, in der ein bestimmtes solches Ergebniss erreicht wird). 6 d p.c. scheint das pH-Optimum im Sauren zu liegen, $7^1/_3$ und 8 d p.c. im Alkalischen. 7 d p.c. wechseln die Ergebnisse bei verschiedenen Keimen, in einigen Fällen ist keine Bevorzugung eines bestimmten pH-Bereichs zu erkennen. Die Betonung der antimesometralen Keimpartien scheint mir 7 d p.c. bei alkalischem pH deutlicher zu sein; insgesamt ist die Varianz der Ergebnisse eines solchen Substratfilmtests aber so groß, daß man solche Unterschiede kaum bewerten kann.

Die pH-Abhängigkeit der Reaktion ist in diesen Tests also nicht sehr ausgeprägt. Es gibt aber andere Kriterien, die für eine *Enzymnatur der wirksamen Faktoren* sprechen: 1. Die Reaktion benötigt deutlich eine gewisse *Zeit:* Kontrollen, die ohne Inkubation sofort gefärbt werden, sind eindeutig negativ. 2. Eine *Temperatur* von 38° C ist offenbar nötig, da bei Zimmertemperatur keine

Abb. 4. Proteolytische Aktivität: Gelatine-Substratfilmtest. Keim im Uterus, $7^1/_3$ d p.c. pH 7,4; Inkubation $3^1/_2$ h. 10×. Breite Abbauzone in Bereich der (abembryonalen, antimesometralen) Invasionsorte. Embryonale Seite des Keims negativ. Uterussekret leicht aktiv. (Paraplazentarfurche)

Abb. 5. Proteolytische Aktivität: Gelatine-Substratfilmtest. Keim im Uterus, 8 d p.c pH 5,2; Inkubation 4 h. 5×. Antimesometral nur noch stellenweise stärkere Aktivität des Keims. Leichte Aktivität mesometral (in der Abb. oben)

klar positiven Ergebnisse erzielt werden (vgl. aber auch S. 345). 3. Durch Zusatz von $HgCl_2$ zum Puffer in einer Konzentration von 0,01 m ist die Aktivität vollständig *hemmbar*. NaF und Monojodessigsäure zeigen dagegen auch in Konzentrationen von 0,1 m nur fragliche, p-Chloromercuribenzoat gar keine Effekte, ebenso Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen und EDTA oder Ca^{++}. Höhere Konzentrationen sind nicht prüfbar, da hier offenbar unspezifische osmotische Effekte auftreten: Bei allen Stoffen (z. B. auch NaCl), sofern sie nicht wie $HgCl_2$ deutlich hemmend wirken, ist bei Konzentrationen von mehr als 0,1 m zu beobachten, daß die Abbauzone breiter und unschärfer wird und sich entlang aller Oberflächen ausbreitet. Eine Spülung der Schnitte nach der Montage auf dem Film in 80% Äthanol oder absolutem Methanol führt zu völlig negativem Reaktionsausfall, während Behandlung der Filme allein und Montage der Schnitte nach Trocknung des Films wieder das bekannte positive Resultat liefert. Der Grund dafür kann aber sein, daß das Enzym sehr leicht diffusibel ist (s. o.). Behandlung der montierten Schnitte mit Methanol- oder Äthanoldampf (Petrischalen bei 37° C 20 min) ist ohne Effekt, ebenso eine trockene Erhitzung auf 95° C für 10 min. Bei allen diesen Hemmungsexperimenten ist aber die Schwierigkeit der quantitativen Bewertung von Substratfilmtests zu beachten; nur ein exakt quantitativer biochemischer Test könnte Klarheit schaffen. Dies gilt besonders für die schwächeren Reaktionen von *Uterussekret* und *Stromazellen*. Die proteolytische Aktivität des Uterussekrets ist vielleicht etwas stärker bei saurem pH; gegenüber den anderen getesteten Einflüssen verhält sie sich ähnlich wie die des Keims. Die Stromazellenreaktion scheint ein pH-Optimum im Sauren zu haben.

Für alle mitgeteilten Beobachtungen gilt der Vorbehalt, daß Substratfilmtests eine geringe Empfindlichkeit, d. h. eine hohe Schwelle haben. Schwache Aktivitäten werden nicht erfaßt. Dies ist bei der Beurteilung des Verteilungsmusters zu beachten.

Abbau von Glykogen-Gelatine-Filmen

Wenn man für die Herstellung der Substratfilme anstelle reiner Gelatine ein Gemisch von Glykogen und Gelatine verwendet, läßt sich die proteolytische Aktivität des Kaninchenkeims besonders scharf lokalisieren, auch sind die notwendigen Inkubationszeiten sehr viel kürzer ($<$ 1 Std). Der Forderung nach einer chemisch eindeutigen Interpretierbarkeit der Ergebnisse genügt diese Methode aber nicht, da der Substratfilm aus zwei spaltbaren Komponenten besteht. Die Filme wurden in Anlehnung an die Methode des Amylasenachweises von Szemplinska u. a. (1962) hergestellt, fixiert wurde jedoch in Gendres Lösung. Zumindest nach dieser Fixierung wird mit den Glykogen-Gelatine-Filmen aber kein Glykogenabbau, sondern die proteolytische Aktivität des Keims erfaßt.

Methodik. Ausgangslösungen: A. Glykogenlösung 20% in Aqua dest. (w/v), frischer Ansatz; B. Gelatinelösung 5% in Aqua dest. (w/v); C. Gendres Fixierungsgemisch, frischer Ansatz (s. Pearse, 1968); D. Formollösung: Formol etwa 40 Gew.-% 20 ml, Aqua dest. 40 ml.

Herstellung der Substratfilme. 1. Glykogenlösung (A.) und Gelatinelösung (B.) auf 60° C erwärmen, mischen (A. 2 ml, B. 2,3 ml), Gemisch auf 60° C halten. 2. Auf einem Objektträger ausstreichen und trocknen wie bei der Herstellung von Gelatinefilmen (s. Denker, 1969b). 3. Fixieren in Gendres Lösung (C.) bei 0—4° C 8 Std. 4. Waschen in fließend Leitungswasser von 24° C, $\geq$ 20 min. Hierbei müssen die Filme stark quellen und sich vom Objektträger lösen; sie werden dann wie der Objektträger 2mal kurz in Aqua dest. gespült,

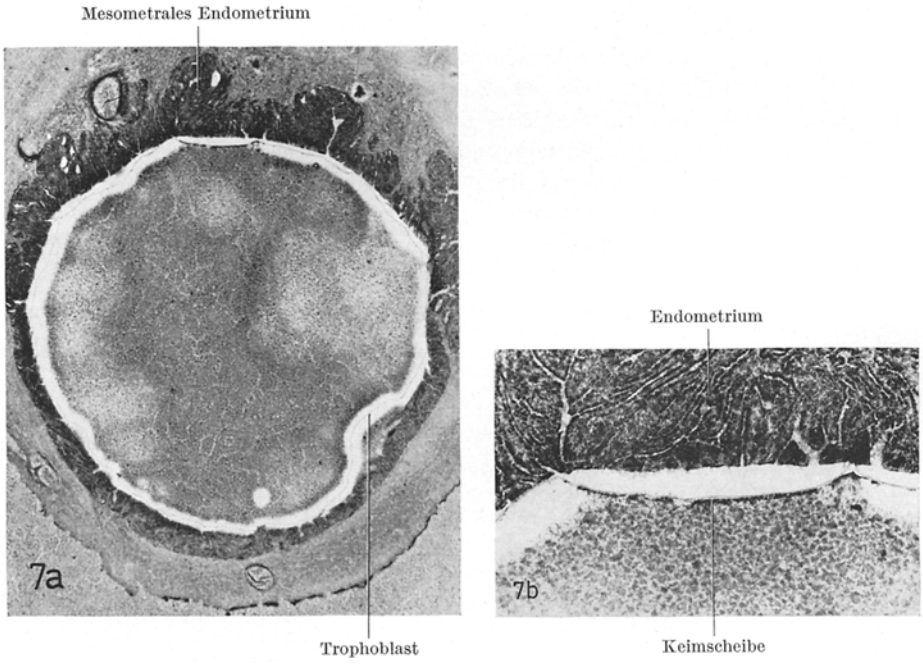

Abb. 7a u. b. Proteolytische Aktivität: Abbau von Glykogen-Gelatine-Filmen. Keim im Uterus 7 d p.c. Kein Puffer; Inkubation 2 h. PAS-Hämalaun. a Übersicht, 10×. Abbau im gesamten Keimbereich. Keimscheibe (mesometral) in der Abb. oben. Aktivität auch im Lumen der Krypten des Endometriums, besonders mesometral. b Keimscheibe der Abb. 7a, 45×. Abbau des Films nur an der äußeren Oberfläche der Keimscheibe

auf dem Objektträger ausgebreitet und an der Luft getrocknet. Die Filme sind, bei Zimmertemperatur trocken gelagert, mehrere Wochen lang haltbar.

Ausführung des Tests: Wie im Fall von reinen Gelatinefilmen (s. S. 345). Färbung durch die PAS oder mit verdünnter Lugolscher Lösung oder mit HgBPB (s. Pearse, 1968). Nach PAS oder HgBPB ist Entwässerung und Einschluß in Eukitt möglich.

Ergebnisse. (vgl. Abb. 7). Nativschnitte vom Stadium 7 d p.c. wurden verwendet; sie erbrachten Ergebnisse, die ganz denen entsprachen, die man bei Verwendung reiner Gelatinefilme erhält: Eine Abbauzone liegt in der gesamten Zirkumferenz des Keims, oft ist sie *antimesometral* breiter. Im Bereich der Keimscheibe ist sie am schmalsten und liegt an deren Außenseite (s. Abb. 7b). Eine schwächere Aufhellung ist in den Furchen und Krypten der Uterusschleimhaut erkennbar.

Die beobachteten biochemischen Eigenschaften der wirksamen Faktoren entsprechen wieder den Verhältnissen beim Abbau von reinen Gelatinefilmen (S. 346ff.). Nachfixierung der Substratfilme in Formol macht sie fast vollständig resistent. Die Abbauzonen zeigen sich nach Glykogenfärbung wie PAS und Lugol ebenso wie bei Anwendung der Proteinfärbung Hg-Bromphenolblau (HgBPB). Im letzteren Fall allerdings sieht man nicht zu breite Abbauzonen von feinen Gelatinesträngen überspannt; PAS oder Lugol sind an dieser Stelle negativ.

Für die begünstigende Wirkung des Glykogenzusatzes zur Gelatine (kürzere Inkubationszeiten) sei daher folgende hypothetische Deutung gegeben: 1. Durch die Mischung mit Glykogen wird die Konzentration der Gelatine vermindert, so daß die Proteolyse an einem histologischen Ort früher vollendet sein kann. 2. Durch die Quellung, Loslösung und nachfolgende Antrocknung erhält der Glykogen-Gelatine-Film eine mechanische Spannung. Dadurch weicht er an Orten, an denen die Gelatine erst partiell hydrolisiert ist, auseinander; es entsteht hier also ein Spalt zu einem Zeitpunkt, zu dem ein reiner Gelatinefilm erst eine leichte Verminderung der Färbbarkeit zeigen würde. Resultat sind die beschriebenen fädig ausgezogenen Gelatinereste und eine größere Dichte des geschrumpften Filmteils im Zentrum des Keims. Die Keimscheibe haftet mit ihrer inaktiven Innenseite nach wie vor an diesem zentralen Filmteil und wird dadurch nach innen konvex durchgebogen (vgl. Abb. 7b).

Methode nach Cunningham

Bei dem Substratfilmtest nach Cunningham (1967) werden vorgefärbte Gelatinefilme verwendet. Beabsichtigt ist die Ausschaltung von Diffusionsartefakten, die bei Färbung des Films nach der Inkubation durch den Schnitt hindurch vorkommen können. Die Prozedur der Filmherstellung ist aber sehr umständlich.

Die Ergebnisse gleichen bei Verwendung von „15-min-FBB-Filmen" bei ähnlicher Ausführung des Tests prinzipiell ganz denen, die mit ungefärbten Filmen erzielt wurden (vgl. S. 346), sind aber wegen der insgesamt schwächeren Färbung der Filme weniger deutlich. Man kann wiederum die bereits besprochenen biochemischen Eigenschaften der wirksamen Faktoren feststellen (vgl. S. 346ff., besonders hinsichtlich EDTA und Ca^{++}). „45 min-FBB-Filme" sind 7 d p.c. vollständig resistent.

Fotoplatten-Methode

(Adams u. Tuqan, 1961; vgl. auch Bélanger u. Migicovsky, 1963, Roitt u. a. 1965).

Zur Anwendung kam das Stadium 7 d p.c. — In keinem Fall, weder bei Inkubation in feuchter Kammer noch in flüssigem Inkubationsmedium, habe ich mit dieser Methode an meinem Material irgendeinen Effekt eindeutig demonstrieren können. Erprobt wurden zwei Fabrikate von Fotoplatten (Gevaert Scientia 19 D 50 und Perutz Diaplatten). Eine Spülung der Platten (vor ihrer Verwendung) in Cysteinlösung, wie sie von Roitt u.a. durchgeführt wurde, änderte nichts am negativen Ausfall.

Zu beachten ist, daß Fotoplatten reichlich Silber enthalten, die mit den anderen Methoden demonstrierte Aktivität aber durch Sublimat vollständig gehemmt wird, so daß auch eine Hemmung durch Ag denkbar ist. Blandau (1949) konnte die proteolytische Aktivität der Meerschweinchen-Blastozyste ebenfalls mit Fotoplatten nicht demonstrieren.

2. Leucinaminopeptidase (LAP; EC 3.4.1.1) (Nachlas u.a. 1957)

Methodik. s. Pearse, 1960. Die Spezifität der Methode für LAP ist nicht ganz sicher (vgl. Mohr, 1968; Sylvén u. Snellman, 1968; Pearse, 1960), wird aber allgemein zunächst angenommen.

Tabelle 2. *Leucinaminopeptidase (LAP)*

	Unbesamt	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 + +[a]	Ø bis +
Hüllen	Ø	(+)[b]	(+)[b]	(+)[b]	Ø	Ø	(+)	(+)	(+)	(+)	
Tube											
Sekret	Ø	Ø	Ø bis (+)	Ø bis (+)	Ø bis +						
Epithel	(+)	(+)	(+)	(+)	(+) bis +						
Stroma	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø						
Uterus											
Sekret			Ø	Ø	+	+ +	+ +	+ bis + +	+	(+)	(+)
Epithel			(+)	(+)	(+) bis + +	(+) bis + + +	+ + bis + + + +	+ + bis + + +	+ +	+	(+) bis +
Stroma			(+)	(+)	(+) bis +	+	+	+	(+) bis +	(+)	(+)

Erklärung der Symbole und Abkürzungen s. Tabelle 1.
[a] Trophoblastsprosse.
[b] Zona.

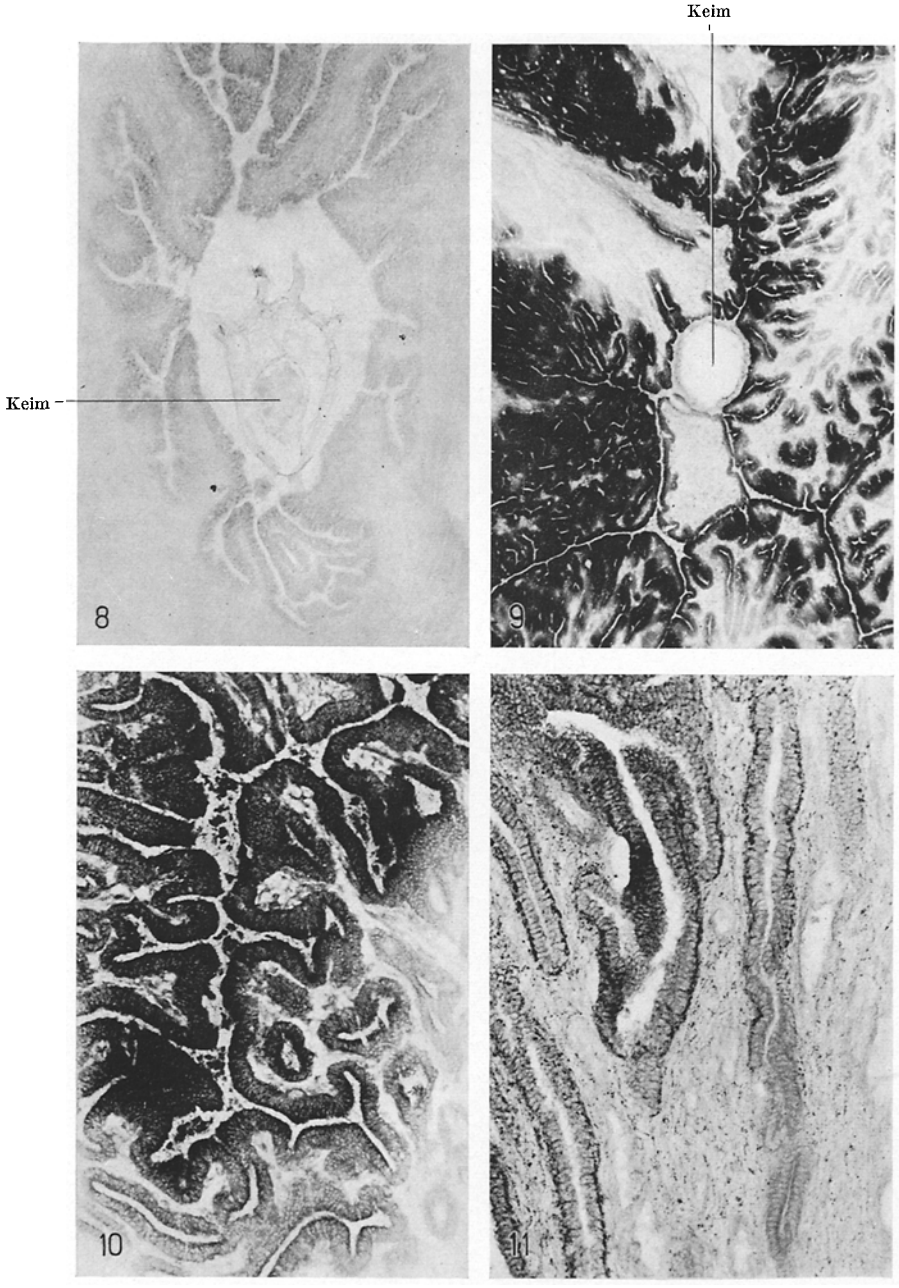

Abb. 8. LAP. Keim in der Tube, 3 d p.c. 70×. Nur leichte Anfärbung von Keim und Tubenepithel

Abb. 9. LAP. Keim im Uterus, 4 d p.c. 25×. Reaktion stark positiv in der Tiefe der Schleimhautfurchen, mäßig in der Umgebung des Keims und im Keim

Abb. 10. LAP. Endometrium, 5 d p.c. 100×. Starke diffuse Anfärbung von Epithel und Sekret im Zentrum einer Furche. Betonung der apikalen Zellabschnitte

Abb. 11. LAP. Endometrium, 6 d p.c. 160×. Granuläre Färbung der basalen Zellabschnitte des Epithels. In den tiefen Partien der Krypten nur schwache Reaktion, apikal

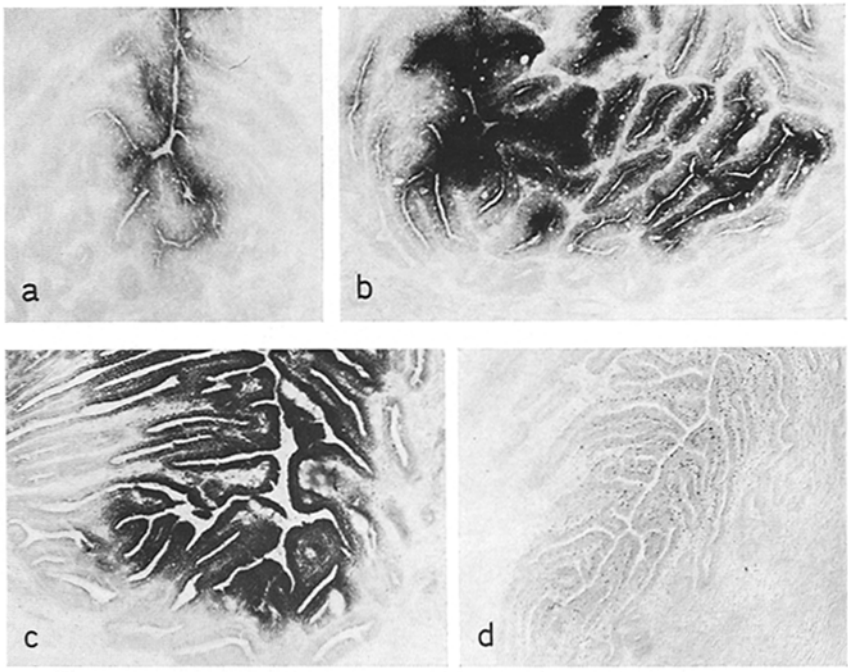

Abb. 12a—d. LAP. Endometrium. 60×. (a) 3 d p.c. Beginnende Reaktion des Epithels im Zentrum einer Schleimhautfurche. (b) 4 d p.c. Reaktion weiter ausgebreitet. (c) 5 d p.c. Starke Reaktion des Epithels im Bereich einer Furche. (d) 7 d p.c. Kaum noch eine Reaktion

Ergebnisse. (vgl. Tab. 2; Abb. 8—12). Der *Keim* (Abb. 8, 9) zeigt in allen Stadien nur eine geringe Aktivität, am deutlichsten noch im Plasma von Tubenkeimen (mit gelegentlicher Betonung der Keimperipherie), im Trophoblasten junger Blastozysten, an der äußeren Oberfläche der Keimscheibe 7 d p.c. und in den Trophoblastsprossen $7^1/_3$ d p.c. Die Zona von Furchungsstadien ist oft leicht getönt, die Mukoproteidschicht aber negativ.

In der *Tube* (vgl. Abb. 8) reagiert das Sekret meist negativ; gegen Ende der Tubenwanderung des Eies tritt hier eine schwache Färbung auf. Das Epithel ist in der Pars ampullaris so gut wie negativ, in der Pars isthmica sehr schwach und wechselnd gefärbt, besonders 3 d p.c., wobei eine Betonung der apikalen Zellabschnitte zu beobachten ist (daneben auch eine leichte Betonung der basalen Region). Das Stroma reagiert praktisch negativ.

Das *Uterusepithel* zeigt ein sehr auffälliges Verhalten. Nachdem es noch 45 h p.c. praktisch negativ gewesen ist, tritt 3 d p.c. eine deutliche Aktivität auf, die bis 5 d p.c. sehr stark wird (s. Abb. 12). Ihren Ausgang nimmt die Reaktion bei ihrer Ausbreitung vom Gebiet der Mündungen der Krypten in die Schleimhautfurchen. 5 und 6 d p.c. ist der größte Teil des Epithels bis auf die tiefsten Abschnitte der Krypten sehr stark positiv. Etwas bevorzugt werden die mesometralen Bereiche des Endometriums. Zu dieser Zeit ist stets auch eine deutliche Anfärbung des Uterussekrets zu beobachten (Abb. 10), allerdings ist die Lokalisation bei dieser Methode nicht sehr scharf und eine artefizielle Färbung der

Umgebung stark positiver Orte möglich (vgl. Pearse, 1960). Ab 6 d p.c. treten stark tingierte Granula an der Basis der Epithelzellen auf (Abb. 11); bis dahin hat das Maximum in den Zellen apikal gelegen, wo es von jetzt an vor allem noch in der Umgebung des Keims zu sehen ist. 7 d p.c. ist das Reaktionsprodukt basal und apikal grob granulär, insgesamt aber spärlicher. Bis 8 d p.c. geht die Reaktion des Uterusepithels auf sehr geringe Anfärbungen zurück. Antimesometral reagieren im Gegensatz zu mesometral die tiefen Abschnitte der Krypten am stärksten. Stromazellen sind im Uterus leicht, aber deutlich positiv, vor allem um 5—6 d p.c.

Diskussion

In den ersten Tagen des Uterusaufenthalts des Kaninchenkeims ist der auffälligste Befund das Verhalten der *LAP* (vgl. S. 355): Während sie zur Zeit der Tubenwanderung im *Uterusepithel* kaum nachweisbar war, wird sie zum Zeitpunkt des Übertritts des Keims in den Uterus ($3^1/_3$ d p.c.) deutlich positiv und erreicht 4—5 d p.c. eine außerordentlich hohe Aktivität. Besonders interessant ist, daß sie kurz darauf (bis 8 d p.c.) schon wieder fast zu den geringen Ausgangswerten zurückgeht. Diese Aktivität fällt also zeitlich zusammen mit der Blastozystenbildung und der Phase der Ernährung des Keims über das Uterussekret. Man darf wohl vermuten, daß ihr eine Bedeutung für die Bereitstellung der Proteine des Uterussekrets zukommt. Einige dieser Proteine haben wichtige Funktionen für die Entwicklung der Blastozyste (vgl. Beier, 1967; Daniel und Krishnan, 1967 b; Krishnan u. Daniel, 1967; Kirchner, 1969). Ihre Sekretion wird hormonell gesteuert (Beier, 1968). Sicher wird auch die LAP-Aktivität hormonell reguliert (zum Östradioleinfluß bei der Ratte vgl. Schmidt u. Mitarb., 1966). Kathepsin (eine Beziehung zwischen LAP und der Kathepsingruppe wird diskutiert, s. Sylvén u. Snellman, 1968) verhält sich bei der Ratte ähnlich (Wood u. Psychoyos, 1967). Zur Gesamt-Proteasen-Aktivität, wie sie Schwick (1963) im Uterussekret bestimmte, besteht keine echte Korrelation; er beschreibt einen Anstieg der Aktivität bis $6^2/_3$ d p.c., was besser mit den Ergebnissen meiner Substratfilmtests (Tabelle 1) übereinstimmt. Befunde an Uterushomogenaten lassen sich wegen der verschiedenen methodischen Voraussetzungen schlecht vergleichen; hier geht die Aktivität des bindegewebigen Stromas und des Myometriums mit ein (vgl. Halban u. Frankl, 1910; Frankl u. Aschner, 1911; Schaub, 1964; Woessner, 1965; Rich, 1965; Espey u. Rondell, 1967). Eine weitere Untersuchung der LAP-Aktivität mit biochemischer Methodik, vor allem hinsichtlich der Abhängigkeit vom Hormonstatus, läuft.

Die *Implantation* der Blastozyste im Uterus ist mit besonderen biochemischen Leistungen der beteiligten Strukturen verknüpft. Der auffälligste Befund ist die hohe *proteolytische Aktivität des Trophoblasten* (S. 346). Sie ist zeitlich und räumlich streng mit den Vorgängen der Auflösung der Blastozystenhüllen und der Invasion ins Endometrium verknüpft. Nach Böving (1954 ff.) sind die Trophoblastsprosse („trophoblastic knobs"), symplasmatische Verdickungen des abembryonalen Trophoblasten, das aktive Element bei diesem Prozeß. Sie stehen in enger Wechselbeziehung zum mütterlichen Gewebe. Stets sind es Uterusepithelzellen, die direkt über weiten Kapillaren liegen, zwischen die die Trophoblast-

sprosse eindringen. Ein Stoffaustausch zwischen Keim und Mutter, der exakt an diesen Orten erfolgt, spielt dabei eine Rolle. Er wurde von Böving hinsichtlich der anorganischen Ionen untersucht. Die „trophoblastic knobs" beschreibt er (1964 a, 1966) als komplex aufgebaute Gebilde aus Symplasma und innerer und äußerer Bedeckung durch platte Zellen, die bei alkalischer Reaktion „platzen". Dabei dürfte die hohe proteolytische Aktivität, die ich zeigen konnte und die offenbar vor allem von diesen Trophoblastsprossen ausgeht, sehr gezielt zur Wirkung kommen. Sie hat sicher eine wesentliche Bedeutung für die Auflösung der Blastozystenhüllen, die an diesen Orten beginnt. Sie könnte ferner an der Lockerung der Verbindung zwischen den Uterusepithelzellen beteiligt sein. Die beobachteten biochemischen Eigenschaften machen sie für diese Aufgabe gut geeignet: sehr große Diffusibilität und Wirksamkeit bei dem alkalischen pH des Uterusmilieus (S. 346ff.).

Über eine solche proteolytische Aktivität des Keims wurde bei *anderen* Arten in einer Reihe von Fällen berichtet; sie wurde jedoch nicht genauer lokalisiert oder charakterisiert (Meerschweinchen: Graf von Spee, 1901; Blandau, 1949; zu Plazentationsstadien des Menschen vgl. Gräfenberg, 1910; Polano, 1907; Caffier, 1929a und b; Schmidt-Matthiesen, 1967, 1968; Arbacia vgl. Runnström, 1949). Morphologische Hinweise auf eine enzymatische Auflösung der Hüllen finden sich für das Kaninchen bei Böving sowie bei Enders u. Schlafke (1965), für das Meerschweinchen bei Blandau (1961). Trophoblastriesenzellen werden auch bei der Maus beschrieben und in Zusammenhang mit der Implantation gebracht (Dickson, 1963).

Zur LAP ergab sich histochemisch keine echte lokalisatorische und zeitliche Beziehung; immerhin ist sie in den Trophoblastsprossen deutlich aktiv, wo sie für den intrazellulären Proteinabbau eine Bedeutung haben mag. Zur Aktivität von LAP und Kathepsinen in der Plazenta s. Vollrath (1965), Christie (1967), Zsolnai u.a. (1967).

Die proteolytische Aktivität des Keims unterliegt sicher zahlreichen *Regulationen.* Beier (1967) konnte im Uterussekret Proteaseninhibitoren nachweisen. Inhibitoren für das Enzym des Keims kommen offenbar besonders im Endometrium vor: In meinen Substratfilmtests war keine Aktivität des Trophoblasten nachweisbar, wenn er in Kontakt mit dem Endometrium war (physiologisch oder artefiziell bei der Montage). Zu solchen Inhibitoren aus der Uterusschleimhaut vgl. auch Gräfenberg (1910), Halban u. Frankl (1910); zu Inhibitoren im Serum in der Schwangerschaft s. Gräfenberg (1909). Vermutlich wird das ganze System hormonell kontrolliert.

Neben proteolytischen Enzymen werden auch *Glykosidasen* an den Vorgängen der Auflösung der Blastozystenhüllen und der Verbindung der Uterusepithelzellen beteiligt sein, denn diese Strukturen sind reich an sMS (vgl. Denker, 1969a, 1971b). Die Blastozystenhüllen und die Oberfläche des Uterusepithels enthalten viel gebundene Neuraminsäure (NA). Die letzten Reste der in Auflösung begriffenen Hüllen scheinen dagegen daran verarmt zu sein. Beseitigt man die NA der Blastozystenhüllen, so werden sie durch Proteasen leichter spaltbar (Denker, 1969a). So wäre es gut denkbar, daß zusammen mit der proteolytischen Aktivität des Keims (oder als Wegbereiter) *Neuraminidase* (NAase) wirkt. Mein Versuch, sie histochemisch nachzuweisen, ergab aber eine Lokalisation weit entfernt vom Ort

dieser Vorgänge, nämlich im Bereich des Uterusepithels der Paraplazentarfurchen (Denker, 1971b).

Alkylsulfatasen sind ein Pendant zur NAase insofern, als sie die zweite Art von sauren Gruppen der MS, die Schwefelsäureester, abspalten. Sie sind aber heute histochemisch noch nicht nachweisbar (vgl. Dohlman u. Friedenwald, 1955). Andererseits zeigen die Trophoblastsprosse eine Aktivität von β-Glukuronidase, β-Galaktosidase und Glukosaminidase (Denker, 1971b). Da auch andere Kohlenhydratgruppen als NA den MS eine gewisse Resistenz gegenüber Proteolyse verleihen (Faillard u. Pribilla, 1964), könnten diese Enzyme bei der Implantation mitwirken.

Aufgrund dieser Beobachtungen und Überlegungen erscheint es gerechtfertigt, die Implantation des Kaninchenkeims im Uterus aufzufassen als einen Vorgang, der im wesentlichen durch aktive biochemische Leistungen des Keims bewirkt wird. Dabei kommt seiner proteolytischen Aktivität, die hier demonstriert werden konnte, eine besondere Bedeutung zu.

Danksagung. Herrn Prof. Dr. G. Petry möchte ich dafür danken, daß er mir die Möglichkeit gab, diese Untersuchungen als Medizinalpraktikant in seinem Institut durchzuführen. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. F. Seidel (Zoologisches Institut Marburg) dafür, daß ich auf einen Teil des bei ihm erarbeiteten Materials zurückgreifen konnte, Herrn Privatdozent Dr. W. Kühnel (Anatomisches Institut Marburg) für die Weitergabe seiner Erfahrungen in der Glykosidasen-Histochemie und Herrn Prof. Dr. G. H. M. Gottschewski (Max-Planck-Institut für Immunbiologie Freiburg) für die Möglichkeit, die Arbeit als Assistent bei ihm abzuschließen.

Literatur

Adams, C. W. M., Tuqan, Y. H.: The histochemical demonstration of proteases by a gelatin-silver film substrate. J. Histochem. Cytochem. **9**, 469—472 (1961).

Beier, H. M.: Biochemisch-entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Proteinmilieu für die Blastozystenentwicklung des Kaninchens (*Orystolagus cuniculus*). Dissertation Nat. Fak. Marburg (1967a). Zool. Jb. Abt. Anat. u. Ontog. **85**, 72—190 (1968).

— Veränderungen am Proteinmuster des Uterus bei dessen Ernährungsfunktion für die Blastozyste des Kaninchens. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Heidelberg, S. 139—148 (1967b).

— Uteroglobin: A hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **160**, 289—291 (1968).

Bélanger, L. F., Migicovsky, B. B.: Histochemical evidence of proteolysis in bone: the influence of parathormone. J. Histochem. Cytochem. **11**, 734 (1963).

Blandau, R. J.: Embryo-endometrial relationships in the rat and guinea pig. Anat. Rec. **104**, 331—359 (1949).

— Biology of eggs and implantation. Sex and internal secretions, vol. II (Young, W. C., ed.), p. 797—882. Baltimore: The Williams and Wilkins Comp. 1961.

Böving, B. G.: Blastocyst-uterine relationships. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. **19**, 9—28 (1954).

— Rabbit egg coverings. Anat. Rec. **127**, 270 (1957).

— Endocrine influences on implantation. Recent progress in the endocrinol. of reproduct. (Lloyd, C. W. ed.), p. 205—226. New York: Academic Press 1959.

— Anatomical analysis of rabbit trophoblast invasion. Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol. **37**, 33—55 (1962).

— Implantation mechanisms. Mechanisms concerned with conception (Hartman, C. G., ed.), p. 321—396. New York: Pergamon Press 1963.

— (Mechanisms of implantation of the ovum). Yb. Carnegie Inst. Wash. **63**, 554—556 and plates 9—10 (1964a).

— Das Eindringen des Trophoblasten in das Uterusepithel. Klin. Wschr. **10**, 467—475 (1964b).

— Some mechanical aspects of trophoblast penetration of the uterine epithelium in the rabbit. Ciba Foundation Study Group No 23 on Egg Implant. (Wolstenholme, G. E. W., O'Connor, M., eds.), p. 72—93. London: Churchill 1966.

Caffier, P.: Die proteolytische Fähigkeit von Ei und Eibett. Zbl. Gynäk. **53**, 1910—1911 (1929a).

— Die proteolytische Fähigkeit von Ei und Eibett. (Experimentelle Studien mit Chorion und Dezidua). Zbl. Gynäk. **53**, 2410—2425 (1929b).

Christie, G. A.: Comparative histochemical distribution of "leucine amino-peptidase" in the placenta and foetal membranes. Histochemie **10**, 272—277 (1967).

Cunningham, L.: Histochemical observations of the enzymatic hydrolysis of gelatin films. J. Histochem. Cytochem. **15**, 292—298 (1967).

Daniel, J. C., Jr., Krishnan, R. S.: A protein fraction from the rabbit uterus that promotes blastulation. J. Cell Biol. **35**, 30 A (1967).

Daoust, R.: Localization of desoxyribonuclease in tissue sections: A new approach to the histochemistry of enzymes. Exp. Cell Res. **12**, 203—211 (1957).

— Amano, H.: The localization of ribonuclease activity in tissue sections. J. Histochem. Cytochem. **8**, 131—134 (1960).

Denker, H. W.: Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. Diss. Nat. Fak. Marburg, 1969a. Zool. Jb. Abt. allg. Zool. u. Physiol. **75**, 141—245 und 246—308 (1970).

— Substratfilmtest für den Proteasennachweis. 13. Sympos. Ges. f. Histochemie, Graz (1969b). Acta histochem. (Jena), Suppl. (im Druck).

— Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. I. Glykogenstoffwechsel. Histochemie **25**, 256—267 (1971a).

— Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. II. Glykosidasen. Histochemie **25**, 268—285 (1971b).

Dickson, A. D.: Trophoblastic giant cell transformation of mouse blastocysts. J. Reprod. Fertil. **6**, 465—466 (1963).

Dohlman, C.-H., Friedenwald, J. F.: Pitfalls in histochemistry: An unsuccessfull attempt to demonstrate mucoid sulfatase activity in mammalian tissue. J. Histochem. Cytochem. **3**, 492 (1955).

Enders, A. C., Schlafke, S. J.: The fine structure of the blastocyst: some comparative studies. Ciba Foundation Sympos. on Preimplantation Stages of Pregnancy (Wolstenholme, G. E. W., O'Connor, M., eds.), p. 29—59. London: Churchill 1965.

Espey, L. L., Rondell, P.: Estimation of mammalian collagenolytic activity with a synthetic substrate. J. appl. Physiol. **23**, 757—761 (1967).

Faillard, H., Pribilla, W.: Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der Neuraminsäure-haltigen Kohlenhydratgruppe von „Intrinsic-Factor"-Mukoiden menschlicher Magenschleimhaut. Klin. Wschr. **42**, 686—693 (1964).

Frankl, O., Aschner, B.: Zur quantitativen Bestimmung des tryptischen Fermentes in der Uterusmukosa. Gynäkol. Rdsch. (Wien) **5**, 647—654 (1911).

Gräfenberg, E.: Der Antitrypsingehalt des mütterlichen Blutserums während der Schwangerschaft. Münch. med. Wschr. **56**, 702—704 (1909).

— Beiträge zur Physiologie der Eieinbettung. Z. Geburtsh. Gynäk. **65**, 1—35 (1910).

Halban, J., Frankl, O.: Zur Biochemie der Uterusmukosa. Gynäkol. Rdsch. (Wien) **4**, 471—484 (1910).

Kirchner, Chr.: Untersuchungen an uterusspezifischen Glykoproteinen während der frühen Gravidität des Kaninchens *Oryctolagus cuniculus*. Diss. Nat. Fak. Marburg, 1969. Wilhelm Roux' Archiv **164**, 97—133 (1969).

Krishnan, R. S., Daniel. J. C., Jr.: "Blastokinin": Inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. Science **158**, 490—492 (1967).

Mohr, H.-J.: Das Lysosomenproblem, dargestellt am Beispiel der Leucinaminopeptidase. Gegenbauers morph. Jb. **111**, 454—461 (1968).

Pearse, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied, 2nd ed., 1960, 3rd ed., part I. London: Churchill 1968.

Polano, O.: Über Verschwinden einer Schwangerschaft. Ein Beitrag zur Lehre von der Blasenmole. Z. Geburtsh. Gynäk. **59**, 453—466 (1907).

Rich, R. A.: Uterine, ovarian and adrenal proteases in the normally cycling and pseudopregnant rat. Diss. Utah State Univ. Diss. Abstr. **26** (6), 3457 (1965).

Roitt, I. M., Ballard, K. J., Holt, S. J., Doniach, D., Torrigiani, G., Shapland, C.: Histochemical localization of pH 3.5 protease in the human thyroid gland. Current topics in thyroid res. (Cassano, C., Andreoli, M., eds.), p. 29—35. New York: Academic Press 1965.

Runnström, J.: Some results and views concerning the mechanism of initiation of development in the sea urchin egg. Publ. Staz. zool. (Napoli) **21** (Suppl.), 9—21 (1948/1949).

Schaub, M. C.: Eigenschaften und intrazelluläre Verteilung eines Kollagen abbauenden Kathepsins. Helv. physiol. pharmacol. Acta **22**, 271—284 (1964).

Schmidt, H., Walther, H., Voigt, K. D.: Der Einfluß von Östradiol auf den Gehalt des Rattenuterus an Nukleinsäuren, Protein und Enzymaktivitäten. Enzym. biol. clin. **7**, 239—248 (1966).

Schmidt-Matthiesen, H.: Die fibrinolytische Aktivität von Endometrium und Myometrium, Dezidua und Plazenta, Kollum- und Korpuskarzinomen. Physiologie, Pathologie und klinisch-therapeutische Konsequenzen. Fortschr. Geburtsh. Gynäk. **31**, 1—117 (1967).

— Endometrium und Nidation beim Menschen. Z. Geburtsh. Gynäk. **168**, 113—125 (1968).

Schwick, H. G.: Untersuchungen über die Zusammensetzung der Uterus- und Blastozystenflüssigkeit des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*). Diss. Nat. Fak. Marburg 1963 (= Chemisch-entwicklungsphysiologische Beziehungen von Uterus zu Blastozyste des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*). Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **156**, 283—343 (1965).

Spee, F. Graf v.: Die Implantation des Meerschweincheneies in der Uteruswand. Z. Morph. Anthropol. **3**, 130—182 (1901).

Sylvén, B., Snellman, O.: Studies on the histochemical "leucine aminopeptidase" reaction. V. Cathepsin B as a potential effector of LNA hydrolysis. Histochemie **12**, 204—243 (1968).

Szemplinska, Halina, Sierakowska, Halina, Shugar, D.: Histochemical localization of hyaluronidase and amylase by the film-substrate technique. Acta biochim. pol. **9**, 239—244 (1962).

Vollrath, L.: Das Enzymmuster der Meerschweinchenplacenta und seine Veränderungen im Verlauf der Schwangerschaft. Histochemie **4**, 397—419 (1965).

Woessner, J. F., Jr.: Acid hydrolases of the rat uterus in relation to prenancy, post partum involution and collagen breakdown. Biochem. J. **97**, 855—866 (1965).

Wood, C., Psychoyos, A.: Activité de certains 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).

Zsolnai, B., Somogyi, J., Szarvas, Z.; Székely, L.: Die eiweißspaltenden Enzyme in der Schwangerschaft. III. Die Aktivität und subzelluläre Lokalisation von Leucinaminopeptidase, Kathepsin-B und Kathepsin-D in der unreifen und reifen Placenta. Arch. Gynäk. **205**, 1—11 (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