H. W. Denker, Freiburg:

Furchung beim Säugetier: Differenzierung von Trophoblast- und Embryonalknotenzellen

Mit 2 Abbildungen im Text

Die Furchung ist beim plazentalen Säugetier total. Das Ergebnis ist ein Zellhaufen, der üblicherweise ohne weiteres der Morula anderer, holoblastischer Tiere gleichgesetzt wird (vgl. z. B. Amphibien). Das Schicksal dieser *zwei Arten von „Morulae"* ist aber sehr verschieden. Aus der typischen Holoblastier-Morula wird eine *Blastula*, die später gastruliert und ihr gesamtes Zellmaterial dem Aufbau des Embryonalkörpers beisteuert. Aus der Säuger-„Morula" dagegen wird eine *Blastozyste*, die aus embryonalem (Embryonalknoten) und extraembryonalem (Trophoblast) Material besteht. Ein Blastulastadium und ein Blastozöl gibt es beim Säugetier nicht. Die Blastozystenhöhle ist vielmehr im typischen Fall der direkte Vorläufer der Dottersackhöhle. Wenn es beim Säugetier ein Blastozöl gäbe, so müßte dieses im Embryonalknoten liegen und nur von Embryoblast- (nicht Trophoblast-) Zellen umgeben sein. Die Bildung der Keimblätter erfolgt ohne Zwischenschaltung eines solchen Blastulastadiums. Sie beginnt beim Kaninchen etwa einen Tag nach Bildung der Blastozyste (vgl. Denker, 1970a). Wenn man mit den typischen Holoblastiern vergleichen will, sollte man sich auf die Betrachtung der Embryonalknotenzellen und ihrer Vorläufer beschränken. Man könnte dann sogar sagen, daß beim Kaninchen die Furchung (des Embryonalknotenmaterials) nach Bildung der Blastozyste noch einen Tag andauert.

Unter „Furchung" versteht man aber beim Säugerkeim üblicherweise nur die Entwicklungsschritte bis zur Bildung der Blastozyste. Der wesentliche entwicklungsphysiologische Vorgang während dieser Säuger-„Furchung" ist die *Vorbereitung der Blastozystenbildung durch Differenzierung zweier Zellinien: präsumptive Embryonalknotenzellen und präsumptive Trophoblastzellen.* Entwicklungsphysiologische Experimente (Seidel, 1960) und Beobachtungen an Zellkulturen (Cole, Edwards und Paul, 1966) weisen darauf hin, daß die Differenzierung schon in sehr frühen Furchungsstadien, lange vor Bildung der Blastozyste, beginnt. Als besonders günstige Methode, diese zwei Zellinien morphologisch zu unterscheiden und zu verfolgen, erwies sich uns beim Kaninchen die Bromphenolblaufärbung (BPB bzw. HgBPB) von Paraffinschnitten nach FAE (Formol-Alkohol-Eisessig)-Fixierung (Denker, 1970b). Die Keime sollten stets isoliert fixiert werden. Eine Fixierung in der Tube bringt beim Kaninchen diese Unterschiede weniger klar zur Darstellung. Auf Grund zweier Kriterien können beim Kaninchen bestimmte Blastomeren als *präsumptive Trophoblastzellen* angesprochen werden: stärkere Farbstoffaufnahme und tangentiale Ausrichtung. Die *präsumptiven Embryonalknotenzellen* bilden einen kompakten Haufen rundlicher bis radiär gestellter, heller gefärbter Zellen, dem die Trophoblastzellen als einschichtige Kappe aufsitzen, ohne ihn aber vollständig zu umgeben (Abb. 1a—c). Diese topographischen Verhältnisse ließen sich zuerst im 8-Zell-Stadium zeigen; sie bleiben bis in die ältesten Furchungsstadien (64—128 Zellen) bestehen. Die Bedeckung der Embryonalknotenzellen durch die Trophoblastzellen wird offenbar erst bei der Bildung der Blastozyste vollständig. Daß diese Kappe während der Furchung immer nur einen Teil der Zirkumferenz bedeckt, ist wichtig für die Diskussion des Mechanismus der Differenzierung dieser zwei Zelltypen. Es spricht gegen die Auffassung, daß Furchungszellen

dadurch zu Embryonalknotenzellen determiniert werden, daß sie von anderen Blastomeren vollständig umgeben werden (TARKOWSKI und WRÓBLEWSKA, 1967; MINTZ, 1965); es spricht für den von SEIDEL vorgeschlagenen Mechanismus (SEIDEL, 1960, 1969; MULNARD, 1966).

Das Auftreten von morphologischen Unterschieden zwischen präsumptiven Trophoblast- und Embryonalknotenzellen in frühen Furchungsstadien ist schon um die Jahrhundertwende für verschiedene Säugerarten oft diskutiert worden, wenn auch vorwiegend unter anderem Aspekt (Lit. s. u.). Es fand sich keine einhellige Zustimmung, da färberische Unterschiede mit den verwendeten Methoden nur gelegentlich, nicht aber sicher reprodu-

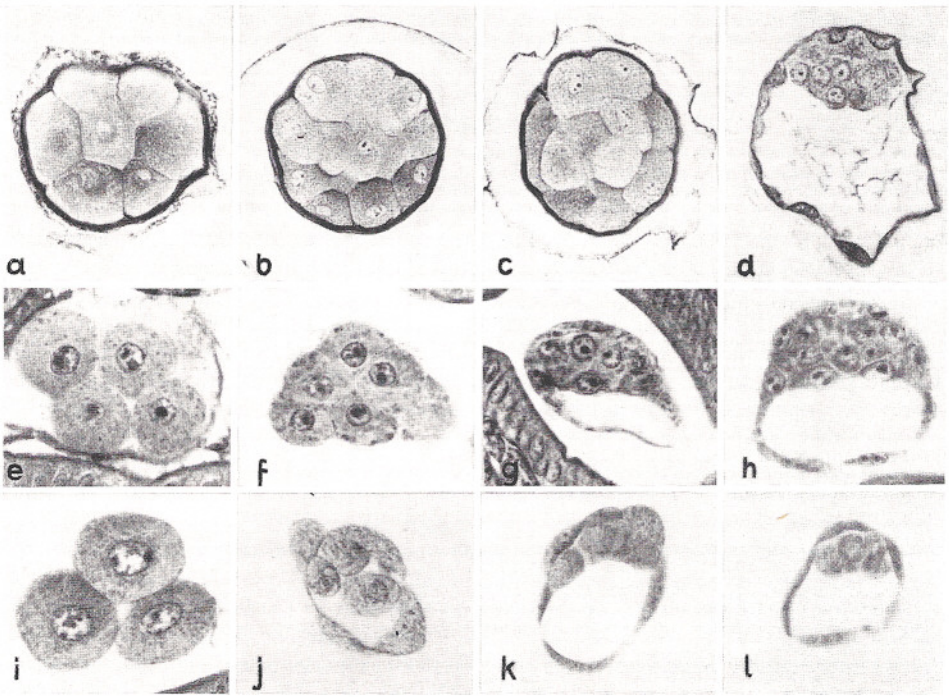

Abb. 1. a–d) Kaninchen. HgBPB, 230×. Embryonalknotenzellen hell, Trophoblastzellen dunkel. a) 40 h p.c. Drei helle und vier dunkle Zellen sind angeschnitten. b) und c) 63 h p.c. Die dunklen Blastomeren umgreifen die Gruppe der hellen bei verschiedenen Keimen verschieden weit. d) 3 d 8 h p.c. Junge Blastozyste.
e–h) Maus. 370×.
e) 8-Zell-Stadium, 3. Tag 9 Uhr. HgBPB. Vier Blastomeren angeschnitten, keine Färbungsunterschiede. f) 12-Zell-Stadium, 3. Tag 16 Uhr. HgBPB. Sechs Zellen getroffen. g) Blastozyste, 4. Tag 9 Uhr. HgBPB. Das Zytoplasma einer Zelle der Rauberschen Deckschicht (oben) ist geringfügig stärker gefärbt. h) Blastozyste, 4. Tag 9 Uhr. BPB. Gleichmäßige Anfärbung aller Zellen.
i–l) Hamster. 370×.
i) 4-Zell-Stadium, 60 h p.c. BPB. Die obere der drei angeschnittenen Blastomeren ist geringfügig schwächer gefärbt. j–l) Blastozysten, 3 d 12 h p.c. HgBPB. Alle Zellen gleich gefärbt (j) oder Trophoblastzellen dunkler (bei k links vom Embryonalknoten, bei l über und neben dem Embryonalknoten).

zierbar zu zeigen waren, so daß meist nur das unsichere Kriterium der Zellgröße und Zellgestalt blieb (vgl. HEUSER und STREETER, 1929; AMOROSO u. a., 1942). Abbildungen, die solche Blastomerenunterschiede wiedergeben, finden sich nur vereinzelt, und zwar für das Kaninchen bei VAN BENEDEN 1880 (PLANCHE IV Fig. 1–7), ASSHETON 1895 (Pl. 14 Fig. 18–20, Pl. 15 Fig. 22), GREGORY 1930 (PLATE 2 Fig. 25–27); für die Fledermaus bei VAN BENEDEN und JULIN 1880 (Planche XXIII Fig. 5, 6), VAN BENEDEN 1899 (Fig. 1 S. 310), VAN BENEDEN 1911 (Planche II Fig. 25, 29; Planche III Fig. 37, 40, 42), DUVAL 1895 (Fig. X S. 151, Pl. III Fig. 9–21, 24, 25); für den Maulwurf bei HEAPE 1886 (Pl. XI Fig. 20); für das Schaf bei ASSHETON 1898/99 (Pl. 15 Fig. 7–12, Pl. 18); für das Schwein bei HEUSER und STREETER 1929 (Fig. 5 S. 16, Fig. 6 S. 17, Plate 12); für die Ziege bei AMOROSO u. a. 1942 (Text-fig. 4 S. 388, Text-fig. 5 S. 390); für Ratte und Maus siehe die Arbeiten von DALCQ und MULNARD (Literaturverzeichnis s. DENKER, 1970b, vgl. z. B. MULNARD, 1966, Fig. 2 S. 260), CALARCO und BROWN 1969 (Plate 2 Fig. 1).

Wir haben jetzt geprüft, ob die beim Kaninchen erfolgreiche FAE-HgBPB-Methode (s. o.) sich bei *Maus* und *Syrischem Goldhamster* bewährt.

Material und Methoden

65 Keime von 14 Mäusen und 42 Keime von 7 Hamstern wurden untersucht. Die Tiere wurden bei konstantem Hell-Dunkel-Rhythmus (Dunkelphase 18.00 Uhr bis 6.00 Uhr) nach Geschlechtern getrennt gehalten. Die Hamster wurden unter Beobachtung belegt (Stadienangabe post coitum, p.c.). Die Mäuse wurden über Nacht mit Männchen zusammengesetzt; der Tag, an dem ein Vaginalpfropf gefunden wird, gilt als erster Tag der Trächtigkeit. Die meisten Keime wurden trotz der obengenannten Einwände aus technischen Gründen in der Tube bzw. im Uterus fixiert.

Material von der Maus

3. Tag vormittags und nachmittags: Alle Keime in der Tube fixiert. 10 Tiere. Keime: 2-Zeller, morphologisch normal: 1; 2-Zeller, pathologisch: 3; 4-Zeller: 24; 6-Zeller: 2; 8-Zeller: 19; 9–15-Zeller: 2; 16-Zeller: 2.

4. Tag vormittags: Isoliert fixierte Keime: 4 Keime von 2 Tieren, davon 2 Morulae, 2 Blastozysten. Im Uterus fixierte Keime: 8 Blastozysten von 2 Tieren.

Material vom Hamster

$2^1/_2$–$2^3/_4$ d p.c.: alle Keime in der Tube fixiert. 4 Tiere. Keime: 2-Zeller: 2; 4-Zeller: 22; 8-Zeller: 3.

3 d p.c.: alle Keime im Uterus fixiert. 1 Tier. 8-Zeller: 6.

$3^1/_2$ d p.c.: alle Keime isoliert fixiert. 2 Tiere. 9 Blastozysten.

Das Material wurde mit FAE fixiert, in Paraffin eingebettet und in 5–7 μm-Serienschnitte zerlegt. Färbung mit Bromphenolblau mit und ohne Sublimatzusatz (BPB bzw. HgBPB, s. MAZIA u. a., 1953). Zur Methodik vgl. DENKER 1970a u. b. Von allen Schnitten wurden Fotografien angefertigt und zur Auswertung mit herangezogen.

Ergebnisse

Bei der *Maus* zeigen sich nur bei einigen Keimen geringe Färbungsunterschiede zwischen den Blastomeren, vor allem in späteren Furchungsstadien. Sie sind nie sehr ausgeprägt; das gilt für ausgespülte Keime ebenso wie für in der Tube fixierte. Eine Korrelation der Färbungseigenschaften mit Unterschieden der Zellgestalt (wie beim Kaninchen) gelingt nicht. Auch im Blastozystenstadium sind Trophoblast und Embryonalknoten entweder gleich oder nur undeutlich verschieden angefärbt (Abb. 1e–h).

Bei *Hamster*-Blastozysten dagegen färbt sich der Trophoblast in der Regel wesentlich stärker an als der Embryonalknoten (vgl. Abb. 11; HAMILTON und SAMUEL 1956, Plate 7 Fig. 52). Dies ist nicht durchweg zu beobachten; vor allem werden bei jüngsten Blastozystenstadien oft alle Zellen gleich gefärbt. In Furchungsstadien treten hin und wieder Färbbarkeitsunterschiede zwischen den Blastomeren deutlich hervor. Sie lassen sich nicht mit Unterschieden der Zellgestalt korrelieren (Abb. 1i). Da alle Furchungsstadien des Hamsters in der Tube bzw. im Uterus fixiert wurden, ist eine Weiterführung der Untersuchungen an ausgespülten Keimen notwendig.

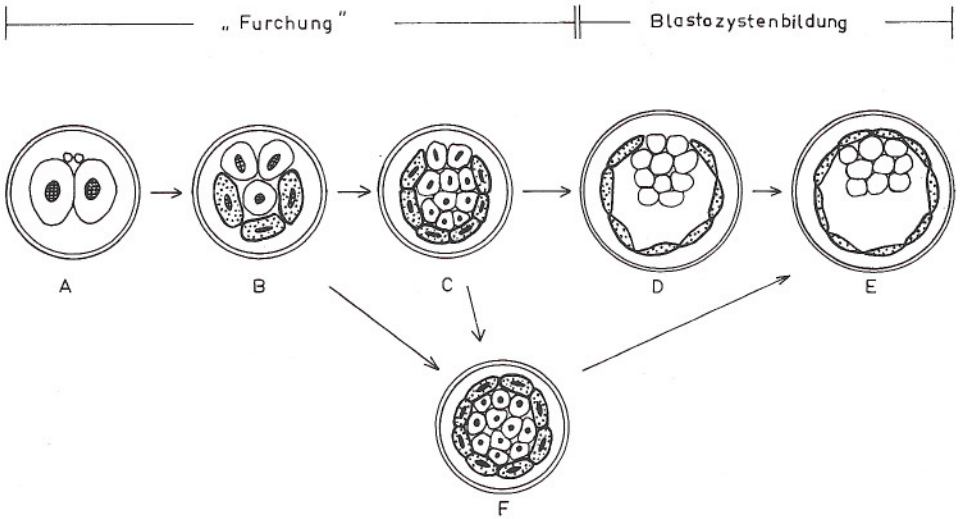

Abb. 2. Schema der Entwicklungsschritte bis zum Blastozystenstadium.

Die FAE-HgBPB-Methode hat sich also bei der Maus nicht bewährt; beim Hamster ist ihr Wert zweifelhaft. Erschwert wird die Analyse der Nagerkeime allerdings dadurch, daß die Zahl der Zellen beim Übergang ins Blastozystenstadium sehr klein ist (Hamster: Übergang 8 → 16 Zellen). Günstige Verhältnisse liegen bei den Tieren vor, die viele Furchungszellen bilden, vor allem, wenn wie beim Kaninchen nach Beginn der Differenzierung von Trophoblast- und Embrynalknotenzellen bis zur Bildung der Blastozyste noch eine Reihe von Zellteilungen erfolgt (Abb. 2: C). Man hat dann eine Reihe von Stadien zur Verfügung, bei denen man mit jedem Schnitt viele Blastomeren trifft und miteinander vergleichen kann. Bei Maus und Hamster dagegen folgen das Auftreten von zytologischen Unterschieden zwischen präsumptiven Trophoblast- und Embrynalknotenzellen und die Bildung der Blastozyste vielleicht kurz aufeinander. Möglicherweise verhalten sich diese Nager auch insofern etwas abweichend, als bei ihnen die Bedeckung der Embryonalknotenzellen durch Trophoblastzellen noch vor Auftreten der Blastozystenhöhle vollständig wird (vgl. die Abbildungen bei DALCQ und MULNARD; HAMILTON und SAMUEL 1956, Plate 7 Fig. 52). Es würde dann auf Abb. 2 für diese Tiere der Weg A—B—F—E gelten, für das Kaninchen (ebenso wahrscheinlich Fledermäuse, Schwein und Ziege, Lit. s. o.) dagegen der Weg A—B—C—D—E. Das bisher vorliegende Material bietet zwar keine Möglichkeit, diese Frage endgültig zu entscheiden. Es führt aber zu der Auf-

fassung, daß die Differenzierung von Trophoblast- und Embryonalknotenzellen sich an Furchungsstadien des Kaninchens sehr viel besser studieren läßt als an denen der muriden Nager.

Frau Sophia El-Deeb bin ich sehr dankbar für ihre gewissenhafte technische Assistenz. Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (De 181/1).

Summary

Processes of mammalian development between fertilization and blastocyst formation are commonly named cleavage, although strict comparability to holoblastiers is lacking. In mammalian cleavage, the most important event is the preparation of blastocyst formation by precocious differentiation of trophoblastic and embryonic cells. This is demonstrated in the rabbit by HgBPB-staining of sections of FAA (formol-alcohol - acetic acid)-fixed material. In the Syrian hamster and in the mouse, this method does not prove very usefull. The possibility of differences in the ways of development, physiological aspects and results from literature are briefly discussed.

Literatur

Amoroso, E. C., W. F. B. Griffiths and W. J. Hamilton: The early development of the goat (Capra hirsus). J. Anat. (London) **76**, 377–406 (1942).

Assheton, R.: A re-investigation into the early stages of the development of the rabbit. Quart. J. micr. Sci. **37**, 113–164 (1895).

– The segmentation of the ovum of the sheep, with observations on the hypothesis of a hypoblastic origin for the trophoblast. Quart. J. micr. Sci. **41**, 205–262 (1898/99).

Beneden, E. van: La maturation de l'œuf, la fécondation et les premières phases du développement embryonnaire des mammifères d'après des recherches faites chez le Lapin. Bull. Acad. Roy. Sci. Belg., 2me Sér., **40**, 686–736 (1875).

– Recherches sur l'embryologie des mammifères. La formation des feuillets chez le Lapin. Arch. Biol. **1**, 137–224 (1880).

– Recherches sur les premiers stades du développement du Murin (Vespertilio murinus). Anat. Anz. **16**, 305–334 (1899).

– Recherches sur l'embryologie des Mammifères. De la segmentation, de la formation de la cavité blastodermique et de l'embryon didermique chez le Murin. Arch. Biol. **26**, 1–63 (1911).

– Ch. Julin: Observations sur la maturation, la fécondation et la segmentation de l'œuf chez les cheiroptères. Arch. Biol. **1**, 551–571 (1880).

Calarco, Patricia G., and E. H. Brown: An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse. J. exp. Zool. **171**, 253–284 (1969).

Cole, R. J., R. G. Edwards and J. Paul: Cytodifferentiation and embryogenesis in cell colonies and tissue cultures derived from ova and blastocysts of the rabbit. Develop. Biol. **13**, 385–407 (1966).

Dalcq, A. M.: Processes of synthesis during development of rodent's eggs and embryos. Studies on Fertility **7**, 113–132 (1955).

Denker, H. W.: Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. I. Allgemeine Lokalisierung und Charakterisierung hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in frühen Embryonalstadien. Zool. Jb. Physiol. **75**, 141–245 (1970a).

II. Beiträge zu entwicklungsphysiologischen Fragestellungen. Zool. Jb. Physiol. **75**, 246–308 (1970b).

Duval, M.: Etudes sur l'embryologie des chéiroptères. J. Anat. Physiol. **31**, 93–160 (1895).

Gregory, P. W.: The early embryology of the rabbit. Carnegie Inst. Wash. Publ. No. 407: Contrib. to Embryol. **21**, 141–168 (1930).
Hamilton, W. J., and D. M. Samuel: The early development of the golden hamster, Cricetus auratus. J. Anat. (London) **90**, 395–416 (1956).
Heape, W.: The development of the mole (Talpa europea), the ovarian ovum, and segmentation of the ovum. Quart. J. micr. Sci. **26**, 157–174 (1886).
Heuser, C. H., and G. L. Streeter: Early stages in the development of pig embryos, from the period of initial cleavage to the time of the appearance of limb-buds. Carnegie Inst. Wash. Publ. No. 394: Contrib. to Embryol. **20**, 1–30 (1929).
Mazia, D., P. A. Brewer and M. Alfert: The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. Biol. Bull. (Lancaster) **104**, 57–67 (1953).
Mintz, Beatrice: Experimental genetic mosaicism in the mouse. Ciba Foundation Symposium on Preimplantation Stages of Pregnancy. Ed. by Wolstenholme and O'Connor. Churchill, London 1965, p. 194–207.
Mulnard, J. G.: Les mécanismes de la régulation aux premiers stades du développement des Mammifères. Bull. Soc. zool. France **91**, 253–277 (1966).
– Analyse microcinématographique du développement de l'œuf de souris du stade II au blastocyste. Arch. Biol. **78**, 107–138 (1967).
Seidel, F.: Die Entwicklungsfähigkeiten isolierter Furchungszellen aus dem Ei des Kaninchens. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **152**, 43–130 (1960).
– Entwicklungspotenzen des frühen Säugetierkeims. Arbeitsgemeinschaft für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen, Heft 193 (hrsg. v. L. Brandt). Westdeutscher Verlag, Köln u. Opladen 1969.
Tarkowski, A. K., and J. Wróblewska: Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. J. Embryol. Exper. Morph. **18**, 155–185 (1967).

Anschrift des Verfassers: Dr. Dr. H. W. Denker, Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. H. M. Gottschewski am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, 78 Freiburg, Stefan-Meier-Straße 8.

Aussprache:

Denker (Schlußwort): Unterschiede in der Aufnahme des Farbstoffes Bromphenolblau zwischen den Blastomeren haben wir nur nach FAE-Fixierung gesehen, nicht nach Bouin, Formol-Kalzium, Glutaraldehyd-Kalzium oder nach Gefriersubstitution mit dem Zyanurchlorid-Fixierungsgemisch von Goland u. a. Da FAE sicher eine Reihe von Substanzen aus dem Gewebe extrahiert [vgl. C. Dick and E. W. Johns: Exptl. Cell Res. **51**, 626–632 (1968)] wäre es denkbar, daß der beobachtete Effekt auf einen besonderen Reichtum der präsumptiven Embryonalknotenzellen an einer FAE-löslichen Proteinfraktion zurückzuführen ist. Aus den histochemischen Tests, die wir bis jetzt durchgeführt haben, können wir nur entnehmen, daß diese Blastomeren offenbar eine höhere Konzentration an zytoplasmatischer RNS und in späteren Stadien auch an Glykogen besitzen. Extraktionsversuche an Schnitten haben wir gerade erst begonnen. Kontrollen durch andere Proteinreaktionen sind vorbereitet.

Einzeln nicht im Buchhandel

Überreicht vom Verfasser

Sonderdruck aus

Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft

auf der sechsundsechzigsten Versammlung in Zagreb vom 1. bis 4. Juni 1971

Herausgegeben
von dem Schriftführer der Gesellschaft

Max Watzka, Mainz

und

Hermann Voss, Greifswald

Ergänzungsheft zum 130. Band (1972)
des Anatomischen Anzeigers

VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA

Alle Rechte vorbehalten · Printed in the German Democratic Republic
Druckerei „Magnus Poser" Jena · Lizenznummer 261 700/117/72