Verh. Anat. Ges. 69, S. 281–289 (1975)

H.-W. Denker, Freiburg:

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie Freiburg

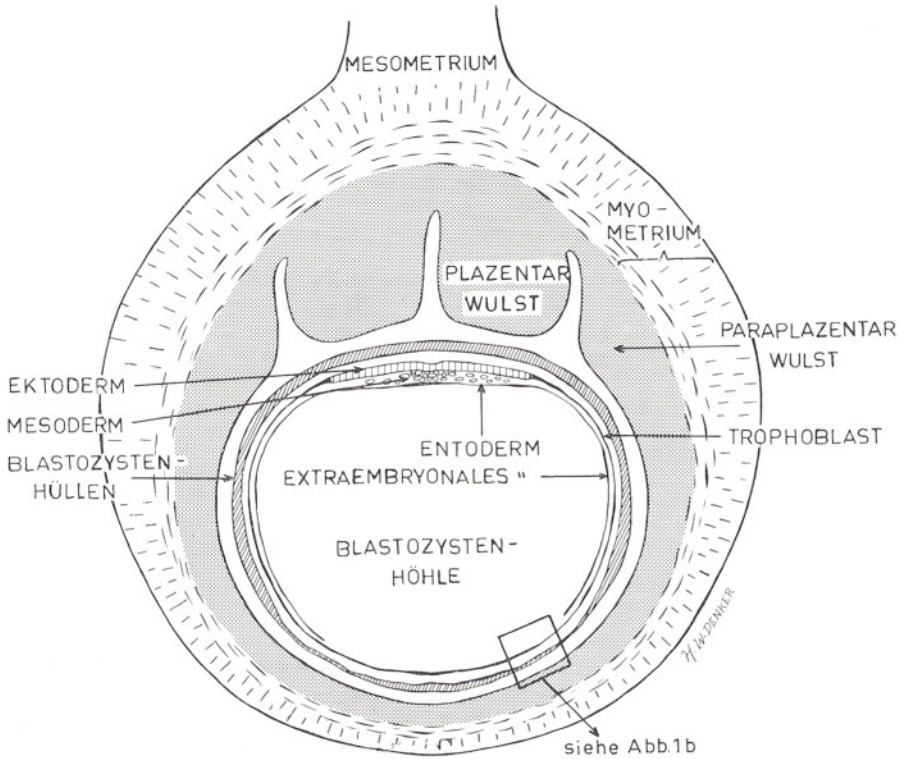
Implantation des Kaninchenkeims im Uterus: Bedeutung von Enzymen des Embryos bzw. des Endometriums

Mit 4 Abbildungen und 1 Tabelle im Text

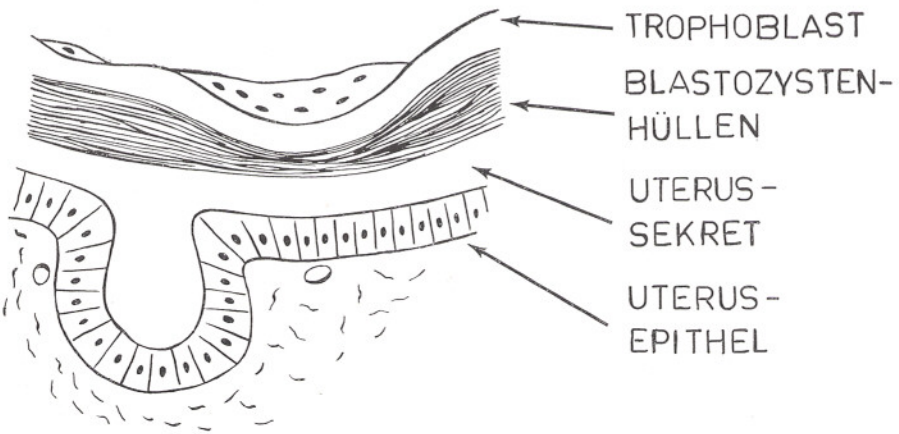
Die Implantation ist beim Kaninchen vom zentralen Typus: Die Blastozyste bleibt, im topographischen Sinn, im Uteruslumen liegen (Abb. 1) und bettet sich nicht wie bei der interstitiellen Implantation (Mensch) als Ganzes in das Stroma des Endometriums ein. Es wird aber wie beim Menschen eine haemochoriale Plazenta gebildet (Literatur vgl. Denker 1970a). Eine weitere Ähnlichkeit der Implantation beim Kaninchen mit der beim Menschen scheint in der wechselseitigen Rolle von Trophoblast und Uterusepithel in der Phase der Penetration zu bestehen: Während z. B. bei Ratte und Maus (exzentrische Implantation) das Uterusepithel in der Umgebung der Blastozyste im wesentlichen auf Grund des lokalen Stromaödems und/oder der Deziduareaktion schwindet (Blandau 1949), gibt es beim Kaninchen wie beim Menschen eine echte Deziduareaktion erst nach dem Beginn der Implantation, und der Trophoblast überwindet das Uterusepithel offenbar weitgehend auf Grund seiner Fähigkeit zum invasiven Wachstum.

Die biochemischen Grundlagen der Adhäsion des Trophoblasten an das Uterusepithel sowie der nachfolgenden Invasion stehen im Mittelpunkt unseres Interesses. Das Kaninchen erscheint uns als günstiges Modell wegen der erwähnten Ähnlichkeiten mit den Verhältnissen beim Menschen, wegen der Möglichkeit einer sehr exakten Altersbestimmung der Keime [Koitus-induzierte Ovulation 10 Std. post coitum (10 h p.c.)], und wegen der außerordentlichen Größe der Blastozysten bei der Implantation (Maße 7 d p.c. etwa $4 \times 5{,}5$ mm, vgl. Seidel 1960), die histochemische und vor allem auch biochemische Untersuchungen sehr erleichtert. Wir beschränken uns bei den hier vorgelegten Untersuchungen auf die antimesometrale Implantation (Obplazentation); es ist zu beobachten, daß diese von der mesometralen Implantation und definitiven Plazentation in vielen Punkten abweicht.

Die Implantationsvorgänge setzen beim Kaninchen $6^2/_3$–7 d p.c. ein. Zu diesem Zeitpunkt ist die Blastozyste durch einen unbekannten Mechanismus im Uterus orientiert, und zwar mit der Keimscheibe nach der Seite des Mesometriums zu („mesometral") (Abb. 1a). Sie ist noch umgeben von den extrazellulären Blastozystenhüllen (das sind: Reste der bei der Expansion der Blastozyste gedehnten Zona pellucida, ferner die in der Tube aufgelagerte Mukoproteidschicht und evtl. ein vom Uterussekret stammendes Glöolemma, vgl. Böving 1954, 1957; Denker 1970b). Zunächst werden die Blastozystenhüllen in der abembryonalen (der Keimscheibe abgewandten) Hemisphäre aufgelöst, und zwar beginnt diese Auflösung stets dort, wo ihnen ein synzytialer Trophoblastsproß anliegt (Abb. 1b; Böving 1963 Fig. 17 S. 352 und Fig. 18 S. 353; Denker 1970a Abb. 40 a S. 203; Enders 1971 Fig. 29 u. 30 S. 91). Sind die Hüllen in diesem Bereich geschwunden, so nimmt



a



b

Abb. 1. Schematische Darstellung der morphologischen Verhältnisse im Beginn der Implantation der Kaninchenblastozyste im Uterus, 7 d p. c.
a) Übersicht. Uterus quer geschnitten.
b) Darstellung des bei a) angezeichneten Ausschnitts aus dem abembryonal-antimesometralen Bereich bei stärkerer Vergrößerung.

der Trophoblast sofort Kontakt mit dem Uterusepithel auf (eine Phase, in der die Blastozyste ohne Hüllen frei beweglich im Uterus läge, gibt es beim Kaninchen nicht) und dringt zwischen Uterusepithelzellen ein, und zwar jeweils dort, wo eine subepitheliale Kapillare liegt (Böving 1963).

Die erwähnten Strukturen, besonders die Blastozystenhüllen und die Uterusepitheloberfläche, sind reich an sauren Mukosubstanzen mit endständiger Neuraminsäure und mit Schwefelsäureestergruppen, die während der Anheftungsphase chemische Veränderungen durchmachen (Denker 1970a und b). Daher hat uns die Frage interessiert, ob Proteasen und Glykosidasen im Rahmen der beteiligten physikochemischen Grundprozesse eine Rolle spielen (Denker 1971a–c). Besonders auffällig ist eine hohe Proteaseaktivität, die die Blastozyste ausschließlich in den beschriebenen ersten Phasen der Implantation zeigt (Abb. 2). Wir haben dieses Enzym als ein Sekretionsprodukt des Trophoblasten angesehen und vermutet, daß es eine besondere Bedeutung für die Auflösung der Blastozystenhüllen und die Einleitung der Implantation hat (Denker 1971c, 1972). Dagegen nehmen Kirchner, Hirschhäuser und Kionke (1971) und Kirchner (1972) an, daß die erwähnten Prozesse ausschließlich von Uterussekretproteasen abhängen. Unseres Erachtens muß man dann aber fordern, daß das antimesometrale Endometrium ein spezifisches Sekret bildet (welches sich dagegen mesometral nicht findet), da ja die Hüllenauflösung lokal, antimesometral-abembryonal, beginnt. Die von Kirchner für das Kaninchen vorgetragenen Vorstellungen entsprechen den von Mintz (1971) an der Maus gemachten Beobachtungen.

Die Proteaseaktivität der Blastozysten läßt sich im histochemischen Substratfilmtest vor allem in den Blastozystenhüllen lokalisieren, wohingegen der Tropho-

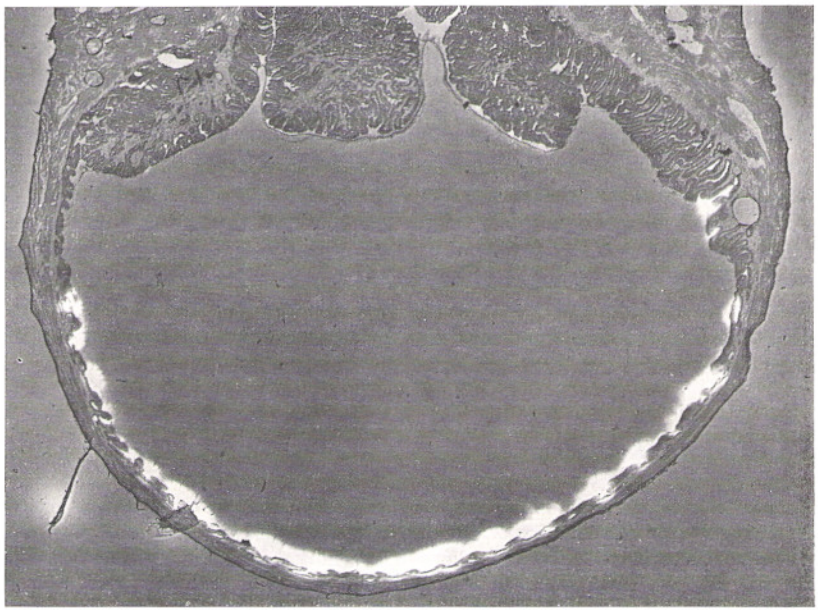


Abb. 2. Proteaseaktivität, Substratfilmtest. Querschnitt durch Uterus und Blastozyste, $7^1/_3$ d p. c., 13×. Die Proteaseaktivität, angezeigt durch die hell erscheinende Lysiszone, findet sich vorwiegend abembryonal-antimesometral.

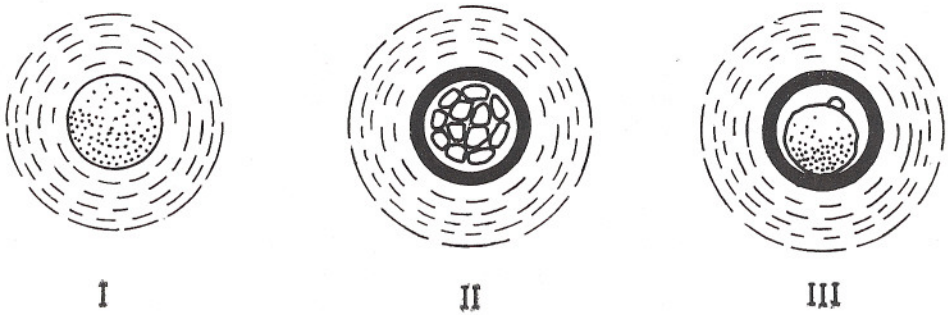


Abb. 3. Die drei verwendeten Modelle für Keimhüllen ohne Blastozystengewebe: I. Sephadex-Perle mit Mukoproteidschicht; II. Morula mit Zona pellucida und Mukoproteidschicht; III. unbesamtes Ei mit Zona pellucida und Mukoproteidschicht.

blast in diesem Test nur schwach reagiert (Kirchner 1972; Denker 1974a). Es kam daher der Gedanke auf, daß das Enzym vielleicht nicht vom Trophoblasten, sondern, ebenso wie zumindest die äußeren Lagen der Hüllen, vom Tuben- oder Uterussekret stammt (Kirchner 1972). Freilich würde hierin ein gewisser Widerspruch liegen: Tuben- und/oder Uterussekret würden sowohl die Bausteine für die Hüllen als auch das sie auflösende Enzym liefern. Der Widerspruch ließe sich überwinden durch die zusätzliche Annahme, daß das Enzym sezerniert und in die Hüllen eingebaut wird in Form einer inaktiven Vorstufe (Proenzym, Zymogen). Diese Vorstufe könnte dann zum Zeitpunkt der Implantation aktiviert werden durch Aktivatoren aus dem Trophoblasten oder dem Uterussekret.

Wir haben zunächst an Modellsystemen die Frage studiert, ob die Proteaseaktivität nur von den mütterlichen Geweben und Sekreten oder in irgendeiner Weise vom Trophoblasten abhängt. Als Modelle dienten Keimhüllen ohne Trophoblast, die auch nie unter dem Einfluß eines Trophoblasten gewesen waren: Mukoproteidschicht, die in der Tube um Perlen von Eigröße abgelagert worden war (Abb. 3: I); ferner Mukoproteidschicht und Zona pellucida von Morulae (Abb. 3: II) oder von unbesamten Eiern (Abb. 3: III) nach Abschluß der Tubenwanderung. Diese Modelle wurden dann dem Uterusmilieu von trächtigen oder scheinträchtigen Kaninchen ausgesetzt und anschließend auf Proteaseaktivität untersucht. Würde Proteaseaktivität auftreten, so wäre gezeigt, daß der Trophoblast hierfür nicht notwendig ist; fehlende Proteaseaktivität in den Modellen wäre ein Hinweis darauf, daß entweder die Protease selbst oder ein essentieller Kofaktor oder Aktivator vom Trophoblasten kommen muß.

Material und Methoden

Verwendet wurden etwa 1–2 Jahre alte weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer. Es wurden 4 verschiedene Experimente durchgeführt (Experiment A, B, C_1 und C_2, vgl. Tab. 1), wobei pro Experiment 2 Tiere zum Einsatz kamen und wo nötig 2 weitere Eispendertiere (Experiment C_1 und C_2). Hinsichtlich weiterer Einzelheiten des Vorgehens vgl. auch Denker und Hafez (1975).

In *Experiment A und B* wurden die Tiere belegt; unmittelbar nach (Expt. A) oder vor (Expt. B) der Ovulation wurden sie unter Pentobarbital-Anästhesie laparotomiert, und in die Tuben wurden 30–40 Sephadex-Perlen (Sephadex G-100 in 0,9% NaCl-Lösung, autoklaviert, Durch-

Tabelle 1.

	Dauer der Einwirkung des Uterusmilieus (d p. c.)	Trächtigkeitszustand
Experiment A	3–7	Normale Trächtigkeit, Blastozysten im gleichen Uterus vorhanden
Experiment B	3–7	Normale Trächtigkeit, aber Blastozysten nur im Uterus der Gegenseite vorhanden
Experiment C_1	6–7	Scheinträchtigkeit (HCG) (keine Blastozysten vorhanden)
Experiment C_2	7–8	Scheinträchtigkeit (HCG) (keine Blastozysten vorhanden)

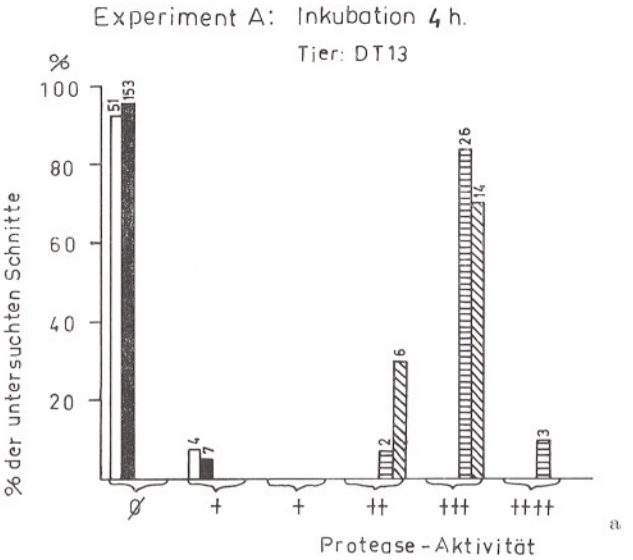
messer der Perlen nach Angaben des Herstellers 40–120 μ) übertragen. In *Experiment A* wanderten diese dann mit den sich entwickelnden Embryonen durch die Tube, wo auf sie eine Mukoproteidschicht aufgelagert wurde, und in den Uterus. 7 d p. c. wurde der Uterus entnommen und mit flüssigem Stickstoff für den Proteasetest eingefroren. Er enthielt nun sowohl sich implantierende Blastozysten als auch Sephadex-Perlen (mit Mukoproteidschicht und evtl. zusätzlich eingelagertem Uterussekret). Ferner fanden sich gelegentlich zufällig unbesamte Eier. In *Experiment B* wurde im Prinzip ebenso vorgegangen, aber zusätzlich ein besonderes Verfahren angewendet, um einen möglichen Einfluß benachbarter Blastozysten auf die Mukoproteidschicht der Perlen auszuschließen. Dazu wurden auf einer Seite etwa 1 Std. vor der Ovulation die Eizellen aus den Follikeln durch Aspiration entfernt; die andere Seite diente als Kontrolle für normale Blastozystenentwicklung.

In *Experiment C_1 und C_2* wurden ebenso übertragene Sephadex-Perlen zunächst nur im Tubenmilieu belassen, wo sie eine Mukoproteidschicht erhielten. Sie wurden dann 61–65 h p.c. aus der Tube ausgespült, wobei auch normale Morulae und zufällig unbesamte Eier anfielen (beide mit Zona pellucida und Mukoproteidschicht). Perlen und Eier wurden dann für einen Tag dem Uterusmilieu eines Empfängertieres ausgesetzt, das sich in einem dem Implantationsstadium entsprechenden Stadium der Scheinträchtigkeit befand (6 bzw. 7 Tage nach Injektion von 50 IE HCG). Die Uteri wurden eingefroren wie in Experiment A und B.

Die Proteaseaktivität wurde an Kryostatschnitten unter Verwendung eines histochemischen Substratfilmtests untersucht (Denker 1974a); Inkubationszeit: 4 Std. und 24 Std.

Ergebnisse

In allen vier Experimenten (A, B, C_1 und C_2) zeigten weder die Mukoproteidschicht der Sephadex-Perlen noch die Hüllen von Morulae oder unbesamten Eiern nennenswerte Proteaseaktivität. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu der hohen Aktivität der Kontrollblastozysten. In Experiment A konnten die Aktivitäten von Blastozysten und von benachbarten Sephadex-Mukoproteidschicht-Perlen auf dem gleichen Schnitt miteinander verglichen werden. Die an einem von diesen Tieren gemachten Beobachtungen sind exemplarisch in Abb. 4 in Form von Histogrammen dargestellt. Es fällt auf, daß die Mukoproteidschichtkugeln keine bis sehr schwache Proteaseaktivität zeigen und in dieser Hinsicht nicht vom sie umgebenden Uterussekret abweichen, während die Blastozysten sehr stark reagieren. Wird die Inkubationszeit im Proteasetest allerdings auf 24 Std. ausgedehnt (Abb. 4b), so


Experiment A: Inkubation 4 h.
Tier: DT13
%
100
80
60
40
20
% der untersuchten Schnitte
51
53
4
7
2
6
26
14
3
Ø
+
+
++
+++
++++
Protease-Aktivität
a

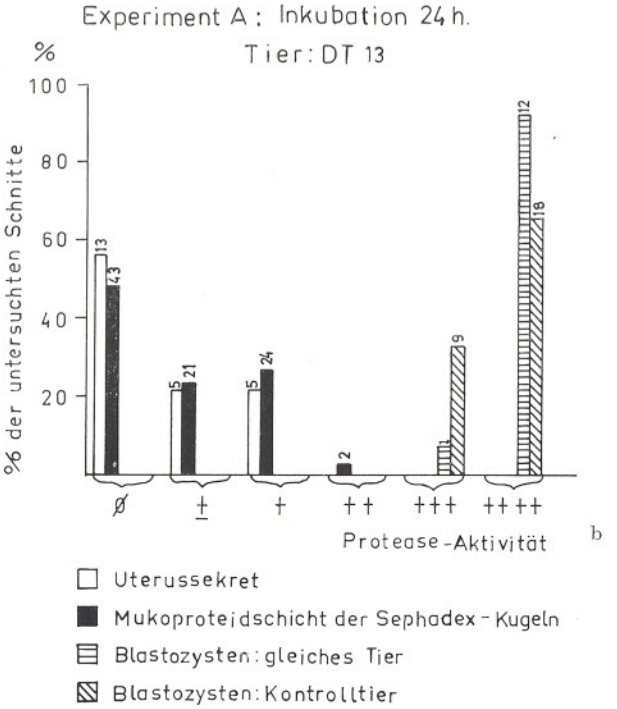

Experiment A: Inkubation 24 h.
Tier: DT 13
%
100
80
60
40
20
% der untersuchten Schnitte
13
43
5
21
5
24
2
1
9
12
18
Ø
±
+
++
+++
++++
Protease-Aktivität
b
Uterussekret
Mukoproteidschicht der Sephadex-Kugeln
Blastozysten: gleiches Tier
Blastozysten: Kontrolltier

Abb. 4

findet man in einigen wenigen Mukoproteidkugeln doch eine deutliche Aktivität, wenn auch diese immer noch schwächer bleibt, als die Reaktion von Blastozysten. In den Experimenten C_1 und C_2 wurde aber auch nach dieser prolongierten Inkubation keine nennenswerte Aktivität nachweisbar.

Diskussion

Die von uns untersuchten Modelle (um inerte Fremdkörper herum abgelagerte Mukoproteidschicht; Mukoproteidschicht und Zona pellucida von Morulae und unbesamten Eiern) entwickelten im Uterusmilieu im Gegensatz zu den Kontrollblastozysten keine nennenswerte Proteaseaktivität. Zwei mögliche Deutungen bieten sich dafür an:

1. Die Modelle waren ungeeignet insofern, als ihre Hüllen nicht mit Blastozystenhüllen chemisch vergleichbar wären. Dies erscheint unwahrscheinlich, da zumindest die verwendeten Morulae alle Hüllen besaßen, die ein Kaninchen-Ei beim Eintritt in den Uterus hat, und da die Modelle in Experiment A und B ebensolange wie normale Blastozysten im Uterusmilieu verblieben, nämlich ununterbrochen bis 7 d p. c. (Möglichkeit der Auflagerung oder Einlagerung von Uterussekretmaterial, „Glöolemma").

2. Das Ausbleiben der Proteaseaktivität in den Modellen zeigt die Notwendigkeit eines Faktors an, der normalerweise von den Geweben der Blastozyste (wahrscheinlich dem Trophoblasten) abgegeben wird; letztere fehlten ja den Modellen. Dieser Faktor könnte die Protease selbst oder ein Aktivator für ein in den Hüllen vorhandenes Proenzym sein. Auf das Vorhandensein eines Proenzyms könnte die Beobachtung hinweisen, daß manche Mukoproteidschicht-Perlen nach prolongierter Inkubation von 24 Std. eine gewisse Aktivität zeigten. Wir halten es aber für wahrscheinlicher, daß der Trophoblast das Enzym und nicht nur einen Aktivator bildet, da wir mit biochemischen Methoden im Trophoblasten eine latente hohe Proteaseaktivität demonstrieren konnten (Denker und Petzoldt, in Vorbereitung).

Für die Herkunft lytischer Faktoren vom Trophoblasten sprechen auch morphologische Beobachtungen: Die Auflösung der Blastozystenhüllen beginnt über den Trophoblastsprossen, die sich nur in der abembryonalen Hemisphäre der Blastozysten finden (siehe Einleitung). Der Schilderung Kirchners (1972), daß sie über der Keimscheibe begänne, können wir nicht zustimmen. Kürzlich fand auch Kirchner (1974) 8 d p. c., wenn die Hüllen abembryonal ganz geschwunden sind, noch Hüllenreste über der Keimscheibe (siehe auch Böving 1954 Fig. 8, S. 14; Denker 1970, 1974b Fig. 1a–c).

Die Vorstellung, daß die Proteaseaktivität oder zumindest ein dafür essentieller Faktor vom Trophoblasten ausgeht, wird auch durch Beobachtungen an sich um-

---

Abb. 4. a, b. Prozentuale Häufigkeitsverteilung der erhaltenen Proteasereaktionen, ausgedrückt in Aktivitätsklassen (∅ bis ++++). Alle untersuchten Schnitte durch die Mukoproteidschicht von Sephadex-Perlen, durch Blastozysten des gleichen Tieres oder eines Kontrolltieres, und alle Uterussekret enthaltenden Schnitte sind jeweils gleich 100% gesetzt. Die Zahl über jeder Säule gibt die dem Prozentwert zugrunde liegende absolute Anzahl von Schnitten wieder.

gekehrt implantierenden Blastozysten gestützt, bei denen trotz umgekehrter Orientierung sowohl das Maximum der Proteaseaktivität als auch der Beginn der Hüllenauflösung immer am Trophoblastpol gefunden wurden (DENKER 1974b).

KIRCHNER und MOOTZ (1974) haben in einer Serie von synchronen und asynchronen Blastozystentransplantationen (Uterus in entsprechendem oder verschiedenem Stadium der Scheinträchtigkeit) gezeigt, daß das stadiumspezifische Uterusmilieu das Auftreten der Proteaseaktivität der Blastozysten beeinflußt. Wir meinen, dies geht wahrscheinlich auf die Tatsache zurück, daß die Keime nur in einem stadiengleichen Uterus sich entwickeln (CHANG 1950) und damit auch nur so ihre spezifische Aktivitäten (Protease, Aktivator) entfalten können.

Die angeführten Beobachtungen sprechen unserer Ansicht nach für eine Abhängigkeit der Proteaseaktivität der Blastozystenhüllen vom Trophoblasten. Ob der Trophoblast nun das Enzymmolekül oder einen essentiellen Aktivator liefert, muß in zukünftigen Untersuchungen weiter abgeklärt werden.

Herrn Prof. Dr. E. S. E. HAFEZ, Departments of Gynecology-Obstetrics and Physiology, und C. S. MOTT Center for Human Growth and Development, Wayne State University School of Medicine, Detroit (Mich., USA) danke ich für die Möglichkeit, einen Teil dieser Untersuchungen in seinem Labor durchzuführen. Fräulein M. POLACK danke ich herzlich für die Anfertigung der Zeichnungen.

Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (De 181/3).

Summary

The initial phases of implantation have been studied in the rabbit: dissolution of the blastocyst coverings and attachment of the trophoblast onto the uterine epithelium. Histochemical investigations on mucosubstances and related enzymes gave some evidence that glycosidases and proteases might be involved. Attention is being centered on a high protease activity exhibited by the implanting blastocyst and found, in a histochemical substrate film test, mainly in the disintegrating blastocyst coverings. Coverings without blastocyst tissue were used as experimental models and exposed to the uterine milieu. These models did not gain any protease activity comparable to that seen in control blastocysts, showing that the appearance of this enzyme depends on the presence of blastocyst tissue, probably the trophoblast. Other lines of evidence for or against this hypothesis and the possible origin of the enzyme molecule or of activators are discussed.

Literatur

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

BÖVING, B. G.: Blastocyst-uterine relationships. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. **19**, 9–28 (1954).

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

– Implantation mechanisms. In: Mechanisms Concerned with Conception (C. G. HARTMAN = ed.). Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press, 1963, p. 321–396.

CHANG, M. C.: Development and fate of transferred rabbit ova or blastocysts in relation to the ovulation time of recipients. J. Exp. Zool. **114**, 197–226 (1950).

DENKER, H.-W.: Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. I. Allgemeine Lokalisierung und Charakterisierung hoch-

molekularer Kohlenhydratsubstanzen in frühen Embryonalstadien. Zool. Jb. Abt. Allgem. Zool. u. Physiol. **75**, 141–245 (1970a).
– Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. II. Beiträge zu entwicklungsphysiologischen Fragestellungen. Zool. Jb. Abt. Allgem. Zool. u. Physiol. **75**, 246–308 (1970b).
– 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).
– Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. III. Proteasen. Histochemie **25**, 344–360 (1971c).
– Blastocyst protease and implantation: effect of ovariectomy and progesterone substitution in the rabbit. Acta endocr. (Kbh.) **70**, 591–602 (1972).
– Protease substrate film test. Histochemistry **38**, 331–338 und **39**, 193 (1974a).
– Trophoblastic factors involved in lysis of the blastocyst coverings and in implantation in the rabbit: observations on inversely orientated blastocysts. J. Embryol. exp. Morphol. **32**, 739–748 (1974b).
– and E. S. E. Hafez: Proteases and implantation in the rabbit: role of trophoblast vs. uterine secretion. Cytobiologie **11**, 101–109 (1975).
Enders, A. C.: The fine structure of the blastocyst. In: The Biology of the Blastocyst (R. J. Blandau = ed.). Chicago and London: The University of Chicago Press, 1971, p. 71–94.
Kirchner, C.: Uterine protease activities and lysis of the blastocyst covering in the rabbit. J. Embryol. exp. Morphol. **28**, 177–183 (1972).
– C. Hirschhäuser and M. Kionke: Protease activity in rabbit uterine secretion 24 hours before implantation. J. Reprod. Fert. **27**, 259–260 (1971).
– und Ursula Mootz: Untersuchungen über die Auflösung der Keimhüllen beim Kaninchen: Der Einfluß des uterinen Milieus. Wilhelm Roux' Archiv f. Entwickl.-Mech. Org. **174**, 172–180 (1974).
Mintz, B.: Control of embryo implantation and survival. In: Schering Sympos. on Intrinsic and Extrinsic Factors in Early Mammalian Development (G. Raspé = ed.). (= Advances in the Biosciences, Vol. 6). Oxford etc.: Pergamon Press; Braunschweig: Vieweg, 1971, p. 317–342.
Seidel, F.: Die Entwicklungsfähigkeiten isolierter Furchungszellen aus dem Ei des Kaninchens. Wilhelm Roux' Arch. f. Entwickl.-Mech. Org. **152**, 43–130 (1960).

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