Zool. Jb. Physiol. Bd. 75, S. 246—308 (1970)

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Marburg (Lahn)

Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens

II. Beiträge zu entwicklungsphysiologischen Fragestellungen

Von Hans-Werner Denker

Mit 23 Abbildungen

Summary

Topochemical investigations on the early development of the rabbit are presented, concerning:
a) the differentiation of the blastomeres during cleavage, and
b) the polarity of the early embryonic disc.

From the results communicated in part I [Zool. Jb. Physiol. **75**, 141—245 (1970)] and II are drawn the following conclusions:

1. The block to polyspermy may be correlated with the extrusion of an acid mucosubstance into the perivitelline space. 2. In early stages of cleavage, two categories of cells are differentiated: presumptive embryonic and trophoblastic cells. They differ in the content of protein, RNA and glycogen. 3. The polarity in the early embryonic disc is not related to the substances demonstrated here. 4. The metabolism of glycogen is active during blastocyst formation and implantation. 5. In the blastocyst stage, the egg coverings undergo not only simple mechanical but chemical changes (content of sialic acids). 6. Proteolytic enzymes and perhaps glycosidases (sialidase?) seem to cause the dissolution of the blastocyst coverings and the implantation.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung . . . 247
2. Zum Problem der Differenzierung der Blastomeren (Beobachtungen an Paraffinschnitten von FAE-fixiertem Material) . . . 248
2.1. Material und histologische Methoden . . . 249
2.2. Ergebnisse . . . 250
2.2.1. Protein: Hg-Bromphenolblaufärbung (HgBPB) . . . 250
A. Morphologische Darstellung der Blastomerendifferenzen . . . 250
B. Histochemische Betrachtungen zu den Blastomerendifferenzen nach HgBPB-Färbung . . . 261
2.2.2. Glykogen . . . 262
2.2.3. Mukosubstanzen und interferierende RNS . . . 263

2.2.3.1. Mukosubstanzen allgemein: PAS . . . 263
2.2.3.2. Saure Mukosubstanzen und interferierende RNS . . . 264
2.2.3.2.1. Eisenkolloid-Bindungsreaktion (Hale) . . . 264
2.2.3.2.2. RNase-Labilität der Hale-positiven Substanzen . . . 265
2.2.3.2.3. Andere sMS-Reaktionen . . . 266
3. Zur Frage einer Polarität der Keimscheibe (Beobachtungen an Blastozysten-Flachpräparaten) . . . 266
3.1. Material und Präparationsmethoden . . . 266
3.2. Ergebnisse . . . 268
3.2.1. Sudanschwarz B-Färbung zur Kontrolle der Kohlenhydratreaktionen . . . 268
3.2.2. Fettextraktion nach Baker zur Kontrolle der Kohlenhydratreaktionen . . . 268
3.2.3. Kohlenhydratreaktionen . . . 268
4. Entwicklungsphysiologische Diskussion der Ergebnisse aus Teil I und II . . . 269
4.1. Die Polarität der Oozyte . . . 269
4.2. Polyspermieblock beim Kaninchen: Substanzen des perivitellinen Spalts und Reaktionen der Zona . . . 272
4.3. Die Differenzierung der Blastomeren in der Furchung und Blastozystenbildung 274
4.4. Physiologische und histochemische Polarität der Keimscheibe . . . 285
4.5. Angaben zum Glykogenstoffwechsel in der frühen Entwicklung . . . 285
4.6. Ovariale bzw. tubale Sekretion und Keimhüllenbildung . . . 288
4.7. Verhalten der Blastozyste im Uterusmedium . . . 291
4.8. Implantation der Blastozyste im Uterus . . . 293
5. Zusammenfassung der Hauptergebnisse . . . 297
6. Literatur . . . 297

1. Einleitung

In Teil I dieser Arbeit wurde die Verteilung hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen (Glykogen und Mukosubstanzen) in frühen Entwicklungsstadien des Kaninchens geschildert, wie sie sich nach Fixierungen für diese Substanzen auf dem Schnitt zeigt[1]). Bei Anwendung spezieller Prozeduren ergeben sich nun Befunde zu einigen entwicklungsphysiologischen Fragestellungen, die von besonderem Interesse sind:

1. Differenzierung der Furchungszellen;
2. Histochemische Polarität der Keimscheibe.

Sie werden hier wiedergegeben und in einer gemeinsamen Diskussion zusammen mit den Befunden aus Teil I besprochen.

1) Abkürzungen siehe Teil I, Seite 144.

2. Zum Problem der Differenzierung der Blastomeren (Beobachtungen an Paraffinschnitten von FAE-fixiertem Material)

Nach den Ergebnissen der entwicklungsphysiologischen Experimente von Seidel (1954, 1960a) gibt es im Säugerei (Kaninchen) ähnlich wie in anderen merogenetischen Eiern, z. B. im Insektenei (Seidel 1936), einen plasmatischen Faktorenbereich, der für die Bildung der Embryonalanlage unentbehrlich ist. Bei der totalen Furchung des Säugereies fällt dieser Bereich nur einigen oder einer der Blastomeren zu. In irgendeiner Weise gehen von ihm Reaktionen aus, die zur Bildung einer Embryonalanlage mit Keimscheibe und zugehörigem Trophoblast führen. Diese Vorstellungen können, weil sie auf den Ergebnissen experimentellen Eingreifens in die Prozesse der Entwicklung beruhen, zunächst nur in einer funktionellen Sprechweise dargestellt werden (s. Seidel1960b). Den gefundenen „Faktorenbereichen" fehlt das morphologische (topochemische) Korrelat. So ergibt sich die Notwendigkeit, der Beobachtung unterschiedlicher funktioneller Eigenschaften verschiedener Bereiche des Eies oder verschiedener Blastomeren eine Darstellung von stofflichen Unterschieden an die Seite zu stellen. Man muß prüfen, ob dafür ein mit morphologischen, chemischen und physikalischen Methoden aufzufindendes raumzeitliches Gefüge namhaft gemacht werden kann. Es ist dann weiterhin zu prüfen, ob dieses die Fundamente der funktionellen Besonderheiten bildet.

Auf diesem Boden stellte sich mir bei meinen histochemischen Untersuchungen die Aufgabe, ungefurchte und gefurchte Keime auf topochemische Unterschiede zwischen verschiedenen Bereichen hin zu analysieren. An der Ratte (weniger erfolgreich an der Maus) sind zahlreiche histochemische Untersuchungen zu diesem Problem von der Dalcqschen Schule angestellt worden (s. S. 283); sie führten zu der Ableitung des Embryonalknotenmaterials der Blastozyste aus dem Bereich einer basophilen Zone des ungefurchten Eies. Vom Kaninchen liegen nur sehr wenige histochemische Befunde vor. Diese betreffen die Frage nach der Existenz einer solchen basophilen Zone (Alberta Jones-Seaton 1950). Morphologische Untersuchungen der Furchung wurden von Bischoff 1842, van Beneden 1875, 1880, Assheton 1895a—d und Gregory 1930 durchgeführt. Die Ergebnisse sind widerspruchsvoll (S. 275ff.). Andererseits dienen als Objekte für die entwicklungsphysiologischen Ausschaltungsexperimente vor allem Keime von Kaninchen (Seidel 1952, 1954, 1960a) und Maus (Tarkowski 1959, Tarkowski und Wróblewska 1967, Mulnard 1965), während die Ratte nur von Nicolas und Hall 1942 untersucht wurde. So fehlen zu der hinsichtlich der Histochemie am besten bekannten Spezies entwicklungsphysiologische, zu den entwicklungsphysiologisch gut analysierten Arten topochemische Befunde. Für das Kaninchen sollen im folgenden einige Befunde zur Differenzierung der Blastomeren vorgelegt werden.

Ein unterschiedliches histochemisches Verhalten der Blastomeren ist nach den Standardfixierungen für Mukosubstanzen, nämlich Formol-Ca bzw. Glutaraldehyd-Ca, nicht zu beobachten (s. Teil I).

Es ist aber deutlich erkennbar nach Fixierung in FAE (s. unten), wenn man mit der Haleschen Eisenbindungsreaktion (Teil I, S. 175) oder HgBPB (Teil I, S. 211) färbt. HgBPB bringt sie besonders klar zu Gesicht.

Dies hat mich veranlaßt, diese Untersuchungen in größerem Maßstab fortzuführen. Das Ziel war zunächst, die morphologischen Verhältnisse zu klären und eine Genealogie der Blastomeren aufzustellen. Darüber hinaus ergaben sich einige histochemische Aspekte zur stofflichen Grundlage der Blastomerendifferenzen.

2.1. Material und histologische Methoden

In FAE fixiert, in Paraffin eingebettet und in Serie geschnitten wurden 109 Keime von 20 Tieren. Sie verteilten sich auf die verschiedenen Entwicklungsstadien gemäß der folgenden Tabelle:

Stadium	Zahl der Spendertiere	Zahl der Keime
25 h Vorkernstadium	1	3
25 h 2-Zellen-Stadium	1	3
30 h	1	6
35 h	2	10
40 h	2	16
45 h	3	14
54 h	1	7
63 h	1	13
3 d	4	23
3 d 4 h	2	12
3 d 8 h	1	1
4 d	1	1

Material, das auf andere Weise fixiert wurde (z. B. für die Darstellung von Glykogen), ist in Teil I aufgeführt. Es wird hier nur ergänzend zur Besprechnung mit herangezogen.

Materialgewinnung und histologische Technik wurden in Teil I ausführlich besprochen. Abweichend davon wurde hier die FAE-Fixierung (Formol-Alkohol-Eisessig) verwendet, und zwar nach folgenden Richtlinien:

FAE (Formol-Alkohol-Eisessig):
(Alberta Jones-Seaton 1950, Dalcq 1951)

Ansatz

1. Alkohol 60% — 6 ml
2. Formol etwa 40 Gew.% — 3 ml
3. Eisessig — 1 ml

Mischung unmittelbar vor Gebrauch.

Ausführung

Zimmertemperatur 6—12 h; Auswaschen in 60% Alkohol.

Anschließend wurden die Keime über A 50, 40, 30, 20 und 10 in Aqua dest. überführt, in Agarose eingeschlossen (Teil I, S. 158), in der Alkoholreihe entwässert und über Zedernholzöl in Paraffin eingebettet (vgl. Teil I, S. 159).

Der Schnitt ist nach FAE-Fixierung besonders schwierig. Das ist vor allem auf die Existenz der Mukoproteidschicht zurückzuführen, die ja bei Ratte und Maus, an denen die Dalcqsche Schule ihre Untersuchungen (nach FAE) vorwiegend durchgeführt hat, fehlt. Die Mukoproteidschicht wird in FAE „teilweise gelöst" (s. Dalcq 1951) und ändert ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften dahingehend, daß sie bei der Entwässerung extrem, weitaus stärker als nach anderen Fixierungen, schrumpft, und bei Berührung des Paraffinschnitts mit Wasser (beim Strecken) wieder quillt. Das hat zur Folge, daß sich der Schnitt wirft. Man kann dies nicht durch besonders energisches Strecken ausgleichen: Oberhalb etwa 38 °C werden die zytologischen Strukturen zerstört. Ich habe mir bei diesen Schnitten von FAE-fixierten Furchungsstadien nur dadurch helfen können, daß ich, jedenfals bei Keimen mit dicker Mukoproteidschicht (älter als 45 h p. c.), bei jedem Schnitt vor dem Strecken das umgebende Paraffin mit Präpariernadeln unter dem Binokular entfernte. Die Verwendung wasserarmer Streckmedien bringt wesentliche Vorteile nicht, da die Mukoproteidschicht dann meist noch während des Trocknungsprozesses quillt oder die Feinstruktur der Schnitte leidet. Erprobt wurden: Verschiedene Alkoholkonzentrationen, Glyzerin (hiernach schwammen die Schnitte in Wasser ab), Aceton, Methylbenzoat, Gemisch nach Ruyter (s. Romeis 1948, § 547). Von diesen letzteren Methoden bewährte sich am besten folgende Variante des Ruyterschen Gemischs: Aceton 2 *ml*, Methylbenzoat 2 Tropfen (mischen), Aqua dest. 4 *ml*.

2.2. Ergebnisse

2.2.1. Protein: Hg-Bromphenolblaufärbung (HgBPB)

A. Morphologische Darstellung der Blastomerendifferenzen

Eine vorläufige Orientierung über die topographischen Verhältnisse der Präparate, die mit HgBPB gefärbt wurden, vermitteln die Abb. 1a—e:

63 h wie 3 d p. c. (Abb. 1a—d) scheiden sich die Blastomeren deutlich in zwei Kategorien: Eine Gruppe schwach gefärbter („heller") Zellen wird umgeben von einem Ring dunkler, der aber nicht ganz geschlossen ist. An einer Stelle kommen helle Zellen mit dem perivitellinen Spalt bzw. der Zona in Berührung. Von den dunklen Zellen wird ein von Keim zu Keim unterschiedlich großer Bereich der Keimoberfläche eingenommen (vgl. Abb. 1a mit 1c und 1b mit 1d). Bei einer jungen Blastozyste (3d 8h p. c., Abb. 1e) sind dunkel gefärbt die Trophoblastzellen, während der gesamte Embryonalknoten als hell erscheint. Man vermutet, daß die Trophoblastzellen sich von den dunklen Zellen der Furchungsstadien herleiten, die Embryonalknotenzellen von den hellen, und daß die Blastozystenhöhle an der Grenze zwischen hellen und dunklen Zellen aufgetreten ist.

Gehen wir in der Betrachtung der Entwicklungsstadien zurück, so finden wir immer wieder ein Bild, das im Prinzip dem des 3d-Keims entspricht: Ein Kranz

dunkler Zellen umgibt unvollständig einen Haufen heller (s. Abb. 9, 10). Diese Verhältnisse sind schon 40h p. c. deutlich (s. Abb. 6d). Vor diesem Zeitpunkt ist noch keine Zelle ins Innere des Keims gelangt. Alle Blastomeren sind der Lage nach gleichwertig, jedoch treten die färberischen Unterschiede deutlich hervor (s. Abb. 4e, 5).

Auf Grund dieser Beobachtungen liegt der Schluß nahe, daß die hellen Zellen der frühesten Furchungsstadien den Embryonalknotenzellen Ursprung geben und v. v. die dunklen Zellen den Trophoblastzellen. Um diese Vor-

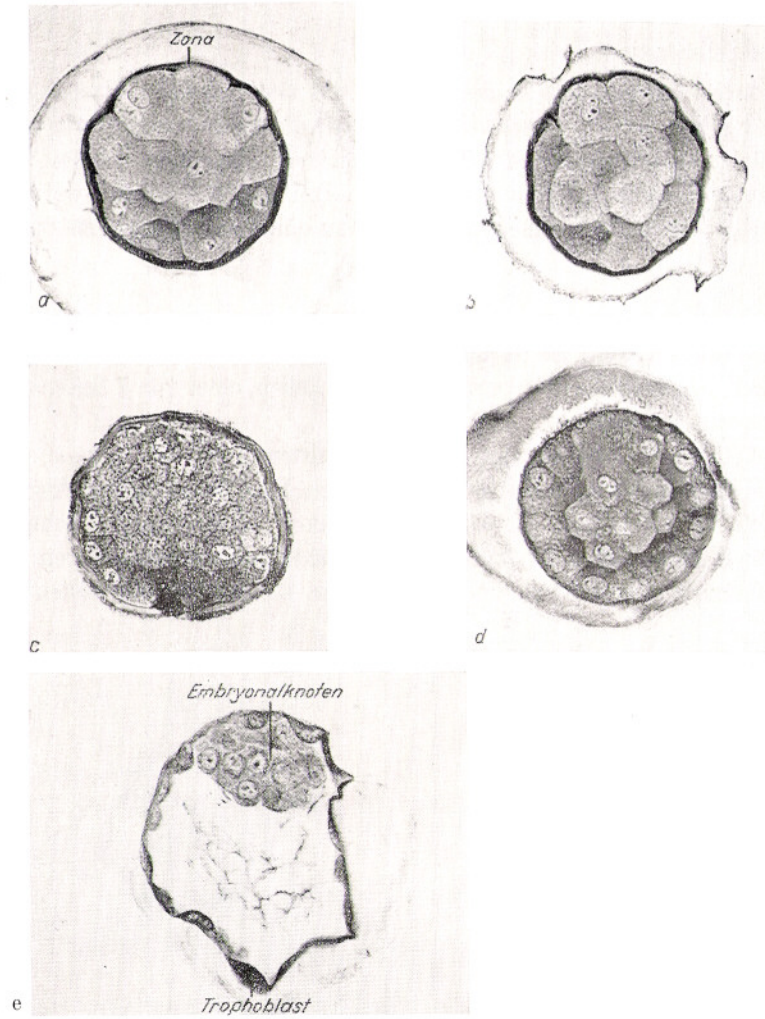


Abb. 1. Synopsis zur Differenzierung der Blastomeren. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×. a: 63 h p. c.; b: 63 h p. c.; c: 3 d p. c.; d: 3 d p. c.; e: 3 d 8 h p. c.

stellung zu prüfen, sollen zunächst Schnittbilder der Furchungsstadien genauer beschrieben werden.

25 h p. c.: 2-Zell-Stadium

Von beiden Blastomeren war in allen 3 untersuchten Fällen eine mit HgBPB geringfügig stärker tingierbar. Bei einem Ei ist in der Zelle, die insgesamt dunkler ist, der der Furche benachbarte Zytoplasmabereich am stärksten gefärbt. Auf allen Schnitten des Eies ergibt sich das gleiche Bild (vgl. Abb. 2). Insgesamt sind die Unterschiede aber sehr diskret.

30 h p. c.: 4-Zell-Stadium

Sehr geringe Differenzen in der Färbbarkeit der einzelnen Blastomeren sind durchaus zu sehen, jedoch so schwach, daß man die ganze Schnittserie eines Eies (Abb. 3) durchmustern muß, um mit einiger Sicherheit bestimmte Zellen als heller als die anderen ansprechen zu können (Abb. 3e—i). Die dunklen Zellen weisen wieder eine gegenüber den hellen vermehrte Tendenz zu einer zentralwärts stärkeren Färbung auf.

35 h p. c.

Von diesem Zeitpunkt an wurde in meinem Material eine Blastomerendifferenz recht deutlich. Als Beispiele seien ein Keim von 6 Zellen, einer von 7 Zellen und einer von 8 Zellen wiedergegeben.

Der 6-Zell-Keim (Abb. 4) zeigt auf den Schnitten 1—5, (Abb. 4a—e) sehr klar färberische Unterschiede zwischen den Blastomeren. Eine Zelle (auf den Abbildungen rechts unten) ist sehr stark angefärbt, eine andere (oben) dagegen schwach, die dritte zeigt ein färberisches Verhalten, das zwischen den beiden anderen liegt; sie ist aber wohl mehr dem dunklen Typ zuzurechnen. Bei den dunklen Zellen fällt eine

a b

Abb. 2. Keim 25 h p. c., 2-Zellen-Stadium. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×. Zwei Schnitte vom Anfang der Serie von einem Keim. Die in den Abbildungen unten gelegene Blastomere ist geringfügig stärker gefärbt.

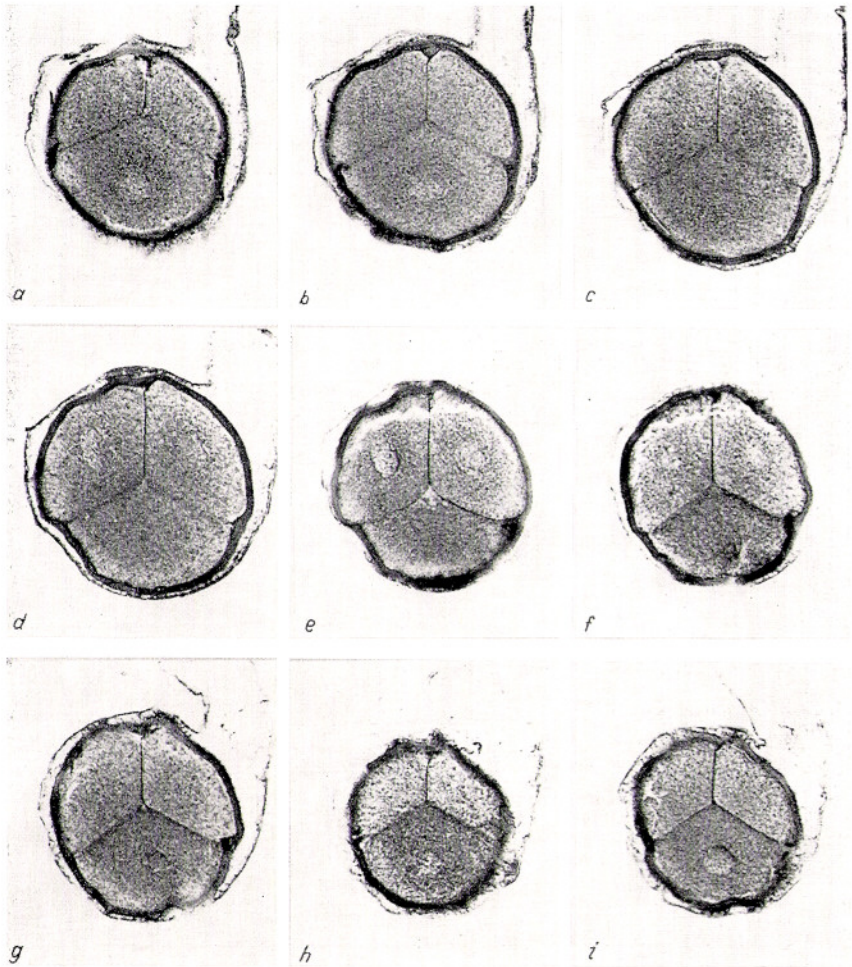


Abb. 3. Keim 30 h p. c., 4 Zellen. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×. Auf den Abb. 3e—i ist die unten gelegene Zelle stärker gefärbt als die beiden oben gelegenen.

Betonung der zentralen Partien des Zytoplasmas auf. Diese Erscheinung läßt daran denken, daß es sich um eine artefizielle Polarisationserscheinung handeln könnte, wie sie bei einigen Fixierungsmethoden leicht entstehen (vgl. auch S. 269). Es ist aber meines Erachtens nicht möglich, die vorliegenden Farbunterschiede auf diese Weise schlüssig zu deuten, wie folgende Überlegungen dartun:

Nimmt man an, daß das Fixierungsgemisch in gerader Front von der Seite der dunklen Zellen her angerückt wäre (oder umgekehrt), so müßten solche Polarisationserscheinungen ganz entsprechend auch in der hellen Blastomere zu erkennen sein, und zwar mit einem Maximum der

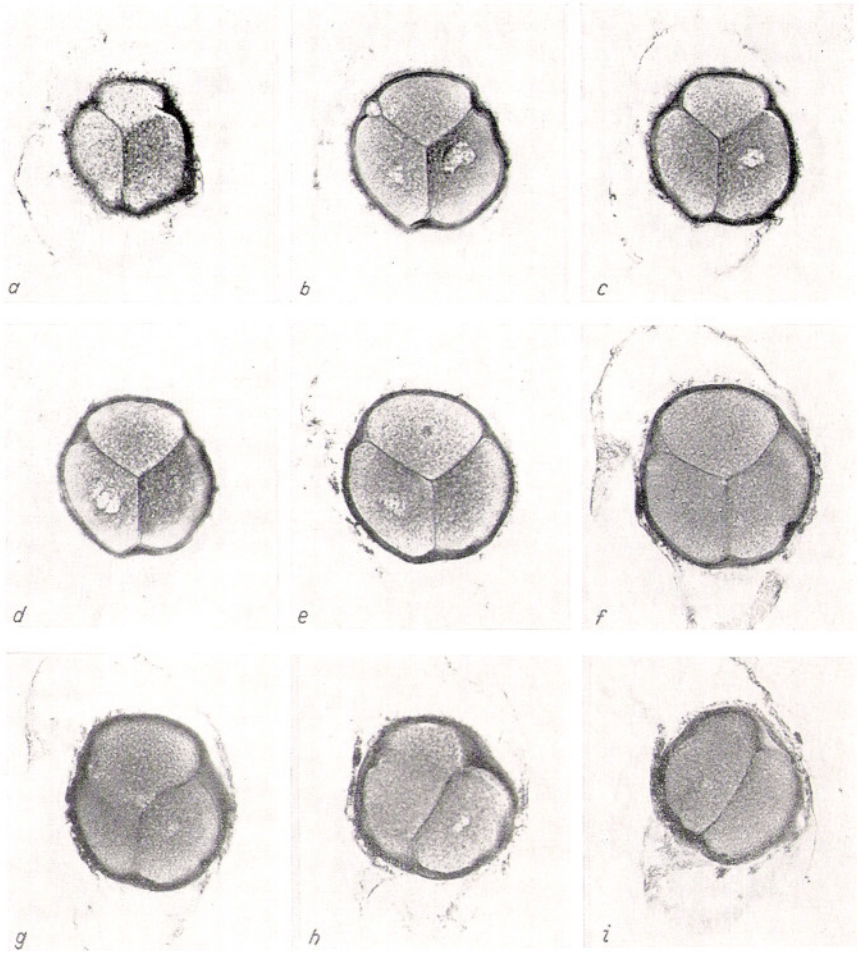


Abb. 4. Keim 35 h p. c., 6 Zellen. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×.

Färbung an der Peripherie. Dies ist nicht der Fall; die helle Zelle zeigt ebenfalls eine sehr leichte Betonung des Zentrums. Zudem könnte das Färbungsmaximum nicht in beiden dunklen Zellen genau zentral liegen, sondern müßte zumindest in einer etwas nach seitlich verschoben sein. Wenn man davon ausgeht, daß das Fixierungsmittel von allen Seiten gleichmäßig eindrang, so müßte man im Gegensatz dazu Polarisationserscheinungen in genau radiärer Richtung erwarten, die in allen Zellen ein Färbungsmaximum an der gleichen Stelle, im Zentrum oder an der Peripherie, hervorrufen. Dies ist nicht zu beobachten. Es treten, wie ich auch bei anderen Keimen regelmäßig feststellte, Zellen auf, die niemals derartige Polarisationserscheinungen deutlich zeigen, und dies sind stets die als heller erscheinenden Zellen. Wie wohl aus den Abbildungen einigermaßen deutlich hervorgeht, sind die dunklen Zellen insgesamt stärker gefärbt. Eine Polarisation kann nicht einen Unterschied in der Geamt-Farbstoffaufnahme der Zelle vortäuschen. Möglicherweise stellt

die Aggregation mit HgBPB stark färbbaren Materials in den zentralen Zellpartien ein Spezifikum der dunklen Zellen dar. Dies mögen die Abbildungen weiterer Keime, vor allem auch späterer Stadien, veranschaulichen.

Ein anderer Keim, hier nicht abgebildet, hat 7 Zellen. Eine Blastomere ist deutlich heller als alle anderen. Die ihr gegenüberliegende hat sich am stärksten gefärbt. So erhält man geradezu das Bild eines Gefälles.

Eine strenge Scheidung der Blastomeren in zwei Kategorien, hell oder dunkel, läßt sich bei den bisher beschriebenen Stadien nicht durchführen. Man findet immer wieder Abstufungen der Färbbarkeit. Wenn die Keime jedoch noch mehr Zellen bilden, gibt sich eine Diskontinuität zu erkennen.

Die Abb. 5 zeigt drei Schnitte eines Keims im Alter von ebenfalls 35 h p. c., der schon 8 Zellen besitzt. Hier nimmt eine der Blastomeren in mehrfacher Hinsicht eine Sonderstellung ein: Sie ist schwächer als die anderen gefärbt und hat ihre größte Ausdehnung in radiärer Richtung. Im Gegensatz dazu sind die dunklen Zellen tangential gestellt. Bei der Zelle rechts unten, die eine Ausnahme zu sein scheint, wird auf weiteren, hier nicht abgebildeten Schnitten ebenfalls eine mehr tangentiale Ausrichtung deutlich. Weiterhin zeigen die stark gefärbten Blastomeren eine besonders starke Anfärbung des Zytoplasmas in den zum Zentrum des Keims gerichteten und der hellen Zelle benachbarten Partien. Die helle Zelle läßt kaum eine Andeutung einer solchen Polarität erkennen. Wie Bilder dieser Art deutlich machen, darf man durchaus an der Vorstellung von einem artefiziellen Charakter der dargestellten Polarisationen zweifeln. Besonders hinweisen möchte ich darauf, daß bei diesem Keim auch die ovalen Kerne eine Tendenz zeigen, sich wie die Zellen auszurichten: In den dunklen Blastomeren tangential (Abb. 5a), in der hellen radiär (Abb. 5b, c). Ob in diesem Keim nur eine Zelle als deutlich heller den anderen gegenüber angesprochen werden kann oder andere sich ähnlich verhalten, kann ich nicht sagen. Die weiteren Schnitte der Serie waren nicht genau analysierbar, weil sich die Mukoproteidschicht daraufgeschlagen hatte.

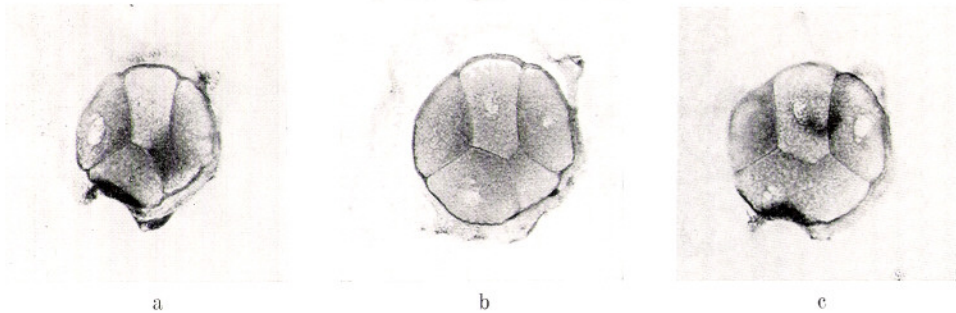


Abb. 5. Keim 35 h p. c., 8 Zellen. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×.

40 h p. c.

Die Bilder des in Abb. 6 dargestellten Keims von 12 Zellen lassen sich gut an die vom zuvor beschriebenen anschließen: Eine Gruppe von 3 hellen Zellen wird unvollständig umfaßt von einem Kranz dunkler. Die beim vorigen Keim dargestellten zytologischen Charakteristika sind nur schwach ausgeprägt, aber wohl erkennbar. Die Schnitte auf Abb. 6f—h zeigen nun allerdings etwas Überraschendes: Hier scheint eine helle Blastomere auf der Gegenseite zwischen den dunklen Zellen hindurch den perivitellinen Spalt (bzw. die Zona) zu erreichen. Die hellen Zellen der Abb. 6e sind auf Abb. 6g nicht mehr getroffen; an ihrer Stelle liegen dunkle, mit

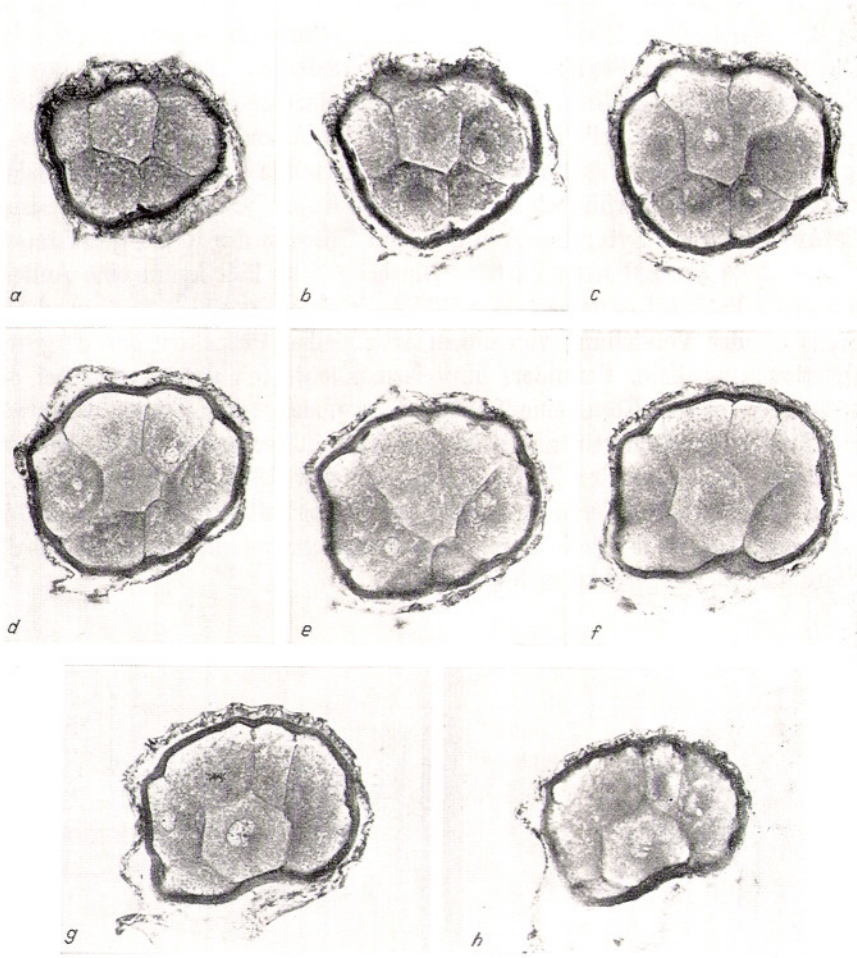


Abb. 6. Keim 40 h p. c., 12 Zellen. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×.

Mitose. Ein Zusammenhang zwischen allen hellen Zellen mag aber bestehen (vgl. Abb. 6e, f). Der hier dargelegte Befund wird noch zu diskutieren sein.

Ein anderer 40-h-Keim ist in Abb. 7 wiedergegeben. Er zeigt deutlich einige besonders dunkle Blastomeren (auf der Abbildung zwei). Die übrigen sind heller, am hellsten diejenige, die im Zentrum liegt. Die dunklen Zellen besitzen eine grobmaschige Zytoplasmastruktur in der Umgebung der Kerne, aber keine Polarität. Das Zytoplasma der hellen Zellen ist feinkörnig strukturiert, am feinsten das der zentralen Zelle.

45 h p. c.

Bei der Beobachtung von einzelnen Schnitten erhält man am häufigsten Befunde, die etwa der Abb. 8 entsprechen: Zwei, manchmal auch eine oder mehrere helle Blastomeren werden von dunklen vollständig umschlossen. Schnittserien dagegen bringen meist eine Lücke im Kranz der dunklen Zellen zu Gesicht, durch die die hellen in Kontakt mit dem perivitellinen Spalt stehen. Diese Lücke bleibt unterschiedlich groß. Sie ist von der Breite mehrerer Zellen wie in Abb. 9 oder häufiger nur einer Zelle wie in Abb. 10. Wenn ich die Lücke auch manchmal nicht deutlich sah, so konnte ich ihre Existenz jedoch in keinem Fall sicher ausschließen: Die er-

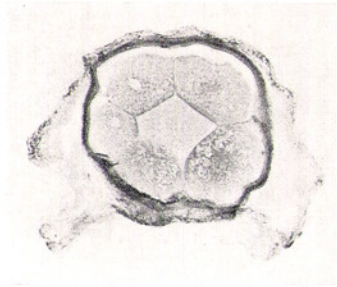


Abb. 7. Keim 40 h p. c. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×.

8 9 10

Abb. 8—10. Keime 45 h p. c. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×.

haltenen Schnittbilder ließen immer die Möglichkeit offen, daß diese Verbindung in den ersten oder letzten Schnitten der Serie lag, bei denen naturgemäß wegen der geringen Zahl der getroffenen Zellen eine Einordnung als dunkel oder hell nicht immer sicher möglich ist. Für eine solche Einordnung ist der Vergleich mehrerer Zellen eines einzigen Schnittes notwendig. Liegen diese auf verschiedenen Schnitten, so wird der Vergleich unsicher, da die Stärke der Färbung in verschiedenen Schnitten auch bei paralleler Behandlung oft verschieden ausfällt.

Die zytologischen Charakteristika der einzelnen Zellen entsprechen den bereits dargestellten: Zellen und Kerne sind im Fall der dunklen Blastomeren meist tangen-

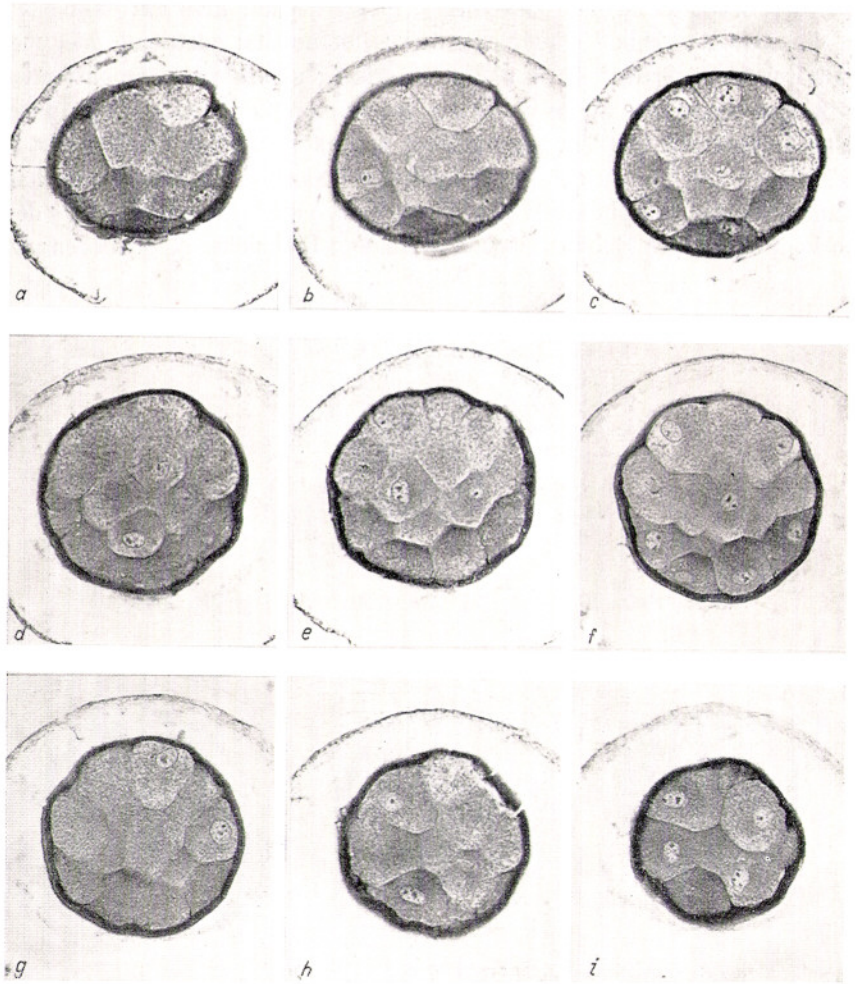


Abb. 11. Keim 63 h p. c. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×.

tial gestellt, im Fall der hellen rund oder radiär gestellt; das Zytoplasma der dunklen Zellen ist in den zum Zentrum gelegenen Partien verdichtet.

54 h p. c.

Die Schnitte, die ich von Keimen aus diesem Stadium habe, ähneln vollständig denen vom 45-h-Keim der Abb. 9 und 10 und vom 40-h-Keim der Abb. 6c—e mit dem Unterschied, daß sich die Zahl der Zellen vergrößert hat: Ein Haufen heller Zellen wird unvollständig umgeben von dunklen. Die Zytologie ist im wesentlichen wieder gleich.

63 h p. c.

Auch zu dieser Zeit bleibt die Topographie der Keime im wesentlichen die gleiche. Während sich die Zellen weiterhin vermehren, ist nach wie vor die Masse der hellen Zellen von dunklen noch nicht ganz umgeben. Die dunklen Zellen zeigen die Verdichtung des Zytoplasmas in den zum Zentrum des Keims gerichteten Partien. Zellen und Kerne (Abb. 11f, h) sind meist in der Tangentialrichtung gestreckt. Die hellen Zellen lassen eine Polarität des Zytoplasmas nicht erkennen. Sie sind nicht gestreckt, sondern eher rundlich. Ihre Kerne haben sich radiär ausgerichtet (Abb. 11f). Das Ausmaß, in dem die dunklen Zellen die hellen umgreifen, ist von Keim zu Keim unterschiedlich: Obwohl man meist Bilder findet, die den Abb. 11d—f entsprechen, sind bei anderen Keimen nur geringe Bereiche der Oberfläche des inneren Zellhaufens frei. Andererseits hat man den Eindruck, daß die Bedeckung auch an mehreren anderen Stellen kleinere Lücken aufweisen kann.

3 d p. c.

Auf meinen Schnitten von dreitägigen Keimen hat sich das bisherige Bild im Prinzip nicht verändert. Der Teil des Umfangs, auf dem die dunklen Zellen die hellen umgeben, ist nach wie vor von Keim zu Keim unterschiedlich groß (s. Abb. 1c, d). Eine Verbindung der Masse der hellen Zellen zur Oberfläche besteht aber stets.

Alle untersuchten Eier dieses Stadiums habe ich aus der Tube entnommen.

3 d 4 h p. c.

Zu dieser Zeit fand ich die Keime teils im Uterus, und zwar unmittelbar an der Tubenmündung, teils im unteren uterinen Abschnitt der Tube. Diejenigen, die aus dem Uterus ausgespült wurden (7 Keime), ließen zumindest eine Andeutung des Blastozystenlumens erkennen, diejenigen aus der Tube (5 Keime) nicht. Uterus und Tube hatte ich zuvor etwa an der Stelle, an der sich das enge Tubenlumen in das weite Uteruslumen öffnet, durchtrennt.

Ich wählte dieses Stadium, um so weit wie möglich das Schicksal der hellen bzw. dunklen Blastomeren beim Übergang ins Blastozystenstadium aufzuklären. Als Beispiel bringe ich zwei Abbildungen von Schnitten, die für viele ähnliche stehen. Bei

dem Keim der Abb. 12 ist offenbar gerade ein Spalt aufgetreten zwischen den dunklen und hellen Zellen. Im Schnitt sind die dunklen Zellen etwas über den unteren Rand des Haufens der hellen geraten und befinden sich daher in einer anderen Ebene. Der Keim auf Abb. 13 besitzt bereits eine deutliche Blastozystenhöhle. Die Trophoblastzellen sind stark, die Embryonalknotenzellen schwach gefärbt. Man wird danach die Trophoblastzellen von den dunklen Blastomeren und die Embryonalknotenzellen von den hellen herleiten. Auf eine solche Herkunft deuten neben der Art der Färbung auch Form und Ausrichtung der Zellen und der Kerne. Eine Grenze zwischen dunklen und hellen Zellen vermag ich in den seitlichen Partien des Keims allerdings nicht exakt zu ziehen.

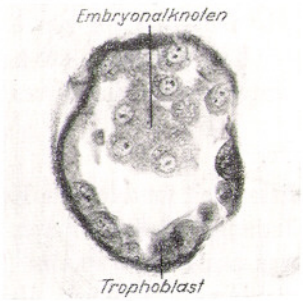
3 d 8 h p. c.

Ein Schnitt von einem Keim dieses Alters, den ich aus dem Uterus ausspülte, ist in der Abb. 1e dargestellt. Die Embryonalknotenzellen haben sich deutlich schwächer gefärbt als die Trophoblastzellen. Letztere sind wie ihre Kerne in der Tangentialrichtung gestreckt, während die ersteren als abgerundet erscheinen. Der Trophoblast bedeckt auch die Oberfläche des Embryonalknotens. Auf einigen Schnitten sieht es so aus, als bestünde eine Lücke in dieser Bedeckung (s. Abb. 1e). Da die Trophoblastzellen aber sehr gestreckt und ihre Randpartien sehr dünn sind, ist eine sichere Beurteilung ihres Zusammenhanges mit dem Lichtmikroskop nicht möglich.

4 d p. c.

Zu diesem Zeitpunkt liegt schon eine typische Blastozyste vor. Der Embryonalknoten hat sich zur Keimscheibe abgeflacht. Die Trophoblastzellen sind sehr stark gestreckt und bedecken die Keimscheibe vollständig als Raubersche Deckschicht.

12



13

Abb. 12. Keim 3 d 4 h p. c., aus dem Uterus. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×. Zwischen den dunklen Blastomeren und der Masse der hellen ist gerade ein Spalt aufgetreten; die ersteren haben sich etwas auf die letzteren gelegt infolge unvollkommener Streckung des Schnitts.

Abb. 13. Keim 3 d 4 h p. c., aus dem Uterus. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×. Es handelt sich bereits eindeutig um eine junge Blastozyste. Die Trophoblastzellen sind dunkel gefärbt.

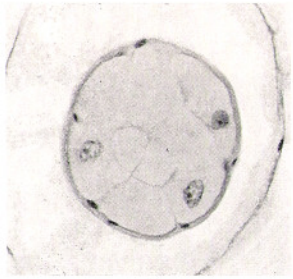
Eine Bewertung des färberischen Verhaltens ist wegen der starken Abplattung der Zellen nicht mehr möglich.

B. Histochemische Betrachtungen zu den Blastomerendifferenzen nach HgBPB-Färbung

Die HgBPB-Färbung wird als allgemeine Proteinfärbung aufgefaßt, stellt aber vielleicht doch bevorzugt basische Proteine dar (s. Teil I, S. 211). Die Frage der Rolle der Protein-Aminogruppen bei der HgBPB-Färbung muß zur Zeit als unentschieden gelten. Über eine Bedeutung solcher Gruppen für das Zustandekommen der geschilderten Bilder von den Blastomerendifferenzen könnten daher nur weitere Proteinfärbungen Auskunft geben.

Auch mit verschiedenen anderen Färbungen, sofern diese das Zytoplasma deutlich tingieren, z. B. mit starker Haemalaun-Färbung (Abb. 14), stellt man nach FAE-Fixierung unter den Blastomeren schwache Differenzen fest. Man darf daher wohl die mitgeteilten färberischen Differenzen zunächst schlechthin als Ausdruck einer unterschiedlich dichten Lagerung der Proteine des Zytoplasmas deuten.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, weshalb nach anderen Fixierungen als FAE solche Differenzen nicht sichtbar sind (Bouin s. Abb. 15, Glutaraldehyd-Ca s. Abb. 16). FAE ist ein Fixierungsgemisch, das für zytomorphologische Untersuchungen sehr gut geeignet, zur Darstellung von Proteinen aber nicht optimal ist. Nach Formol- und Glutaraldehydfixierung wiederum schrumpfen die Zellen stark, nach FAE kaum. Es ist daher zu erwarten, daß eine unterschiedliche Dichte des Zytoplasmas durch FAE besser erhalten wird. Andererseits wird durch FAE



14

15

16

Abb. 14. Keim 63 h p. c. FAE, Paraffinschnitt, HE. 260×. Nach HE-Färbung sind eben angedeutete Blastomerendifferenzen erkennbar.

Abb. 15. Keim 3 d p. c. Bouin, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×. Blastomerendifferenzen sind nicht erkennbar.

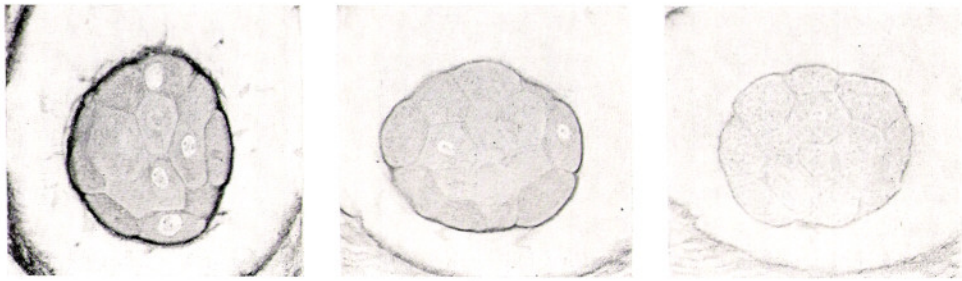
Abb. 16. Keim 3 d p. c. Glutaraldehyd-Ca, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×. Blastomerendifferenzen sind nicht erkennbar. Die Mukoproteidschicht ist so schwach gefärbt, daß sie nicht zur Darstellung kommt.

sicher eine Reihe von Substanzen aus dem Gewebe extrahiert (sMS s. S. 269, Glykogen s. unten; auch lipidlösliches Material infolge der Alkoholkomponente). Protein, das mit paraplasmatischen Substanzen assoziiert ist, könnte mit ihnen extrahiert werden. Dadurch könnte eine unterschiedliche Dichte der übrigen Zytoplasmaproteine deutlicher hervortreten (vgl. S. 281f; zur Extraktion von Histonen durch Essigsäure vgl. Dick und Johns 1968). Man müßte also offenlassen, ob außer durch unterschiedliche Gesamtkonzentration von Protein auch durch eine besondere Verteilungsweise einzelner Protein-Fraktionen oder anderer Substanzen die unterschiedlichen färberischen Eigenschaften der Blastomeren bedingt sein können.

2.2.2. Glykogen

In den Furchungsstadien findet sich Glykogen nach FAE auch nach Verwendung der empfindlichen Bulmer-Technik nur sehr spärlich, und zwar ähnlich verteilt wie das HgBPB-färbbare Material (Abb. 17) (Methodik s. Teil I, S. 163).

Glykogen wird durch FAE in vielen Organen zwar erhalten, doch ist diese Fixierung sicher nicht optimal (zur Glykogen-Fixierung vgl. Teil I, S. 162). So erschien es mir als denkbar, daß eine in oder nach FAE lösliche Glykogen-Fraktion extrahiert worden war, und daß möglicherweise die zurückgebliebenen Lücken zu einem Negativbild der Gesamt-Glykogen-Verteilung geführt hätten. Ich habe daher Furchungsstadien mit Glykogen-Fixierungsmitteln behandelt und mit der Bulmer-Methodik auf Glykogen untersucht, und zwar die Altersstufen 25 h p. c., 35 h p. c., 45 h p. c., 3 d p. c. und 3⅓ d p. c. Die Ergebnisse wurden bereits in Teil I (S. 164) geschildert und sollten hier nur noch einmal rekapituliert werden. 3 d und 3⅓ d p. c. zeigt sich ein unterschiedlicher Glykogen-Reichtum der inneren und der äußeren Blastomeren: Die inneren Blastomeren enthalten eine höhere Glykogen-Konzentration (vgl. Abb. 18, Teil I Abb. 16).



a b c

Abb. 17. Keim 54 h p. c. FAE, Paraffinschnitt. 260×.
a) PAS. Blastomerendifferenzen ähnlich wie nach HgBPB.
b) Glykogendarstellung in der Bulmer-Technik. Blastomerendifferenzen wie in Abb. 17a.
c) Wie Abb. 17b, doch Amylase-Behandlung. Die in Abb. 17b angefärbten Substanzen der Blastomeren sind Amylase-labil.

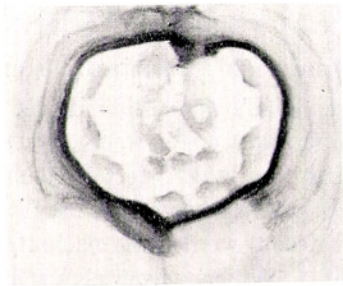


Abb. 18. Keim 3 d p. c. Gendre, Paraffinschnitt, Glykogendarstellung in der Bulmer-Technik. 260×. Zwischen präsumptiven Embryonalknoten- und Trophoblastzellen ist ein artefizieller Schrumpfungsspalt aufgetreten. Glykogenreichtum der inneren Blastomeren. Die äußeren Zellen zeigen eine sehr deutliche Glykogen-Aggregation in den zentralen Zytoplasmapartien. Dies erinnert an Polarisationserscheinungen im Rahmen der Alkoholflucht des Glykogens. Zona und vor allem Mukoproteidschicht erwiesen sich als partiell resistent gegenüber Amylase.

Da sich nach diesen Fixierungen die Struktur der Keime sehr viel weniger gut erhält als nach FAE, ist eine genauere Auswertung erschwert. Beeinträchtigt wird sie dadurch, daß diese Fixierungsmittel am Glykogen mit Sicherheit Polarisationserscheinungen hervorrufen können (vgl. dazu Abb. 18). Außerdem ist bekannt, daß das Glykogen von Zellen, die in verschiedener Tiefe eines Gewebsblocks liegen, unterschiedlich gut fixiert wird. Dies bedeutet eine Einschränkung der Aussagekraft dieser Untersuchungen.

Bei HgBPB-Färbung von Schnitten Rossman-fixierter Eier wurden die inneren Zellen unerwarteterweise wie mit der PAS stärker gefärbt als die äußeren. Da das Glykogen bei diesen Fixierungen als Protein-Komplex erhalten wird, stützen diese Beobachtungen die auf S. 262 dargelegte Vorstellung vom Zustandekommen der FAE-HgBPB-Bilder: Protein, das mit paraplasmatischen Substanzen (hier Glykogen) assoziiert ist, wird evtl. durch FAE extrahiert. Dadurch erscheinen Zellen, die reich an solchen paraplasmatischen Substanzen sind, nach FAE-HgBPB hell.

Insgesamt scheinen mir die erhaltenen Befunde dafür zu sprechen, daß 3 d p. c. tatsächlich ein besonderer Reichtum der inneren Zellen an Glykogen besteht.

2.2.3. Mukosubstanzen und interferierende RNS nach FAE

2.2.3.1. Mukosubstanzen allgemein: PAS

Die PAS macht an Schnitten von FAE-fixiertem Material eine sehr diskrete Blastomeren-Differenz sichtbar, die im Einzelnen ganz den Ergebnissen der HgBPB-Färbung entspricht (Abb. 17a). Nach Amylase-Behandlung sind die Bilder ähnlich, aber noch weniger deutlich.

Eine Verteilung von Mukosubstanzen, die der der HgPBP-positiven Proteine entspricht, darf also für FAE-fixiertes Material angenommen werden.

2.2.3.2. Saure Mukosubstanzen und interferierende RNS

2.2.3.2.1. Eisenkolloid-Bindungs-Reaktion (Hale)

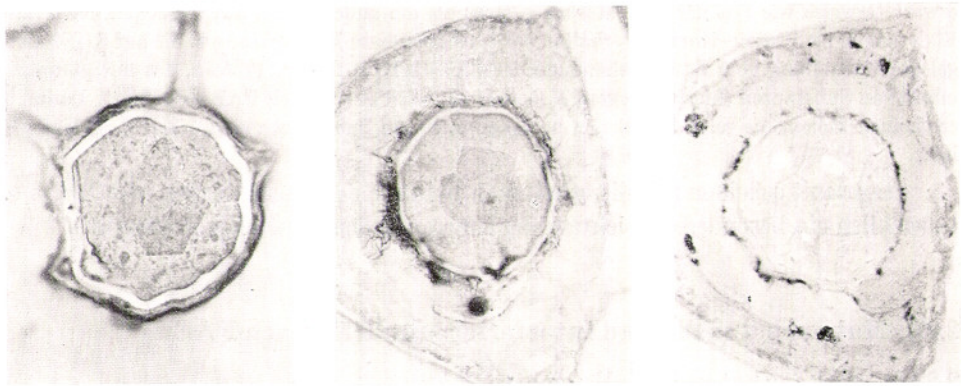
Die Halesche Eisenkolloidbindungsreaktion in der Modifikation von Mowry (1963) bringt Blastomerendifferenzen etwas wechselnd, aber doch oft sehr deutlich zu Gesicht, wenn die Schnitte von FAE-fixierten Keimen stammen. Ich habe die Stadien 45 h und 3 d p. c. daraufhin genauer untersucht.

45 h p. c. (etwa 14—18 Zellen) werden die nach HgBPB helleren Blastomeren stärker gefärbt (Abb. 19a, b). Außerdem zeigen die nach HgBPB dunklen (äußeren) Zellen eine Aufhellung in den dem Zentrum des Keims, d. h. den präsumptiven Embryonalknotenzellen, zugekehrten Zytoplasmabereichen. Demnach ergibt sich ein zu HgBPB völlig komplementäres Verhalten.

An den älteren Keimen des Morula-Stadiums (3 d p. c.) konnte ich allerdings bei den wenigen Präparaten, die ich angefertigt habe, vergleichbare Feststellungen nicht machen. Hier hatten sich die präsumptiven Trophoblastzellen stärker tingiert.

In jedem Fall waren die Hale-Reaktion insgesamt und auch die Blastomerendifferenzen nach alkalischer Vorbehandlung (Verseifung, Teil I, S. 189) verstärkt.

Bei Anwendung anderer Reaktionen auf sMS habe ich nach FAE und nach sMS-Fixierungen (Teil I, S. 157) eindeutig Blastomerendifferenzen nicht gesehen (s. S. 173). Daher war eine Prüfung notwendig, ob die Hale-Reaktion nach FAE wirklich sMS darstellt. Sie wurde u. a. mit Ribonuklease (RNase) durchgeführt (s. u.).



a b c

Abb. 19. Keim 45 h p. c. FAE, Paraffinschnitt, Hale-Reaktion, RNase-Kontrolle. 260×.

a) Hale. Die zwei inneren Blastomeren sind stärker gefärbt als die äußeren.

b) Hale — Kernechtrot. Dieser Keim zeigt drei innere Blastomeren. Sie geben auch hier eine stärkere Hale-Reaktion als die äußeren.

c) RNase — Hale. Nach RNase-Einwirkung verbleibt keine Hale-positive Substanz in den Blastomeren.

2.2.3.2.2. RNase-Labilität der Hale-positiven Substanzen

Prinzip

Eine Spaltbarkeit der Substanzen durch RNase (Ribonuklease) wird nach den gleichen Prinzipien geprüft, die für die NAase- (Teil I, S. 194) und Hyaluronidase- (Teil I, S. 205) Anwendung gelten. Ist die Substanz spaltbar, so besagt dies, daß es sich um RNS handelt.

Material

1. RNase, 4× kristallisiert, salzfrei (Fa. Carl Roth, Karlsruhe), wäßrige Lösung, 0,5 mg/ml (w/v).
2. Material für Färbung (Hale) s. Teil I, S. 175.

Ausführung

Entparaffinierte, luftgetrocknete Schnitte.

1. RNase-Lösung 37 °C. 1, 2 bzw. 5 Std. Inkubation in Küvette. Kontrolle: Aqua dest. dto.
2. Fließend Leitungswasser 5 Min., 2× Aqua dest.
3. Färbung: Hale s. Teil I, S. 175.

Resultat

Die Färbung von RNS-haltigen Substanzen ist nach RNase-Behandlung im Gegensatz zur Kontrolle abgeschwächt oder negativ.

Ergebnisse

Um nähere Aufklärung über die positive Hale-Reaktion bei FAE-Fixierung (S. 264) zu erhalten, führte ich Kontrollen mit RNase-Behandlung durch. Hier war ein Effekt demonstrabel: Die Blastomeren der behandelten Schnitte wurden Hale-negativ. Nur in den Keimhüllen verblieb positives Material (Abb. 19c). Man möchte daher schließen, daß es sich bei der Hale-positiven Substanz in diesem Fall um RNS gehandelt hat. Dazu ist zu bemerken, daß die Hale-Reaktion grundsätzlich nicht streng spezifisch für sMS ist. In der hier verwendeten Modifikation nach Mowry ist zwar auch nach meinen Beobachtungen die Spezifität sehr gut, wenn die Objekte mit Formol-Ca oder Glutaraldehyd-Ca fixiert worden waren. Es ist aber wohl zu vermuten, daß die Verhältnisse nach einer inadäquaten Fixierung wie FAE anders liegen: FAE ist ein sehr schlechtes Fixierungsgemisch für sMS (vgl. S. 269). Daher läßt sich eine nach FAE färberisch sichtbare Blastomeren-Differenz kaum auf die Verteilung von sMS zurückführen. Nukleinsäuren andererseits werden durch FAE gut, wenn auch wohl nicht optimal erhalten (vgl. Pearse 1968). Die Vorstellung, daß die Hale-positive Substanz RNS ist, wird ferner gestützt durch folgende Beobachtungen: Diese Substanz ist offenbar schon durch gering konzentrierte Salzlösungen extrahierbar. Nach Behandlung der Schnitte mit dem Puffergemisch der NAase (Teil I, S. 199) oder mit 0,9% NaCl-Lösung (Kontrolle für Hyaluronidase) fiel die Reaktion negativ aus. Ein solches Verhalten ist von RNS

bekannt (s. Pearse 1968). Übrigens machte dieses die Prüfung der dargestellten Substanzen auf NAase- oder Hyaluronidase-Labilität unmöglich, da dabei diese Salzlösungen zur Kontrolle verwendet werden müssen.

Beim Hale-Effekt könnte es sich natürlich auch um eine unspezifische Anfärbung von Protein handeln, und zwar kämen die negativ geladenen Gruppen der Proteine als Bindungsorte für das Eisenkolloid in Frage. Damit würde auch das zumindest 45 h p. c. komplementäre Verhalten im Vergleich zu HgBPB erklärt sein, sofern HgBPB die positiv geladenen Gruppen darstellt. Auf Grund der Ergebnisse der RNase-Behandlung scheint mir jedoch die Annahme berechtigt, daß RNS in den Blastomeren 45 h p. c. in verschieden starker Konzentration vorliegt, und zwar sind die präsumptiven Embryonalknotenzellen daran reicher als die präsumptiven Trophoblastzellen. Die RNS verhält sich damit im Vergleich zu den mit HgBPB dargestellten Proteinen komplementär.

2.2.3.2.3. Andere sMS-Reaktionen

Geprüft wurden nach FAE-Fixierung: AB (Teil I, S. 172), LID und LID-AB (Teil I, S. 178), Toluidinblau nach Kramer und Windrum (Teil I, S. 182), HID und HID-AB (Teil I, S. 184) sowie die Effekte einer alkalischen Vorbehandlung (Teil I, S. 189) und der Einwirkung von NAase (Teil I, S. 194). Von diesen Reaktionen brachte nur Toluidinblau gelegentlich sehr schwache Differenzen zu Gesicht. Diese Färbung habe ich jedoch sehr wenig verwandt, da sie neben sMS auch Nukleinsäuren tingiert und daher für eine histochemische Untersuchung von intrazellulär gelegenen Mukosubstanzen schlecht geeignet ist.

Nach Fixierungen für sMS (Formol-Ca, Glutaraldehyd-Ca) habe ich mit keiner der in dieser Arbeit verwendeten Reaktionen eindeutig Blastomerendifferenzen sehen können (Teil I, S. 173, 200).

Zwischen den beiden Gruppen von Blastomeren scheinen mir daher wesentliche Unterschiede im sMS-Gehalt nicht zu bestehen.

3. Zur Frage einer Polarität der Keimscheibe (Beobachtungen an Blastozysten-Flachpräparaten)

Es war zu prüfen, ob sich mit den von mir verwendeten Kohlenhydrat-Reaktionen eine Polarität der Keimscheibe zeigen läßt, bevor sie morphologisch faßbar wird. Zu diesem Zweck wurden von Blastozysten der Stadien 4—6 d p. c. Flachpräparate hergestellt und untersucht. Zur Gestalt solcher Flachpräparate vgl. Teil I, Abb. 9.

3.1. Material und Präparationsmethoden

Verwendet wurden 42 Blastozysten, die sich auf die einzelnen Stadien gemäß der folgenden Tabelle verteilten:

Stadium	Zahl der Keime
4 d p. c.	13
5 d p. c.	12
6 d p. c.	17

Flachpräparate wurden dadurch hergestellt, daß der Keim vom abembryonalen Pol her in den Meridianen bis an den Rand der Keimscheibe aufgeschnitten und flach ausgebreitet wurde (prinzipielles Vorgehen nach Seidel, unveröffentlicht; vgl. auch van Beneden 1880, Moog und Lutwak-Mann 1958, Lutwak-Mann und Hay 1962). Die Blastozystenhüllen als bei weitem kohlenhydratreichste Struktur mußten entfernt werden, da ihre Färbung die der Keimscheibe überdeckt. Die Methode von Lutwak-Mann u. a., bei der in Methanol fixiert wird, war daher nicht zu verwenden, denn in allen Methanol- oder Äthanol-haltigen Fixieringsgemischen verkleben Keimhüllen und Keimgewebe unlösbar miteinander. Nach Fixierung in Formol-Ca werden die Hüllen spröde und schwer zu handhaben; nach Bouin, welches Seidel verwendet, lassen sie sich leicht abziehen, aber die sMS werden schlecht erhalten. Daher habe ich nach einigen Versuchen zur Fixierung ein Glutaraldehyd-Ca-Gemisch verwendet, das in Anlehnung an Weissenfels (1967) für die Fixierung von sMS und für die Belange des Kaninchenkeims modifiziert wurde (Teil I, S. 157). Nach Entfernung der Hüllen wurden die Keime in einem alkoholischen Medium nachfixiert; hier schrumpfen sie, so daß man sie an einen Objektträger antrocknen kann, ohne daß sie bei späterer Entwässerung reißen. Man kann nun sämtliche histochemischen Prozeduren am Keim ausführen und hat nicht zu befürchten, daß er zerstört oder in stark gefärbten Lösungen verlorengeht.

Ausführung

Fixierung

a) Für histochemische Zwecke Glutaraldehyd-Ca:

Ansatz: 1. Glutaraldehydlösung 25% — 8 ml
2. Na-cacodylat-HCl-Puffer 0,05 m *p*H 7,05 mit 1% $CaCl_2$ (w/v) — 92 ml
1. und 2. werden unmittelbar vor Gebrauch zusammengegeben; der *p*H wird erneut eingestellt.

Ausführung: 4 °C, 12 h.

b) Für morphologische Zwecke Bouin s. Romeis 1948, § 305.

Präparation im Fixierungsgemisch: Unter dem Binokular Einschnitt in die Keimhüllen, abziehen mit 2 feinen Pinzetten. Aufschneiden der Blastozyste vom abembryonalen Pol aus in den Meridianen bis nahe an die Keimscheibe.

Nachfixierung in einem alkoholhaltigen Gemisch: Hierbei schrumpft der Keim, so daß er nach Rückführung ins Wasser auf einem Objektträger angetrocknet werden kann, ohne beim späteren Entwässern zu zerreißen. Zum Übergang in dieses Gemisch wird der flach ausgebreitete Keim zunächst mit einem Deckglassplitter bedeckt, anschließend wird das alkoholische Fixierungsmittel zugetropft:

Nach Glutaraldehyd oder Formol-Ca:

Ansatz: Formol etwa 40 Gew.% — 10 ml
Alkohol 96% — 90 ml
Ca-acetat — 0,5 g
(Lillie 1965)

Ausführung: 4 °C, 24 h;
nach Bouin: Gendre (s. Teil I, S. 156).
Alkoholreihe (10 % — Stufen), Aqua dest.
Ausbreiten auf Objektträger, antrocknen.
Färbungen usw. wie Schnitt.

Da in Material, das nicht in Paraffin eingebettet wurde, Lipide erhalten bleiben können, habe ich zur Kontrolle der Kohlenhydratreaktionen Lipidnachweise durchgeführt (vgl. auch Teil I, S. 172). Dabei habe ich auch einige Präparate untersucht, die nicht nachfixiert worden waren.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Sudanschwarz-B-Färbung zur Kontrolle der Kohlenhydratreaktionen

Wie die Sudanschwarz-B-Färbung zeigt, sind in den Blastozysten Lipide nur in spärlichen Mengen vorhanden. Eine geringe tröpfchenartige Anfärbung fand sich im Bereich der Keimscheibe und des Trophoblasten in gleichmäßiger, uncharakteristischer Anordnung.

3.2.2. Fettextraktion nach Baker zur Kontrolle der Kohlenhydratreaktionen

Die PAS und auch AB werden durch Baker-Extration deutlich abgeschwächt, was auf einen Anteil von lipidlöslichen Substanzen am Ausfall dieser Reaktionen hinweist. Am Verteilungsmuster (s. unten) änderte sich durch die Extraktion nichts.

3.2.3. Kohlenhydratreaktionen

PAS s. Teil I, S. 166; AB s. Teil I, S. 172; LID-AB s. Teil I, S. 178; AB-AG s. Teil I, S. 181; HID-AB s. Teil I, S. 184; Verseifung s. Teil I, S. 189. Nachweis gebundener NA mit NAase s. Teil I, S. 194).

Mit diesen Methoden konnte ich an 4 d und 5 d-Keimscheiben eine Polarität nicht erkennen.

In der Umgebung der Keimscheibe findet sich im Trophoblasten ab 5 d p. c. und deutlicher 6 d p. c. eine PAS-positive und NAase-labile sMS, die meist deutlich in einem umschriebenen Bereich des Keimscheibenrandes konzentriert ist. Dieses Feld ist von der Keimscheibe durch eine Zone schwächerer Färbung abgesetzt; 6 d p. c. liegt es stets mehr zum Vorderende der Keimscheine hin. Seitlich ist es aber nie scharf begrenzt, und ich vermag nicht zu sagen, ob man seiner Lage 5 d p. c. eine Bedeutung beimessen kann.

Die Keimscheibe selbst zeigt eine Verdichtung von PAS-positivem und alcianophilem Material am Vorderende und in der Mitte ab 6 d p. c. Die Verdichtung scheint mir auf die hier größere Zelldichte zurückzuführen zu sein. Die Substanzansammlung ist ebenfalls, aber weniger deutlich, NAase-labil. Da zu dieser Zeit Vorder- und

Hinterende der Keimscheibe morphologisch gut zu erkennen sind, erschien mir eine quantitative Auswertung nicht als lohnend. Durch alkalische Vorbehandlung wird die AB in jedem Fall verstärkt, am beschriebenen Muster ändert sich dadurch nichts.

Zusammenfassung der Ergebnisse zur Polarität der Keimscheibe

Eine Polarität der Keimscheibe vor der morphologischen Differenzierung von Vorder- und Hinterende ist bei der Untersuchung von Kohlenhydrat- und Lipid-Substanzen nicht nachweisbar. Die Bedeutung einer lokalen Aggregation von Sialomuzin im Trophoblasten der Keimscheibenumgebung ist nicht sicher. Die Blastozyste ist arm an Lipiden.

4. Entwicklungsphysiologische Diskussion der Ergebnisse

4.1. Die Polarität der Oozyte

Die zytochemische Analyse der frühesten Entwicklungsstadien beansprucht das besondere Interesse des Entwicklungsphysiologen, da in der Oozyte eine räumliche Ordnung vorgegeben sein muß, wenn sich ein strukturell gegliedertes System daraus entwickeln soll. Entwicklungsphysiologische Experimente zeigen die Existenz geordneter „Faktorenbereiche" oder „Zentren" (vgl. Seidel 1936, 1952a, 1960a). In zytochemischen Untersuchungen ist oft versucht worden, dafür topochemische Korrelate zu finden (s. die Arbeiten von Dalcq, Mulnard, Alberta Jones-Seaton). Versuche zur Lokalisierung innerhalb des Zytoplasmas sind aber mit einer besonderen Problematik behaftet. Wegen der Bedeutung, die diese Problematik auch für die Analyse von Furchungsstadien besitzt, soll sie hier an Hand eigener Beobachtungen an Oozyten kurz besprochen werden.

Fixiert man ein Ovar mit FAE, so sieht man auf dem Paraffinschnitt von Sekundär- und Tertiärfollikeln (s. Abb. 20) die Zona auf der oberflächennahen Seite, d. h. der Seite, von der die Fixierungsmittelfront heranrückte, meist aufgelöst. Beim Strecken entsteht hier leicht ein Spalt. Dieser Effekt wurde auch von Dalcq, dessen Schule FAE viel verwendet hat, beobachtet (Dalcq 1951) und auf eine partielle Lösung der sMS der Zona durch das Fixierungsgemisch zurückgeführt. Im Zytoplasma findet man an der zur Mitte des Ovars gelegenen Seite oftmals eine stärkere Färbung mit dem Maximum unter dem Plasmalemm. Dies tritt bei verschiedenen Färbungen, sofern sie überhaupt das Plasma tingieren, ein (eigene Beobachtungen nach HgBPB und Hale; vgl. Abb. 20). Die ziemlich konstante Lage dieser stärker gefärbten Zone zum Zentrum des Gewebsblocks hin muß zur Frage veranlassen, ob es sich hier nicht um ein Artefakt handelt, insbesondere unter Berücksichtigung dessen, was eben über die Zona gesagt wurde. FAE als alkoholisches Fixierungsgemisch vermag ganz sicher zu Polarisationserscheinungen zu führen, wie sie am besten von der Alkoholflucht des Glykogens bekannt sind: Stark hydrophile und im

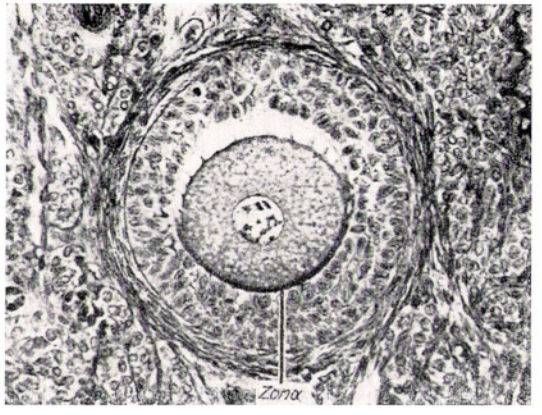


Abb. 20. Ovar, Sekundärfollikel. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 230×. Stärkere Anfärbung des Zytoplasmas der Eizelle im auf dem Bild unten gelegenen Abschnitt. Die Zona ist auf der oberflächennahen Seite (in der Abbildung oben) artefiziell gelöst.

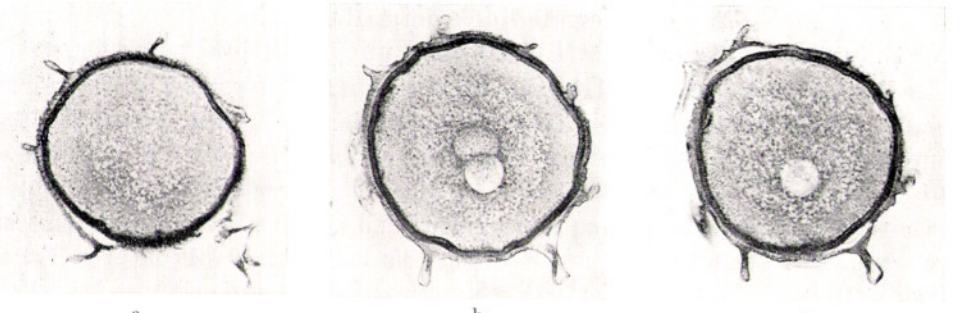
Zytoplasma einigermaßen leicht diffusible Substanzen weichen vor der heranrückenden Alkoholfront aus und sammeln sich in dem der Front abgewandten Teil der Zelle an. Umgekehrt verhalten sich lipophile Substanzen.

Dalcq allerdings meint, daß zwar PAS-positives Material, nicht aber basophiles Material verlagert wird (Dalcq 1951, 1955). Er verweist auf die Ergebnisse von Beobachtungen an unfixierten („in-vivo-Metachromasie") und isoliert fixierten Eiern. Ich habe ebenfalls einige einzellige Eier isoliert mit FAE fixiert, und zwar Oozyten, die ich durch Anstechen großer Graafscher Follikel gewonnen hatte, sowie Vorkernstadien besamter Eier. Letztere stammten von einem Tier, das ungewöhnlicherweise noch 25 h p. c. Vorkernstadien zeigte. Einige Oozyten habe ich mit FAE bzw. mit Glutaraldehyd-Ca fixiert, mit HID-AB auf sMS gefärbt, in Alkohol entwässert, von der Corona mechanisch befreit und in Xylol aufgehellt. Wie beim Drehen des Eies in allen Fällen deutlich wurde, war eine Seite stärker, und zwar in mehr blauen Tönen, gefärbt.

Auf Paraffinschnitten, die ich von anderen gleichartig gewonnenen Eiern hergestellt habe, war mit gleicher Färbung im Zytoplasma nicht recht eine Polarität zu erkennen.

Allerdings war meist die Zona nicht allseits gleich dick. Ob sie auch in vivo nicht gleichmäßig gestaltet ist, vermag ich nicht zu sagen. Jedenfalls macht ein ungleichmäßiger Durchmesser der Zona eine Analyse von in toto präparierten Oozyten bei Kohlenhydratnachweisen meines Erachtens praktisch unmöglich, da ihre Färbung bei weitem die des Plasmas übertrifft.

Auch mit der Interpretation von Schnittbildern möchte ich einstweilen zurückhaltend sein, was die Feststellung einer Polarität anbelangt. Auf Schnitten von



a b c

Abb. 21. Keim 25 h p. c., retardiertes Vorkernstadium. FAE, Paraffinschnitt, HgBPB. 260×. Drei Schnitte aus der Serie von einem Ei. In den Abb. 21a und c ist der unten gelegene Teil des Zytoplasmas etwa stärker gefärbt.

FAE-fixierten ungefurchten Eiern kann man nach HgBPB und Hale oft durchaus stärker gefärbte Zytoplasmapartien erkennen (vgl. Abb. 21a, c). Ihre Lage zu der durch die Lage des Kerns gegebenen Hauptachse ist aber bei den verschiedenen Eiern nicht ganz konstant. Wenn überhaupt Polarisationserscheinungen als Fixierungsartefakt auftreten können, so ist auch die Fixierung eines isolierten Eies nicht ein sicheres Mittel, sie völlig zu verhindern. Man wird kaum damit rechnen können, daß das Fixans wirklich exakt gleichmäßig von allen Seiten her eindringt. Wenn tatsächlich die Zona nicht allseits gleich dick ist, so wird es Stellen bevorzugter Penetration des Fixierungsgemisches geben. Zudem sinkt das Ei auf den Boden des Fixierungsgefäßes nieder, und hier ergibt sich infolge des austretenden Wassers zwangsläufig eine Schichtung. Auch durch mechanische Umwälzung der Fixierungsflüssigkeit wird sich dieses nicht ganz vermeiden lassen. Da der Schwerpunkt des Eies sicher nicht genau im geometrischen Zentrum liegt (bei reifen Oozyten schon wegen der exentrischen Lage des Kernes nicht), so wird es eine Tendenz des Eies geben, sich im Fixierungsgemisch in bestimmter Weise in Richtung zum Gravitationsfeld zu orientieren. Auch eine Drehung innerhalb der Zona ist bei reifen Eiern möglich. Zusammen mit einer Schichtung des Fixierungsgemisches (evtl. innerhalb der Zona) könnte es sogar zu konstant lokalisierten Polarisationserscheinungen kommen. Dies gilt sicher besonders für den Fall der Verwendung alkoholischer Fixierungsmittel. Aber es ist nicht einzusehen, warum nicht auch wäßrige Lösungen in gewissem Ausmaß ähnliche Effekte erzeugen können. Daher möchte ich jeder zytochemischen Analyse in toto fixierter oder gar in toto gefärbter Eier skeptisch gegenüberstehen, auch wenn später nur die Ergebnisse von Schnittbildern verwandt werden.

Es ist zu hoffen, daß andersartige Präparationsverfahren Ergebnisse bringen, die durch diese Vorbehalte nicht belastet werden (vgl. S. 284).

4.2. Polyspermieblock beim Kaninchen: Substanzen des perivitellinen Spalts und Reaktionen der Zona

Der Vergleich von ungefurchten, besamten bzw. unbesamten Eiern bringt einen auffälligen Befund in der Substrathistochemie: Im Zusammenhang mit der Imprägnation tritt im perivitellinen Raum eine sMS auf; sie fehlt bei unbesamten Eiern (Teil I, Abb. 18). Beim Kaninchen vermögen, im Gegensatz zu anderen Arten, sehr viele Spermien die Zona zu durchdringen und in den perivitellinen Raum zu gelangen. Hier kommt eine „Zona-Reaktion" als Polyspermieblock nicht in Frage (vgl. Braden u. a. 1954; Adams 1955). Eine solche Zona-Reaktion gibt es bei Schaf, Hund und Hamster, bei denen nur ein Spermium durch die Zona hindurchtritt, und, weniger ausgeprägt, bei Ratte und Maus (Braden u. a. 1954; Austin 1956).

Allerdings sieht man beim Kaninchen in Furchungsstadien immer Spermien in der Zona, d. h. sie vermochten die Zona nicht ganz zu durchdringen. Dies muß freilich nicht Zeichen einer Reaktion der Zona sein. Gewisse histochemische Veränderungen der Zona sind nach der Besamung, besonders einige Stunden danach (14 h p. c.), zu beobachten. So tritt eine stark AB- und Hale-positive innere Grenzschicht auf (Teil I, Abb. 26). Eine äußere Grenzschicht ist bei besamten Eiern stets stark Hale-positiv, bei unbesamten in vergleichbarem Maß erst nach alkalischer Vorbehandlung (Teil I, Abb. 18, 25, 26).

Über die Bedeutung dieser diskreten Veränderungen kann man zur Zeit nichts Sicheres sagen, zumal vergleichbare Untersuchungen an Arten mit bekannter Zona-Reaktion fehlen. Nicht entschieden ist, ob man beim Kaninchen von einer angedeuteten und spät eintretenden Zona-Reaktion sprechen kann. Wenn hier die Zona den Spermien bis zum Beginn der Auflagerung der Mukoproteidschicht 16 h p. c. unbegrenzt Durchtritt gewährt (Braden u. a. 1954), so muß der Polyspermieblock im Bereich des perivitellinen Spalts oder der Eizelloberfläche lokalisiert sein. Es liegt nahe, die im perivitellinen Raum auftretende sMS damit in Zusammenhang zu bringen.

Die Eizelloberfläche zeigt in meinen Bildern ebenfalls nach der Besamung eine sMS (Teil I, Abb. 26). Sie verhält sich histochemisch wie die des perivitellinen Spalts, und es ist fraglich, ob beide nicht nur artefiziell durch die Schrumpfung der Objekte voneinander getrennt sind. Die folgenden Erörterungen sollen daher für beide gemeinsam gelten.

Eine Abgabe von sMS in den perivitellinen Spalt bei der Besamung ist vor allem von Seeigeleiern bekannt. Sie wird auch hier in einen Zusammenhang mit dem Polyspermieblock gebracht (Moser 1939a und b; Runnström 1949, 1952; Rothschild und Swann 1951; Ishihara 1964). Für die Eier von Fischen sind sehr dezidierte Vorstellungen hinsichtlich der Abgabe solcher Substanzen von Dettlaff (1962) entwickelt worden; sie sollen von einem „hydrophilen Kolloid" des Eies abstammen und auch hier eine Bedeutung für den Polyspermieblock haben. Bei anderen Tieren wird vor allem an eine Herkunft von den Cortexgranula des Eies gedacht, die ihren Inhalt in den perivitellinen Spalt entleeren (vgl. Austin 1963, 1965; Seeigel: Moser 1939a und b; Runnström 1949 und 1952; Nereis: Pasteels 1966; Fallon und Austin 1967; Frosch: Wartenberg 1956; Rosenbaum 1958; Hebard und Herold 1967; Kemp und Istock 1967). Cortexgranula wurden auch bei Säugern beobachtet und in ähnlicher Weise gedeutet (Hamster: Austin 1956, Szollosi 1967; Kaninchen: Austin 1963, Hadek 1965, Krauskopf 1967; Ratte: Szollosi 1967). Lichtmikroskopisch und färberisch sind sie allerdings kaum zu erkennen.

Hinweise auf biochemische Grundprozesse des Polyspermieblocks vermögen nur wenige der vorliegenden Beobachtungen zu geben. Sie betreffen in erster Linie die Zona-Reaktion, geben aber vielleicht auch Denkmöglichkeiten hinsichtlich der Funktion der Substanzen des perivitellinen Raums. So ist nach der Besamung die Zona resistenter gegenüber Proteolyse (Maus: Smithberg 1953, Mintz 1965b; vgl. Seeigel: Runnström 1948) und starrer (Maus: Mintz 1965b, Kirby 1965b; vgl. Fische: Winnicki 1967, Winnicki und Bartel 1967). Nach Zotin (1961) wird bei Fischen ein Enzym in den perivitellinen Spalt abgegeben, das die Hüllen härtet. Diese Beobachtungen lassen sich gut vereinen mit der Vorstellung, daß geladene Gruppen, z. B. saure Gruppen von MS, dabei eine Rolle spielen. So ist auch ein Effekt von Ca^{++} deutlich. Es vermag die Zona-Reaktion der Ratte rückgängig zu machen (Piko 1967). sMS spielen sicher eine Rolle bei der Bindung der Spermien an das Ei (Runnström 1952; Aketa 1967; zu einem „Fertilisin" der Säuger vgl. Bishop und Tyler 1956). Auch mögen sie eine weitergehende Bedeutung für die Physiologie der Spermien haben (reichlicher Gehalt des Nebenhodens an Sialinsäuren s. Peyre und Laporte 1966a und b). Nach Abspaltung der NA der Zona ist eine Penetration der Spermien nicht mehr möglich (Soupart und Clewe 1956 s. Rüsse 1967).

Damit stellt sich die Frage nach den biochemischen Leistungen der Spermien bei der Penetration. Das Akrosom enthält eine Reihe von Enzymen, die für diesen Vorgang eine Bedeutung haben mögen (Dickmann 1965; Austin 1960). Der Hyaluronidase ist lange Zeit Aufmerksamkeit gewidmet worden. Sicher vermag sie die Interzellularsubstanz des Cumulus zu hydrolysieren, doch besteht eine strenge zeitliche Korrelation zwischen Besamung und Zertreuung des Cumulus nicht (Austin 1948). (Die Zona ist stabil gegenüber Hyaluronidase, s. u.) Ähnlichen Verhältnissen begegnen wir beim Seeigel (vgl. Takashima u. a. 1955), bei dem die Gallerthülle Hyaluronidase-labil ist. Nach diesen Autoren wird die Erfolgsquote der in-vitro-Besamung bei Zugabe von Hyaluronidase erhöht. Noch eine Anzahl weiterer Hydrolasen enthält das Akrosom: Proteolytische Enzyme (Kaninchen: Srivastava u. a. 1965; Triturus: Buongiorno-Nardelli und Bertolini 1967), β-Glukuronidase (Triturus: Buongiorno-Nardelli und Bertolini 1967). Sollten proteolytische Enzyme eine Funktion bei der Penetration haben, so darf man wohl der Tatsache

Bedeutung beimessen, daß saure Gruppen den sMS Resistenz einer Proteolyse gegenüber verleihen (vgl. die Erörterungen zur Auflösung der Keimhüllen S. 294). Die Zona-Reaktion könnte mit Veränderungen dieser sauren Gruppen einhergehen.

Ein klares Bild von den Vorgängen, die der Penetration der Spermien durch die Zona und der Zona-Reaktion zugrunde liegen, läßt sich aber heute noch nicht entwerfen. Um so mehr muß daher auch die Erörterung einer evtl. Bedeutung der sMS des perivitellinen Raums spekulativ bleiben. Diese Substanz erweist sich in den histochemischen Tests als stark schwefelsäureesterhaltig, enthält aber auch NA; sie reagiert in der PAS nur schwach (Glykogen, wie Voss 1963 beim Frosch, konnte ich nicht entdecken). Damit kommt sie in ihren Eigenschaften Keratosulfaten nahe. Keratosulfate sind sehr resistent gegenüber Proteolyse (Meyer u. a. 1967). Sie ist andererseits aber Hyaluronidase-labil (zumindest eine Komponente von ihr), was nicht zur Charakterisierung als Keratosulfat paßt. Damit unterscheidet sie sich von der Zona und gleicht der Interzellularsubstanz des Cumulus. Nach Takashima u. a. (1955) läßt sich die Substanz der hyalinen Schicht des besamten Seeigeleies auch durch Hyaluronidase (von Seeigeln) spalten (wie die Gallerthülle).

Auffällig ist der Befund, daß die besprochene Substanz im perivitellinen Spalt auch bei unbesamten Eiern zu finden ist, sofern diese osmotischen Schocks (Fixierung in Formol-Ca-Acetat 2%) oder Temperaturschocks ausgesetzt worden sind (Teil I, S. 168). Eine spezielle schnellwirkende und schonende Fixierung ist notwendig, um den perivitellinen Spalt unbesamter Eier frei zu erhalten. Dies läßt an eine Beziehung zwischen Entwicklungsanregung, die durch ähnliche Schocks möglich ist, und dem Auftreten der Substanz im perivitellinen Raum denken. In atretischen Follikeln des Kaninchen-Ovars fand ich im Gegensatz zu normalen Follikeln oft eine solche Substanz. Andererseits sieht man häufig Eier, die ähnlich wie Furchungsstadien fragmentiert sind (vgl. Burkl 1962; Vazquez-Nin und Sotelo 1967). Andererseits weisen viele Befunde darauf hin, daß eine strenge Beziehung zwischen der Entwicklungsanregung auf der einen Seite und dem Auftreten der sMS im perivitellinen Raum (mit Verschwinden der Cortexgranula bzw. dem Auftreten des Polyspermieblocks) durchaus nicht besteht (vgl. Runnström 1948, 1952; Austin und Braden 1954; Bataillon 1906; Chang 1955b; Iwamatsu 1967). Es würde sich lohnen, die Beziehungen zwischen diesen beiden Prozessen weiter zu verfolgen; die Beobachtbarkeit der Ausstoßung der sMS des perivitellinen Raums beim Kaninchen kann dabei vielleicht Hilfe leisten.

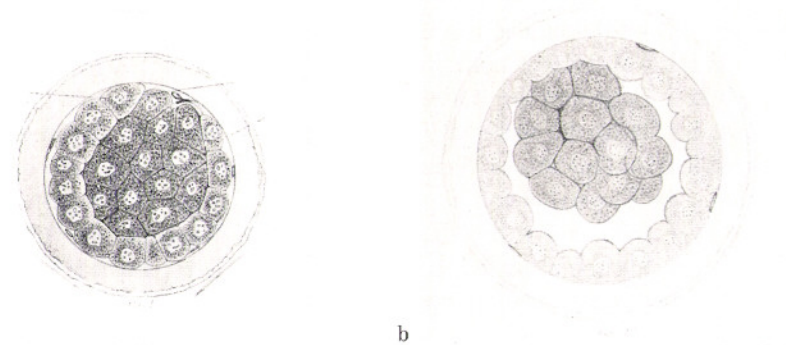
4.3. Die Differenzierung der Blastomeren in der Furchung und Blastozystenbildung

Bei der Furchung wird nach den entwicklungsphysiologischen Experimenten von Seidel (1952a, 1954, 1960a) die Eizelle des Kaninchens in Blastomeren zerlegt, deren Bildungspotenzen unterschiedlich sind. Gestaltliche Unterschiede zwischen den

Blastomeren lassen sich am lebenden Keim und an nach Routinemethoden hergestellten Schnitten nicht erkennen (vgl. Teil I, Abb. 4, 5). Mit speziellen Methoden kann man solche Unterschiede aber demonstrieren (S. 248ff.; Abb. 1). Darüber hinaus sind die Zellen offenbar verschieden stark beladen mit Protein (S. 261), RNS (S. 265) und in älteren Furchungsstadien auch Glykogen (S. 262). Diese Unterschiede sollen hier hinsichtlich ihrer Aussagekraft und Bedeutung diskutiert werden.

Die auf den Seiten 250—261 dargelegten Befunde, die ich an FAE-fixierten und mit HgBPB gefärbten Schnitten erhoben habe, möchte ich zunächst als rein morphologische Analyse verstehen. Sie sollen die von van Beneden (1875, 1880), Assheton (1895a) und Gregory (1930) angestellten Beobachtungen ergänzen.

Van Beneden (1875, 1880) war zu dem Schluß gekommen, daß im Tubenei die Blastomeren nicht gleichgestaltet und auch nicht gleichwertig seien. Der etwa 3 Tage alte Keim, sofern noch in der Tube, besitzt nach ihm 2 Populationen von Zellen (s. Abb. 22): Eine einfache Lage mehr gestreckter Zellen bedeckt einen Haufen zentraler Blastomeren. Die Bedeckung ist nicht vollständig. Es verbleibt eine Lücke, durch die die innere Masse mit dem perivitellinen Raum in Verbindung steht. Die hier liegenden Zellen sind im Gegensatz zu der einhüllenden Zellpopulation mit ihrer Längsachse radiär ausgerichtet (vgl. Abb. 22a). Alle inneren Zellen nehmen bei Osmium-Fixierung eine braune Färbung an, die sie von den äußeren unterscheidet. Das Zytoplasma der äußeren Blastomeren zeigt eine klare, kaum granulierte Zone an der Grenze zu den inneren Zellen; diese Zone macht die Grenze besonders deutlich. Die Zellgrenzen der äußeren Zellen lassen sich durch Versilberung gut darstellen, die der inneren nicht, auch dort nicht, wo sie an die Oberfläche des Keimes reichen. Unmittelbar nach Übertritt des Keimes in den Uterus schließt sich, van Beneden zufolge, die Lücke in der Kappe der äußeren Zellen. Gleichzeitig tritt ein Spalt auf zwischen äußeren und inneren Zellen. Mit seiner Vergrößerung erfolgt die Umwandlung des Keims in eine Blastozyste.



a b

Abb. 22. Reproduktionen aus: van Beneden 1880.

Van Beneden hat grundsätzlich Totalpräparate der Furchungsstadien untersucht. Er beobachtete im unfixierten Zustand und nach Fixierung mit Osmiumsäure und anschließend Müllerscher Flüssigkeit, einer wäßrigen Kaliumbichromat-Natriumsulfat-Lösung. Einige Keime behandelte er anstatt dessen mit Silbernitrat. Färbungen (Carmin, Pikrocarmin) spielten eine untergeordnete Rolle.

Die Tatsache, daß van Beneden Schnitte nicht untersucht hat, forderte natürlich die Kritik heraus. Assheton (1895a) untersuchte die Frühstadien der Kaninchenentwicklung erneut. Er beobachtete sowohl Totalpräparate als auch Paraffinschnitte. Auf diesen Schnitten konnte er in der Regel Blastomerendifferenzen nicht zeigen und verwarf daher das van Benedensche Konzept, indem er darauf hinwies, daß bei der Betrachtung von Totalpräparaten, wie sie van Beneden durchgeführt hatte, die zentralen Zellen eines solchen kugeligen Gebildes im durchfallenden Licht dunkler erscheinen müssen. Hier erfolgt in der größeren Schichtdicke natürlich eine stärkere Absorption. Dieser Einwand ist sicher richtig. Allerdings gilt er nicht für die Betrachtung optischer Schnitte der Lücke der äußeren Blastomeren, die van Beneden besonders eingehend beobachtet und beschrieben hat. Hier werden der Lage nach einander entsprechende Zellen verglichen. Andererseits hat Assheton leider offenbar nicht genau die Fixierung van Benedens angewandt. Er gibt Perenyi, Osmiumsäure, Pikrinsäure, Flemming, Hermann, Chromsäure und Silbernitrat an, nicht jedoch Müller, auch sagt er nicht, ob er die van Benedensche Sequenz Osmiumsäure-Bichromat-Gemisch geprüft hat. Die meisten der von ihm abgebildeten Schnitte entstammen Keimen, die mit Perenyi fixiert worden waren, einem schwach alkoholischen (30%) Salpetersäure-Chromsäure-Gemisch. Der Rest war mit Silbernitrat behandelt. Gefärbt wurde mit Pikrocarmin und Boraxcarmin. Nur in einem Keim der untersuchten Furchungsstadien sah er (3 d p. c.) eine deutliche Blastomerendifferenz; die inneren Zellen waren schwächer gefärbt (Fig. 18 und 19 von Assheton, s. Abb. 23 a). Auf beiden Schnitten reichten helle Zellen an die Oberfläche, aber an entgegengesetzten Seiten. Bei einem älteren abgebildeten Stadium (77 h p. c., Fig. 21 von Assheton), bei dem schon eine Andeutung der Blastozystenhöhle zu erkennen war, fand er helle und dunkle Zellen ohne Regel durcheinander gemischt. Auf einem Schnitt eines mit Silbernitrat behandelten Keims zeigt er eine Zelle, die nach ihrer etwas versenkten Lage und der radiären Ausrichtung ihrer Längsachse den bei van Beneden in der Lücke der äußeren Blastomerenkappe liegenden Zellen entsprechen könnte (s. Abb. 23b, Fig. 20 von Assheton). Die große Varianz seiner Befunde zur Zellgestalt und die Unmöglichkeit, reproduzierbar färberische Differenzen der Blastomeren zu zeigen, führten ihn zur Anlehnung der van Benedenschen Ausführungen. Seine Bilder der Blastozystenstadien sind allerdings klarer. Im frühesten Stadium fand er an der Oberfläche des Embryonalknotens völlig unregelmäßig gestaltete Zellen, die zum Teil radiär gestellt waren und sich wie die Masse der Embryonalknotenzellen stärker als die Trophoblastzellen anfärbten (Perenyi, Boraxcarmin)

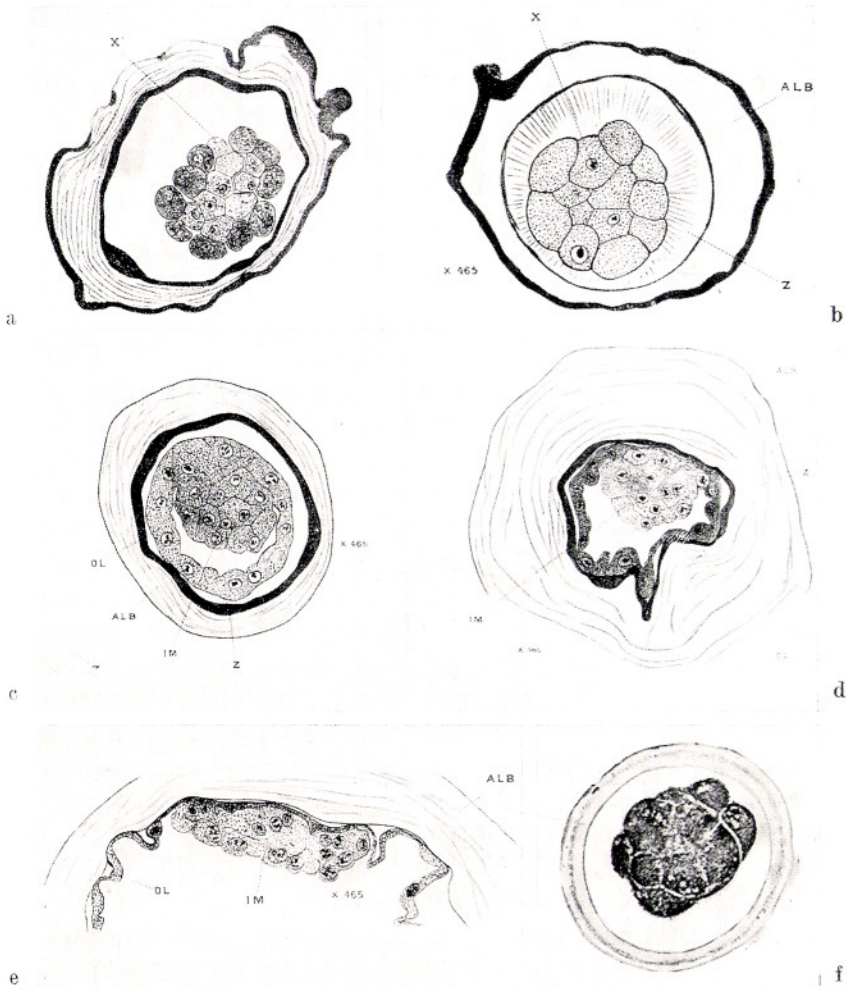


Abb. 23. a–e) Reproduktionen aus: Assheton 1895a; f) Reproduktion aus: Gregory 1930.

(Fig. 22 Asshetons, s. Abb. 23c). Im weiter entwickelten Stadium mit schon größerer Blastozystenhöhle war dagegen der Embryonalknoten von einer dünnen Rauberschen Deckschicht bedeckt, die sich wie der Trophoblast färbte (Perenyi, Pikrocarmin) (Fig. 24 von Assheton, s. Abb. 23d). Diese Befunde sollen weiter unten noch genauer diskusiert werden.

Gregory (1930) untersuchte wiederum sowohl Totalpräparate als auch Paraffinschnitte. Er fixierte vor allem mit Bouin-Allen, weniger mit Gilson (Sublimat-Alkohol-Salpetersäure-Eisessig), Perenyi, Zenker und Pikrin-Schwefelsäure. Die Färbung erfolgte meist mit Delafields und Ehrlichs Hämatoxylin. Färberische

Differenzen zwischen den Blastomeren sah er erst am Ende der Tubenwanderung des Eies; die Trophoblastzellen erschienen etwas heller. Eine morphologische Differenz beschreibt er aber ab 47 d p. c. (17 Zellen): An der Eiperipherie liegen abgeplattete Zellen, und diese benennt er als präsumptive Trophoblastzellen (vgl. Abb. 23f, Fig. 25). Über die Herkunft dieser verschiedenen Zellpopulationen vermag er nichts auszusagen. Vor allem kann er nicht entscheiden, ob sie von einer bestimmten der zwei ersten Blastomeren abstammen, obwohl ja Unterschiede der Zellgröße in den ersten Furchungsstadien regelmäßig zu beobachten sind, was auch schon Assheton beschrieb.

In Gegenüberstellung der Beobachtungen dieser drei Autoren mit meinen Ergebnissen möchte ich zunächst sagen, daß ich, als ich meine Präparate zur Blastomeren-Differenz anfertigte, die Arbeiten von van Beneden nicht kannte und gerade die von Assheton las. Um so eindrucksvoller wurde für mich die in vielen Punkten sehr gute Übereinstimmung meiner Bilder mit der Schilderung van Benedens von 3 d-Keimen (vgl. Abb. 1d mit Abb. 22a). Die Deutung, die van Beneden seinen Befunden hinsichtlich der prospektiven Bedeutung der beschriebenen Zellen und von Homologien gab, ist zwar in den meisten Punkten überholt und soll hier nicht diskutiert werden. Bemerkenswert ist aber die Gleichheit der Einzelbeobachtungen: Die äußeren Zellen sind in der Tangentialen gestreckt. Sie zeigen ein an der Grenze zu den inneren Zellen besonders beschaffenes Zytoplasma. In meinen Schnitten ist es dort stärker gefärbt. Diese Übereinstimmung darf vielleicht als Argument dafür gelten, daß hier nicht ein durch das alkoholische Fixierungsmittel FAE verursachtes Artefakt vorliegt, denn van Beneden fixierte in wäßrigen Flüssigkeiten. Die inneren Zellen stehen bei van Benedens und meinen Bildern an einer Stelle mit dem perivitellinen Spalt in Verbindung und sind hier mehr radiär gestellt. Sie zeigen ein anderes färberisches Verhalten als die äußeren Zellen. Die stoffliche Grundlage der färberischen Differenzen soll weiter unten diskutiert werden. Auf der morphologischen Seite kommt nach meinen Beobachtungen hinzu ein Unterschied in der Stellung der Kerne, die sich wie die Zellen ausrichten. Die gestreckte Gestalt der äußeren Zellen wurde auch von Gregory beobachtet. Damit scheint mir eine Differenz zwischen den Blastomeren in Furchungsstadien grundsätzlich gesichert zu sein, vor allem, da ich die von mir gezeigten färberischen Differenzen regelmäßig mit den gestaltlichen Differenzen korreliert sah.

Die Blastozystenhöhle entsteht an der Grenze zwischen den äußeren, in meiner Färbung dunklen, Zellen und den inneren, nach HgBPB hellen.

Die dunklen Zellen sind die präsumptiven Trophoblastzellen, die hellen die präsumptiven Embryonalknotenzellen.

Die Größe der von den äußeren Zellen nicht bedeckten Fläche ist nach meinen Befunden sehr variabel. Eine vollkommene Bedeckung habe ich bei Tubenkeimen nie gesehen. Nach van Beneden wird die Bedeckung vollständig, sobald der Keim

im Uterus angekommen ist. Zu diesem Punkt kann ich auf Grund der eigenen Befunde nur wenig Exaktes beisteuern: Einen genauen Zeitpunkt vermag ich nach meinen Bildern nicht anzugeben, da zwar bei Tubenkeimen 3 d p. c. diese Lücke noch vorhanden und bei der 4d-Blastozyste durch die Raubersche Deckschicht geschlossen war (vgl. auch Teil I, Abb. 7), 3 d 8 h p. c. aber Lücken in dieser Bedeckung nicht sicher auszuschließen waren (vgl. Abb. 1e). Die Bilder von Assheton (s. Abb. 23) scheinen mir zusammen mit den meinen (s. Abb. 13, 1e) dafür zu sprechen, daß die Bedeckung noch einige Stunden nach Eintritt des Keims in den Uterus und nach Beginn der Bildung der Blastozystenhöhle erfolgen kann. Diese Vorstellung paßt auch besser zu der Varianz in der Größe der unbedeckten Fläche 3d p. c., die meine Bilder zeigen (Unterschiede von Keim zu Keim im Zeitpunkt der vollständigen Bedeckung beobachtete ebenfalls Mulnard bei der Maus 1967).

Die Frage nach der Herkunft der zwei Kategorien von Blastomeren in den frühesten Furchungsstadien ist trotz dieser Befunde schwer zu beantworten. Das früheste Stadium, in dem ich eine Blastomerendifferenz bei Anwendung beider Kriterien, dem der Färbungsintensität und dem der Gestalt und Lage, einwandfrei erkennen konnte, ist das 8-Zellen-Stadium 35 d p. c. (s. Abb 5). Es liegt sehr viel früher, als von Gregory angegeben. Abb. 5 darf man wohl so deuten, daß hier eine helle Zelle, eine präsumptive Embryonalknotenzelle, im Begriff ist, von dunklen präsumptiven Trophoblastzellen (unvollständig) umgeben zu werden.

Die Abplattung der äußeren Zellen, die hier erstmalig sichtbar ist und die sich auch erhält, scheint mir dafür zu sprechen, daß diese sich auf der Oberfläche der hellen ausbreiten.

Die Tendenz zu einem solchen Verhalten besteht offenbar schon sehr früh. Wie Cole u. a. (1965) beobachteten, scheiden sich die Blastomeren schon früher Furchungsstadien in der Gewebekultur in zwei Populationen: Zellen, die sich abplatten („Trophoblasttyp"), und solche, die sich abrunden. Auffällig ist, daß das jüngste Stadium, von dem diese Autoren Zellinien vom Trophoblasttyp erhielten (4—8 Zellen), das gleiche ist, in dem sich die Blastomerendifferenzen im Schnitt gut herausheben. Schon 5zellige Keime ergeben auffällige färberische Blastomerendifferenzen. Vom 8—Zellen-Stadium an werden diese Differenzen sehr viel klarer, und es wird die anfangs abgestufte Unterschiedlichkeit zu einer alternierenden.

Eine vollständige Umwachsung der hellen Zellen fand ich bei Tubeneiern niemals. Hingegen können gelegentlich die hellen Zellen auch an 2 getrennten Orten mit dem perivitellinen Spalt in Verbindung stehen (vgl. S. 256, 259). Von Mulnard wird nach seinen Filmaufnahmen der Prozeß der Umwachsung bei der Maus als ein sehr dynamisches Geschehen geschildert (1967), bei dem die Zellen schnell ihre Gestalt ändern. Dabei ist durchaus denkbar, daß zeitweilig auch Lücken in der Kappe der einhüllenden Blastomeren auftreten. Andererseits vermag man durch ein bestimmtes färberisches Verhalten (wie in der HgBPB-Färbung) eine Zelle lediglich nach ihrer

prospektiven Bedeutung als zur Kategorie der präsumptiven Embryonalknotenzellen oder Trophoblastzellen gehörig zu charakterisieren. Die morphologisch in Erscheinung tretende Differenziertheit vermag dagegen über den Determinationszustand nichts auszusagen. Es mag auch Umdifferenzierungen geben. Der Keim ist zu mannigfachen Regulationen fähig (vgl. Seidel 1954, Mulnard 1966). Daher hindern nicht nur technische Schwierigkeiten (beim Keim der Abb. 5 z. B. waren nicht alle Schnitte auswertbar) daran, exakte Angaben etwa über die Zahl der präsumptiven Embryonalknotenzellen in einem bestimmten Stadium zu machen. Gerade in den frühen Furchungsstadien findet man immer wieder Zellen, die sich nicht exakt einordnen lassen, wie beim Keim der Abb. 7, bei dem sich zumindest drei Kategorien von Zellen, nach der Färbbarkeit beurteilt, finden lassen. Dies gilt in noch stärkerem Maße für noch jüngere Stadien, bei denen oft geradezu ein Gefälle zu bestehen scheint (vgl. S. 255).

Auffällig bleibt, daß bei 45 h-Keimen immer wieder die völlig von anderen Blastomeren umgebene Zelle (oder Zellen) als am hellsten erscheint, sich also oft auch noch von den übrigen „hellen" Zellen unterscheidet. Vom nächsten untersuchten Stadium an (54 h p. c.) konnte ich derartiges nicht mehr beobachten. Ein solches Verhalten würde als ein Hinweis darauf gedeutet werden können, daß eine Blastomere oder mehrere ihre Determination zu Stammzellen des Embryonalknotens durch ihre besonderen Lagebeziehungen erhalten: Sie werden von anderen Zellen völlig umgeben und geraten damit in ein anderes Milieu (Tarkowski und Wroblewska 1967, vgl. Silagi 1963, Beatrice Mintz 1964a, 1965; Monesi und Salfi 1967).

Da ich aber morphologische Unterschiede der Blastomeren normaler Keime, vor allem die klare Andersartigkeit einiger Zellen, schon in frühen Stadien, bevor sie von anderen Zellen umgeben sind, feststellen konnte, wird beim Kaninchen zweifellos eine gewisse Bestimmung des Schicksals der Blastomeren schon früh getroffen. Sie mag dadurch geschehen, daß bei der Furchung bestimmten Blastomeren ein bestimmter „plasmatischer Faktorenbereich" zufällt (Seidel 1954 und 1960). Sicher ist dabei aber eine Reihe von Möglichkeiten für Regulationen gegeben, noch im Blastozystenstadium (Seidel 1954, Daniel 1963). Wie determinativ das Geschehen in den einzelnen Phasen ist und wieviel Raum jeweils für Regulationen bleibt, ist nur durch weitere gezielte entwicklungsphysiologische Experimente erkennbar (zum gegenwärtigen Stand der Diskussion hierzu vgl. Mulnard 1966, Seidel 1969).

Morphologische Befunde von anderen Säugern (abgesehen von Nagern, s. u.) liegen zur Frage der Differenzierung der Blastomeren nur in geringer Zahl vor (Schaf: Assheton 1898; Fledermaus: van Beneden 1899, 1911; Tarsius: Hubrecht 1902; Katze: Hill und Tribe 1924; Schwein: Heuser und Streeter 1929; Ziege: Amoroso u. a. 1942). Sie betreffen vor allem Unterschiede in der Zellgröße. Amoroso u. a. und Heuser und Streeter äußern sehr dezidierte Anschauungen über eine frühe Sonderung von großen Zellen, die die prospektiven Keimscheibenzellen sein sollen. Die prospektiven Trophoblastzellen erscheinen bei ihnen anfangs als geschlossene Zellgruppe und nicht als periphere Bedeckung. Es fehlt aber an anderen Kriterien zur Zellunterscheidung als dem der Dimension. Witschi und Graves (1946) beobachteten am Goldhamster, daß deutoplasmatische Substanzen (Säurefuchsinfärbung) der Furchungsstadien in der jungen Blastozyste auf die innere Zellmasse beschränkt seien. Sie machen jedoch keine Angabe über eine Ableitbarkeit aus bestimmten Blastomeren. Sehr viel mehr Daten existieren dank der Arbeiten der Dalcqschen Schule über die Verhältnisse bei Ratte und Maus. Hier sind zahlreiche morphologische und histochemische (s. u.) Untersuchungen angestellt worden. Neue Filmaufzeichnungen der Furchung durch Mulnard (1967) zeigen ein Umwachsen der präsumptiven Embryonalknotenzellen durch die präsumptiven Trophoblastzellen. Letztere ändern dabei ihre Gestalt schnell, nehmen aber immer wieder gestreckte Formen an. Die Umwachsung wird vollständig um den Zeitpunkt der Blastozystenbildung. Dabei bestehen von Keim zu Keim große Unterschiede.

Die histochemische Interpretation der Ergebnisse fällt schwerer als die morphologische. Der Ausfall der HgBPB-Färbung ist wohl Ausdruck von Unterschieden in der allgemeinen Protein-Konzentration zwischen präsumptiven Embryonalknotenzellen und Trophoblastzellen, vielleicht in der Dichte basischer Proteine (S. 261). Zwar bleiben Vorbehalte bestehen, weil Formol-Fixierung vergleichbare Ergebnisse nicht liefert (S. 261). Aber andererseits geben die elektronenoptischen Befunde von Christina Krauskopf (1967) Hinweise darauf, daß in einer äquatorialen Zone der Eier, die sich auf eine der ersten Furchungszellen oder beide überträgt, Eiweiß enthaltende große Vesikel des ER vollständig fehlen. Dieser Befund kann eventuell dem der geringen Anfärbung der präsumptiven Embryonalknotenzellen parallel gestellt werden.

Unterschiede im Gehalt an sMS zwischen den Blastomeren konnte ich nicht sicher erkennen. Man darf allerdings erwarten, daß Unterschiede in den Eigenschaften der Zelloberflächen eine Rolle beim unterschiedlichen Verhalten der Blastomeren spielen (Oberflächenspannung; Art und Dichte der geladenen Gruppen), wobei den sMS dieser Orte und gerade der ubiquitären NA eine besondere Bedeutung zukommen mag. Auf diese Möglichkeit weist eine Fülle von zellphysiologischen und feinstrukturellen Untersuchungen (Garber 1963, 1967; Carter 1965; Nordling u. a. 1965; Okada und Murayama 1966; Rubin 1966; Runnström und Immers 1966; Sheridan 1966; Trelstad u. a. 1966a und b, 1967; Gesner 1966; Bereiter-Hahn 1967; Eagle und Levine 1967; Hill 1967; Kordan 1967; Kraemer 1967; Majki u. a. 1967; Molnar 1967; Rambourg und Leblond 1967; Sanford 1967; Thiele 1967; Watters 1967; Weiss 1967; Wolpert und Gustafson 1967; Wolpert und Gingell 1968; Yanagida und Noda 1967; Yanagisawa u. a. 1967; Ambrose und Forrester 1968). Auch der sMS des perivitellinen Spalts (s. S. 272), die bis zum Abschluß der Furchung nachweisbar bleibt, könnte eine Bedeutung zukommen. Das geringe Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops macht es mir aber unmöglich, detaillierte Aussagen über die Verhältnisse an den Zelloberflächen zu machen. Ein Ansatz für eine Beantwortung der Frage, wie eine Differenzierung von Zellen hinsichtlich der Eigenschaften ihrer Oberflächen zustande kommen kann, fehlt bis heute.

Hingegen scheinen die präsumptiven Embryonalanlagezellen zumindest 45 h p. c. reicher an RNS zu sein als die präsumptiven Trophoblastzellen (S. 265). Auch hierfür liefern die elektronenoptischen Befunde an Zweizellenstadien eine Bestätigung. In der eben genannten äquatorialen Zone der Furchungsstadien ist die Anzahl der Ribosomen bzw. Polysomen gegenüber den übrigen Keimpartien etwa um 50% erhöht (Krauskopf 1967, Hillebrandt 1969).

Neutrale Mukosubstanzen sind offenbar ähnlich verteilt wie die Proteine (S. 263). Glykogen ist in den späten Furchungsstadien im präsumptiven Keimmaterial besonders reich vorhanden (S. 262).

Es ergibt sich die Frage nach der Beziehung dieser Befunde zu den Beobachtungen von van Beneden, Assheton und Gregory. Von allen drei Autoren wurden verschiedene Fixierungen verwendet. Die erhaltenen Befunde sind in mancherlei Hinsicht widerspruchsvoll. Auch ich habe mit verschiedenen Fixierungen unterschiedliche Ergebnisse erzielt: Eine klare Blastomerendifferenz war nur nach FAE zu beobachten. FAE aber ist von den drei oben genannten Autoren nicht verwendet worden. Eine Reihe ihrer Abbildungen zeigt zwar Unterschiede in der Zellgestalt (tangentiale Ausrichtung der präsumptiven Trophoblastzellen, s. Abb. 23f), jedoch nicht immer, vor allem fehlt die Koinzidenz von morphologischen und färberischen Kriterien, die FAE liefert. Manche Fixierungsgemische führen zu einer Abrundung der Zellen, z. B. Bouin. Bei Assheton zeigt diejenige seiner Fixierungen, die die Zellgestalt am besten erhält, nämlich Silbernitrat (s. Abb. 23b), färberische Blastomerendifferenzen nicht. Andererseits sind nach der Fixierung, die solche färberischen Differenzen gut demonstriert, alle Zellen abgerundet (s. Abb. 23) und zudem voneinander gelöst. Für das zweifelsfreie Erkennen von Blastomerendifferenzen ist eine Fixierung notwendig, die sowohl Zellgestalt und topografische Beziehungen als auch Unterschiede im Stoffgehalt bzw. der Struktur des Zytoplasmas zu Gesicht zu bringen vermag. Van Benedens Osmiumsäure-Müller-Sequenz hat diese Forderungen offenbar erfüllt, nicht jedoch taten dies die Prozeduren von Assheton und Gregory.

Für eine Beantwortung der Frage, inwieweit die von den verschiedenen Autoren verwendeten Fixierungsmittel verschiedene Stoffe dargestellt haben mögen, ist unser Wissen leider noch etwas beschränkt. Nur einige Denkmöglichkeiten kann ich diskutieren. Van Beneden verwendete Osmiumsäure und eine wäßrige Bichromatlösung (Müller). Beides sind Fixantien für Lipide (Adams u. a. 1967, Pearse 1968). Auch die Beobachtung van Benedens, daß die inneren Zellen nach Osmiumsäurebehandlung eine braune Färbung annehmen, mag mit einem besonderen Lipidreichtum zusammenhängen (vgl. Pearse 1968). Perenyi, das von Assheton am ehesten erfolgreich gefundene Gemisch, enthält auch Chromsäure. Zudem ist es alkoholhaltig. Alkohol vermag wohl einige Lipide zu extrahieren, während andere erhalten bleiben. Solche Überlegungen, daß eine Extraktion bestimmter Stoffe bei der Fixierung eine Rolle für das Zustandekommen der Bilder spielen könnte, habe ich oben bereits hinsichtlich Glykogen und Protein angeführt (s. S. 262f.). Sie müssen durch weitere histochemische Tests überprüft werden.

Von Dalcq und Mitarb. ist seit vielen Jahren eine Reihe von histochemischen Untersuchungen durchgeführt worden, und zwar vorwiegend an Ratte und Maus. Sie werden mit morphologischen Beobachtungen und Ausschaltungs-Experimenten (Mulnard 1965) korreliert. Auf diese Ergebnisse soll hier nur kurz verwiesen werden (vgl. dazu Dalcq 1951, 1954, 1955, 1956, 1959, 1962, 1965; Izquierdo 1954, 1955; Mulnard 1955, 1965; Mulnard und Dalcq 1955). Bei der Ratte existiert danach in der Oocyte eine peripher im Zytoplasma gelegene Basophile Zone; hier ist RNS besonders konzentriert. Während der Furchung fällt diese Zone nur einigen Blastomeren zu. Diese sind meist kleiner und werden von den übrigen, größeren Blastomeren umwachsen. Von diesem Moment an beginnt eine starke RNS-Synthese in den inneren Zellen (vgl. Silagi 1963, Monesi und Salfi 1967), so daß ihr im Vergleich zu den äußeren Blastomeren größerer RNS-Reichtum noch stärker ins Auge fällt. Diejenigen Zellen also, die das Material der Basophilen Zone erhalten, sind besonders RNS-reich, werden zu den inneren Zellen und bilden den Embryonalknoten. Saure Phosphatase verhält sich ganz ähnlich wie die RNS und gibt eine noch deutlichere Markierung. Alkalische Phosphatase tritt in den inneren Zellen auf, sobald sie umwachsen sind. Saure Mukosubstanzen verteilen sich im ungefurchten Ei meist regellos im Zytoplasma. Bei der Reifung sind sie zu einer kortikalen Zone aggregiert. Später finden sie sich diffus in den kleinen Blastomeren, während sie in den einhüllenden Zellen in Form relativ grober Granula sich peripher und bis zum Kern hin anordnen. Sie verschwinden dann aus diesen (Mulnard und Dalcq 1955). Glykogen lagert in den einhüllenden Zellen etwas reichlicher. Es konzentriert sich nach der Umhüllung auf den zum Zentrum des Keimes hin gelegenen Zytoplasmateil. In den inneren Zellen liegt es gleichmäßig verteilt (Mulnard und Dalcq 1955). Plasmalogene Substanzen sind ähnlich wie die sMS lokalisiert.

Die Maus zeigt grundsätzlich ähnliches, doch in den frühesten Stadien weniger klar (vgl. Mulnard 1965). Ein Vergleich dieser Befunde mit denen, die ich hier vorlege, ist von den methodischen Voraussetzungen her wohl einigermaßen möglich. Zwar habe ich nicht totale Keime untersucht, wie in der Dalcqschen Schule üblich, sondern Schnitte. Ich habe aber die FAE-Fixierung von dort übernommen. In der Art der Fixierungsmedien, die Dalcq günstig für die Darstellung von Blastomerendifferenzen fand, bestehen Beziehungen zu denen, die auch in den älteren Kaninchenarbeiten erfolgreich waren: Osmiumsäure (vgl. auch Tondeur 1961), Bichromat (Zenker), alkoholische Gemische (FAE, Carnoy) (für die Erhaltung der in-vivo-Metachromasie auch ein Sublimatgemisch, s. Izquierdo 1954). In meinen Befunden von der Hale-Reaktion mag, auch hinsichtlich der intrazellulären Verteilung (vgl. Abb. 19a), eine echte Übereinstimmung mit den Dalcqschen Angaben über die RNS-

Verteilung bei der Ratte liegen. Bezüglich des Glykogens besteht ein gewisser Widerspruch, da ich in späten Furchungsstadien die inneren Zellen reicher daran fand (ebenso Thomson und Brinster 1966 bei der Maus). Hier mögen Unterschiede der Fixierung eine Rolle spielen (Mulnard und Dalcq 1955 verwendeten Bouin-TCE). Die erhaltene intrazelluläre Verteilung war ähnlich. Die Befunde der Dalcqschen Schule kann ich für die sMS beim Kaninchen nicht bestätigen, auch hier mag die Wahl des Fixierungsmittels von Bedeutung sein. Über den Proteingehalt liegen von Ratte und Maus Beobachtungen nicht vor.

Zu den Befunden der Dalcqschen Schule ist aber einiges Kritische zu sagen. Wesentliche Schnitte der Präparation, meist sogar die ganze Untersuchung, erfolgten an ganzen Keimen. Hierzu ist schon auf den S. 269—271 Stellung bezogen worden. Andererseits sind die histochemischen Methoden und Kriterien, die von der Dalcqschen Schule angewendet werden, heute in vielen Punkten nicht mehr ausreichend, wenn sie auch seinerzeit sicher in vielem wegweisend waren. So wurde auf das Vorkommen von sMS geschlossen nur auf Grund der gleichen Lokalisation von Toluidinblau-Metachromasie und PAS.

Vordringlich scheint mir aber, grundsätzlich von der Bearbeitung ganzer Keime abzugehen und Schnitte zu verwenden. Die hierin liegende Kritik trifft auch meine Arbeit. Der offenbar wesentliche Schritt, die Fixierung, erfolgte am ganzen Keim. Kryostatschnitte von Furchungsstadien liefern, wie ich immer wieder erfahren mußte, morphologisch völlig unzureichende Ergebnisse. Es ist zu hoffen, daß sich die Gefriertrocknung als geeignet erweist. Untersuchungen mit dieser Prozedur habe ich in Angriff genommen.

Alle geschilderten histochemischen Untersuchungen vermögen, wenn sie Blastomerendifferenzen zu Gesicht bringen, wohl eine Differenzierung aufzuweisen, nicht aber Prozesse, welche zur Differenzierung führen. Sollten Stoffe existieren, die als Informationsträger fungieren und für die Einleitung der Differenzierung eine Rolle spielen, so möchte man erwarten, daß ihre Konzentration noch erheblich unter der der hier dargestellten Substanzen liegt. Die Substanzen, die die Substrathistochemie demonstriert, haben meist eine Baustoff- oder Reservestoffunktion. Regulatorstoffe werden sicher nur an Orten erfaßt, an denen sie gespeichert vorliegen. Die Enzymhistochemie vermag Orte und Zeitpunkte zu zeigen, an denen diese Stoffe synthetisiert oder umgebaut werden. Sie beleuchtet damit naturgemäß nur die Vorgeschichte der Substratverteilung. Die Faktoren, die das räumliche Muster der Enzymaktivität bedingen, kennen wir auch damit noch nicht. Sofern man solche überhaupt mit den Mitteln der Chemie erfassen kann, sind sie der histochemischen Analyse zur Zeit nicht zugänglich. Mit ihren heutigen Methoden und der heute erreichbaren Empfindlichkeit zeigt die Histochemie dem Entwicklungsphysiologen lediglich die Ergebnisse der Prozesse, nach denen er eigentlich fragt. Das bedeutet umgekehrt, daß die Ergebnisse histochemischer Betrachtungen dem Entwicklungsphysiologen weniger Antworten als neue Fragen bringen und den Blick richten auf das, was vor dem histochemisch Demonstrablen liegt. Wenn der Keim von 8 Zellen (Abb. 5) deutliche Unterschiede der Blastomeren in der HgBPB-Färbung zeigt, so bedeutet das, daß es etwas geben muß, das zeitlich vor diesem Stadium da ist und ebenfalls eine räumliche Ordnung hat. Dieser Bereich ist im Augenblick nur dem entwicklungsphysiologischen Experiment zugänglich.

4.4. Physiologische und histochemische Polarität der Keimscheibe

Die Sonderung von zwei Kategorien von Blastomeren während der Furchung bereitet die Bildung einer Blastozyste mit Embryonalknoten und Trophoblast vor. Bei der Expansion der Blastozyste wird der Embryonalknoten abgeflacht; es entsteht die Keimscheibe. Diese Keimscheibe ist zunächst radiärsymmetrisch. 5 d p. c. differenziert sie dagegen deutlich ein Vorder- und Hinterende heraus: Das Vorderende wird zellreich und zum Trophoblasten hin scharf begrenzt, das Hinterende bleibt ärmer an Zellen und unscharf begrenzt. Außerdem beginnt die Keimscheibe, sich in der Richtung der Vorn-Hinten-Achse zu strecken (Teil I, Abb. 9).

Wodurch die Gliederung hervorgerufen wird, ist völlig unklar. 4 d p. c. ist die Keimscheibe im Gegensatz zu 6 d p. c. noch zu umfangreichen Regulationen fähig, bringt aber im entwicklungsphysiologischen Experiment Hinweise auf eine funktionelle Polarität (Seidel 1952b, 1954).

Ich habe geprüft, ob sich in diesen frühen Stadien substrathistochemisch eine Polarität der Keimscheibe als Vorläufer der morphologischen Differenzierung zeigen läßt (S. 266—269). Die war nicht von Erfolg begleitet. Es finden sich lediglich in allen Stadien (4—6 d p. c.) im Trophoblasten der Umgebung der Keimscheibe regionale Unterschiede in der Zahl sMS-(Sialomuzin!)-reicher Zellen. 6 d p. c. liegen sie besonders am Vorderende. Möglicherweise könnte man hierin einen Hinweis dafür sehen, daß bei der Entstehung der Polarität der Keimscheibe Reaktionen zwischen Trophoblast und Keimscheibe eine Rolle spielen.

Die Frage, wodurch die Differenzierung von Vorder- und Hinterende der Keimscheibe ausgelöst wird, muß offen bleiben. Enzymhistochemische Tests sollten herangezogen werden, um ihr weiter nachzugehen.

4.5. Angaben zum Glykogenstoffwechsel in der frühen Entwicklung

Die geschilderten Entwicklungsschritte bis zur Implantation vollziehen sich im Milieu der Sekrete von Tube und Uterus. Es erhebt sich die Frage, inwieweit diesen Sekreten eine Bedeutung als Lieferanten von Energie- und Baustoffen oder Regulatorstoffen zukommt bzw. inwieweit der Keim autonom ist. Für den Entwicklungsphysiologen ist das aus pragmatischen Gründen auch die Frage nach der Zusammensetzung von Medien für die in-vitro-Kultur.

Dieser Problemkreis wird von einer Reihe von Untersuchern intensiv bearbeitet (vgl. für das Kaninchen: Fridhandler u. a. 1957a und b; Fridhandler 1961; Schwick 1963; Zimmermann u. a. 1963; Lutwak-Mann 1962, 1963, 1966; Daniel 1965, 1967; Ahlgren 1966; Beier 1967; Daniel und Krishnan 1967; Brinster 1967c; Kirchner 1969; Maus: Whittingham 1966; Biggers u. a. 1967; Brinster 1967a und b; Thomson 1967; Wales u. a. 1967). Dabei ist der Gesichtspunkt vorherrschend, daß der Keim Energiequellen bzw. Baustoffe u. a. aus dem Tuben- oder Uterussekret entnimmt, das ihn umgibt. Seine Bedürfnisse scheinen von Stadium zu Stadium mehrfach zu wechseln (vgl. z. B. Chang 1950; Noyes und Dickmann 1960). Sinngemäß ist eine Zahl von Daten über Uterus- und Tubenmilieu, die Sekretproduktion, ihre Abhängigkeit vom Hormonstatus u. ä. und die Beziehungen zwischen Keim und Mutter in ihrer Komplexheit erarbeitet worden (Chang 1950; Noyes und Dickmann 1960; Kulangara 1961; Zimmermann 1960; Gottschewski 1965; Gottschewski und Zimmermann 1963; Homburger u. a. 1963; Schwick 1963; Dickmann 1967b; Sugawara und Hafez 1967a u. b; Beier 1967). Die Daten beziehen sich, sofern überhaupt eine biochemische Analyse durchgeführt wurde, meist auf niedermolekulare Stoffe. Diese Stoffe wurden in der hier vorgelegten Arbeit nicht erfaßt. In neuerer Zeit ergaben sich auch über hochmolekulare Substanzen detaillierte Befunde (Schwick 1963; Daniel 1967b; Beier 1967; Kirchner 1969).

Beiträge, die die Histochemie dazu liefern kann, betreffen vor allem Glykogen. Glykogen ist die Kohlenhydratreservesubstanz par excellence. Es findet sich im Zytoplasma der frühesten Furchungsstadien; vielleicht nimmt seine Konzentration während des Tubenaufenthaltes des Keims zu, namentlich in den präsumptiven Embryonalknotenzellen (vgl. Teil I, Tabelle 1, Zeile 1 I—IV, Zeile 2 und 3 V—VII und die Schemata 1 und 2) (vgl. Ishida 1963). Für Maus und Ratte wird ein Anstieg der Glykogendichte beim Beginn des Zwei-Zellen-Stadiums angegeben. Bis zur Bildung der Blastozyste bleibt sie etwa gleich (Maus: Thomson und Brinster 1966; Ratte: Mulnard 1955, jedoch Abfall während der Furchung nach Ishida 1954). Beim Übergang ins Blastozysten-Stadium wird es so gut wie restlos aufgebraucht, und zwar zuerst im Trophoblasten (ebenso bei der Maus, s. Thomson und Brinster 1966, und bei der Ratte, s. Ishida 1954, Mulnard 1955). Spuren von Glykogen sind in Blastozysten noch mit dem Elektronenmikroskop nachzuweisen (Enders und Schlafke 1965).

Geht man davon aus, daß die angegebenen Beobachtungen tatsächlich die vorhandene Glykogenmenge erfaßten und daß der Anstieg beim Kaninchen z. B. nicht etwa eine Freisetzung aus einem „blockierten" Zustand widerspiegelt, nimmt man dazu noch meine (a. a. O.) gemachte Feststellung einer hohen Phosphorylaseaktivität zur Zeit der Furchung hinzu, während Glykogensynthetase im Keim nicht nachweisbar ist, so liegen folgende Annahmen nahe:

1. Glykogen kommt als Energiereservoir für die Furchung nicht in Frage, im Gegensatz zum Übergang ins Blastozystenstadium, bei dem es aufgebraucht wird.

2. Die hohe Phosphorylaseaktivität der Furchungsstadien ist demzufolge nicht Ausdruck eines Glykogenabbaus. Möglicherweise synthetisiert der Keim Glykogen während der Furchung, und zwar nicht über Glykogensynthetase, sondern über Phosphorylase. Dieser Weg wird z. B. von Bo und Smith (1964) für den Uterus des Kaninchens gefordert. Beim Übergang zur Blastozyste mag die Phosphorylase Glykogen abbauen; ihre Aktivität verschwindet zusammen mit dem Glykogen (Denker, a. a. O.).

3. Der Glykogenabbau in der frühen Blastozyste muß sicher im Zusammenhang gesehen werden mit dem Beginn der Glykolyse durch den Keim (Fridhandler 1961).

In den Sekreten von Tube und Uterus fand ich nennenswerte Glykogenmengen nicht, auch nicht in der Cumulus-Interzellularsubstanz. Die geringe Amylase-Labilität des Uterussekrets 7⅓ d p. c. und des Tubensekrets kann auf einen gewissen Glykogengehalt hinweisen, ist aber aus methodischen Gründen mit Zurückhaltung zu betrachten (vgl. Teil I, S. 162f.). Es ist unwahrscheinlich, daß die von Kirchner (1969) beschriebenen oligomeren Kohlenhydrate des Uterussekrets im Paraffinschnitt erhalten sind und hier erfaßt wurden, denn die Fixierung immobilisiert fast ausschließlich hochmolekulare Substanzen (vgl. Teil I, S. 160). Christie (1967a) spricht sich klar für ein Auftreten von Glykogen im Uterussekret (nach 6 d p. c.) aus. Er benutzte wie ich die Bulmer-Technik; die Art des verwendeten Amylasepräparats gibt er allerdings nicht an (zur Kritik vgl. Teil I, S. 163). Da die von mir (und von Böving) verwendete Fixierung, nämlich Rossman bzw. Gendre, Glykogen sicher besser konserviert als das von Christie benutzte Bouin, möchte ich meinem Zweifel am Auftreten wesentlicher Glykogenmengen im Tuben- und Uterussekret eine Berechtigung zubilligen. Zudem ist bei biochemischen Untersuchungen kein Anhalt für einen nennenswerten Glykogengehalt gefunden worden (vgl. Kirchner 1969). Demgegenüber berichtet Daniel (1965) von einem fördernden Einfluß von Glykogen bei der in-vitro-Kultur von Blastozysten. Solche Befunde müssen nicht unbedingt über die unter physiologischen Bedingungen vorliegenden Verhältnisse etwas aussagen.

Im Epithel des Uterus allerdings tritt Glykogen ab 7⅓ d p. c. reichlich auf. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Angaben von Böving (1962) und Christie (1967). Sie fügen sich gut zu der Beobachtung von Vaes und de Meyer (1957), daß eine Glykogen-Akkumulation unter Einfluß von Gestagenen, nicht aber Östrogenen stattfindet. Hübner (1955) fand Glykogen im Uterus unter Östrogenen wie Gestagenen nur subepithelial; hier muß wohl an ein Artefakt gedacht werden (Fixierung: Formol-Alkohol). Kulangara (1961) beobachtete einen Einbau von ^{14}C-Glukose in polymere Substrate des Uterusepithels, -sekrets und des Trophoblasten. Hier dürften aber wohl Mukosubstanzen erfaßt worden sein. Da Kirchner (1969) gebundene Glukose im Uterussekret nur in sehr geringen Mengen fand, ist ferner zu fragen, ob nicht vor dem Einbau in die polymeren Substanzen eine Umwandlung in andere Zucker erfolgte.

Das Verhalten des Uterus der Ratte zeigt gegenüber dem des Kaninchens gewisse Abweichungen, so daß Beobachtungen von diesen Tieren nicht gut zum Vergleich herangezogen werden können (vgl. Walaas 1952; Lageron und Wegmann 1964; Christie 1966a u. b; Gregoire u. a. 1967; Lobel u. a. 1968; Ejsmont-Szumanska 1968).

Die Phosphorylase erscheint im Uterus bei Verwendung meiner Methode in einer Verteilung, die sich in Einzelheiten von der des Glykogens unterscheidet (Denker, a. a. O.). Aber bei ihr wie beim Glykogen macht sich eine zum Zeitpunkt und Ort der Implantation hin zunehmend positive Reaktion bemerkbar (zum Hormoneinfluß beim Kaninchen vgl. Bo 1961). Ob dies mit einer Glykogen-synthetisierenden Funktion der Phosphorylase zu erklären ist (Glykogen-Synthetase war im Endometrium negativ), ist wohl noch als fraglich zu bezeichnen (vgl. Bo 1961). Bei der Ratte kommen beide Enzyme vor (Bo und Smith 1966; zur Phosphorylase vgl. auch Lobel u. a. 1968).

Sollte Phosphorylase im Uterus eine Glykogen-synthetisierende Funktion haben, so käme für den Abbau α-Amylase in Frage. Sie ist in neuerer Zeit in einer Reihe von Geweben außerhalb der Speicheldrüsen nachgewiesen worden (vgl. McGeachin u. a. 1958; Krzyzanowski 1966). Für eine Aktivität des Uterusepithels oder -sekrets geben Versuche mit einem Substratfilmtest jedoch keinen sicheren Anhalt, bringen aber ein leicht positives Ergebnis in der Tube (Denker, a. a. O.).

Es gibt also insgesamt zahlreiche Zeichen für einen regen Glykogenstoffwechsel im Keim und den ihn umgebenden Geweben. Offenbar wird es jeweils vor Beginn wichtiger Morphogeneseschritte synthetisiert und deponiert (vgl. auch die Arbeiten von Christie): Der Keim ist besonders reich daran am Ende der Furchung, d. h. vor Beginn der Bildung der Blastozyste. Im Uterus wird zum Zeitpunkt und am Ort der Implantation Glykogen akkumuliert. Die Vermutung liegt nahe, daß es eine Bedeutung für die Energieversorgung des Keims hat. In welcher Weise es aber utilisiert wird, muß offenbleiben. Ähnliche Überlegungen gelten für das Glykogen im Trophoblasten der Keimscheibenumgebung und im Embryoblasten. Jedenfalls erscheint mir eine nennenswerte Aufnahme von Glykogen durch den Keim über die Sekrete von Tube und Uterus eher unwahrscheinlich trotz der Danielschen Befunde aus der in-vitro-Kultur (S. 287). Sowohl der geringe Gehalt der Sekrete an Glykogen als auch der offenbare Mangel von höheren Aktivitäten glykogenspaltender Enzyme in jüngeren Blastozysten sprechen dagegen.

4.6. Ovariale bzw. tubale Sekretion und Keimhüllenbildung

Durch die Hüllen hindurch muß der Stoffaustausch zwischen Mutter und Keim erfolgen. Er ist sicher selektiv, wenn auch der Ort der Selektion nicht bekannt ist (vgl. Austin und Lovelock 1958; Zimmermann u. a. 1963; Schwick 1963; Lutwak-Mann 1966; Beier 1967). Für das Überleben und eine normale Entwicklung der Tubeneier haben die Hüllen zweifellos eine Bedeutung (Kaninchen: vgl. Westman 1930; Greenwald 1958; Edwards 1964; Maus: vgl. Tarkowski und Wróblewska

1967). Normale Entwicklung mit nur einem geringen Rest der Mukoproteidschicht gibt allerdings Adams (1960a) an.

Welche Rolle den Hüllen beim Austausch und der angenommenen Selektion zukommt, ist nicht klar. Gerade deswegen erscheint es als wichtig, Daten über die Eigenschaften dieser Strukturen zusammenzutragen.

Die Corona-Interzellularsubstanz als Produkt der Follikelepithelzellen des Ovars ähnelt in vielen Eigenschaften MPS des Bindegewebes. Sie ist wie diese nur schwach PAS-positiv und durch Hyaluronidase spaltbar. Als saure Gruppen enthält sie Schwefelsäureester; Neuraminsäure tritt zurück. Uronsäuren, deren Vorkommen immer wieder postuliert wird, sind zumindest in der unmittelbaren Umgebung der Zona in wesentlichen Mengen nicht demonstrabel, wenn man von der Spaltbarkeit durch Hyluronidase absieht. Die CEC ist hier daher hoch.

Von den sMS der Zona ist die Corona- (und Cumulus-)Interzellularsubstanz klar unterschieden durch ihre schwache PAS (vgl. Stegner und Wartenberg 1961b), den nur sehr geringen NA-Gehalt und die Hyaluronidase-Labilität (vgl. das Schema 1, Teil I). Dies muß allerdings nicht gegen eine Rolle der Follikelepithelzellen bei der Bildung der Zona sprechen. Die Follikelepithelzellfortsätze, die sie durchziehen (Christina Krauskopf 1967), können ein spezielles Sekret absondern. Wahrscheinlich wird die Zona unter Beteiligung sowohl der Eizelle als auch der Follikelepithelzellen gebildet (Stegner und Wartenberg 1961a und b; Odor 1965; Gabaeva 1966).

In der Zona fand ich die PAS in Übereinstimmung mit Braden (1952) stark positiv. Morphologisch läßt sich die Zona in eine äußere granuläre und eine innere mehr homogene Schicht einteilen (Dickmann 1965).

Histochemisch ist ein besonderes Verhalten einer Innenzone (AB-negativ, PAS-positiv) für den Menschen beschrieben (Stegner und Wartenberg 1961b). Beim Kaninchen war nach meinen histochemischen Tests ein Reichtum an sauren Gruppen (NA-, vgl. auch Soupart und Noyes 1964, ebenso wie Schwefelsäureestergruppen) in den oberflächlichen Lagen innen und außen zu erkennen. Die inneren Partien zeichnen sich durch relativ viel Schwefelsäureestergruppen aus. Nach Gothie (1958) lagert die Zona während der Tubenwanderung des Eies Sulfat-^{35}S ein. Gegenüber Hyaluronidase ist sie resistent, was im Hinblick auf die Vorgänge der Besamung von Interesse ist (vgl. S. 273). Da Silva Sasso (1959) beschreibt eine Hyaluronidase-Labilität, verwendete jedoch Inkubationszeiten (18 h), bei denen nach Pearse (1960) mit unspezifischen Reaktionen gerechnet werden muß. Auch gibt er nicht die Art der von ihm verwendeten Präparation an.

Das Sekret der Tube lagert die Mukoproteidschicht auf das Ei ab (vgl. Moreaux 1913, Cohnen 1927, Westman 1930, Böving 1954, Greenwald 1958).

Das Tubensekret ist nur relativ schwach PAS-positiv. Es scheint ein Sulfomuzin mit hohem Schwefelsäureestergehalt zu sein (vgl. auch Gothie 1955). Carboxyl-

gruppen lassen sich mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachweisen, könnten aber auf Grund des CEC-Verhaltens vorkommen (Teil I, S. 210 f.). Neuraminsäure ist hier nicht demonstrabel. Gegenüber Hyaluronidase bleibt diese sMS stabil.

Die Mukoproteidschicht gleicht histochemisch ganz dem Tubensekret (vgl. das Schema 2, Teil I). Färberisch sind auch Unterschiede erkennbar (vgl. Teil I, Abb. 33).

Sie mögen auf quantitativen Differenzen der reagierenden Gruppen beruhen. In der Art dieser Gruppen besteht aber Übereinstimmung.

Meine Angabe einer relativ schwachen PAS steht im Gegensatz zu den Angaben von Braden (1952), der die PAS als stark positiv beschreibt (wie im Fall der Zona). Bei der von ihm zur histologischen Behandlung der Eier verwendeten Eiweißmethode nach Minchin mag es zu einer Schrumpfung der Mukoproteidschicht bei der Entwässerung kommen. Sie ist besonders stark, wenn man Keime frei ins Paraffin führt. In solchen Fällen erscheint die PAS infolge der größeren Dichte der Mukoproteidschicht verstärkt. Ob eine Verunreinigung durch das Eiweiß möglich war, vermag ch nicht zu sagen. Ferner verhält sich nach verschiedenen Methoden angesetztes Schiffsches Reagenz sehr verschieden hinsichtlich der allgemeinen Intensität der Färbung. Bei starken Färbungen werden sicher Unterschiede in der Reagibilität der Gewebsstrukturen verwischt. Der von mir verwendete Ansatz färbte nur relativ schwach. Die Kombination AB-PAS zeigt aber deutlich, daß die Mukoproteidschicht (wie die Interzellularsubstanz des Cumulus, die Bindegewebsgrundsubstanz und die Substanzen des Trophoblasten) nur wenig freie benachbarte OH-Gruppen besitzt.

Die histochemische Gleichartigkeit von Tubensekret und Mukoproteidschicht ist ein wesentliches Argument für die Vorstellung, daß diese Hülle vom Tubensekret gebildet wird. Die Ablagerung läßt sich auch im Experiment verfolgen: Sie erfolgt auf in den Eileiter gebrachte Fremdkörper (Greenwald 1958). Es sind aber auch Eigenschaften des Keims von Bedeutung. Nach Yoshinaga und Adams 1967 wird z. B. auf Mäuse-Blastozysten in der Tube des Kaninchens eine Mukoproteidschicht nicht aufgelagert. Die physikalisch-chemischen Grundprozesse dieses Vorgangs können nicht als bekannt gelten.

Vermutlich wird auch bei anderen Arten als dem Kaninchen physiologischerweise Material auf die Zona aufgetragen (Mensch vgl. Böving 1963; Dachs, Katze und Hund vgl. Amoroso 1966). Die histochemischen Eigenschaften des Tubensekrets sind bei verschiedenen Arten wohl unterschiedlich; im Tubensekret des Menschen fanden Parvis und Rossi 1966 sMS mit Sulfat- und Carboxylgruppen. Bei niederen Tieren, die stärkere Keimhüllen bilden, ist oft eine Schichtung und Abkunft der einzelnen Schichten von bestimmten Bereichen der Tube deutlich (für Triton s. Vilter 1966, 1967a und b). Für Capillaria hepatica (Trichuroidea) wird ein Gehalt der äußeren Lage an NA angegeben (Mariano 1967).

Die Sekretion der Tube steht beim Kaninchen unter dem Einfluß von Ovarialhormonen (Greenwald 1957, 1958; Adams 1965).

Sicher ist die Zusammensetzung des Tubenmediums von Bedeutung für die Entwicklung des Keims. Die in-vitro-Kultur stellt z. B. zum Zeitpunkt der ersten Furchungsteilung bei der Maus immer noch ein großes Problem dar (Whittingham 1966). Gupta u. a. (1967) diskutieren besondere biochemische Leistungen der Region der Verbindung zwischen Pars ampullaris und Pars isthmica beim Kaninchen. Histochemisch fand ich dort allerdings keine Auffälligkeiten. Sexualhormone üben in vitro starke und meist schädliche Einflüsse auf den Keim aus (Seidel (unveröffentlicht), Daniel 1964; Daniel und Levy 1964; McGaughey und Daniel 1966; Pratt und Daniel 1967). Die Art ihrer in-vivo-Wirkung ist nicht klar; bisher ist nur ein Einfluß auf die Motilität der Tube gesichert (Chang 1967; Greenwald 1967).

4.7. Verhalten der Blastozyste im Uterusmedium

Der Übertritt des Keims von der Tube in den Uterus stellt ein einschneidendes Ereignis in seinem Leben dar. Die Mortalität erreicht um diese Zeit ein Maximum (Adams 1960b). Eine Umstellung des Engergiestoffwechsels findet in dieser Phase statt (Fridhandler 1961; zum Glykogen s. S. 286f.). Die Uterusschleimhaut muß bestimmte biochemische Aktivitäten entfalten. Exakte hormonelle Steuerung und keimbedingte Rückkoppelungsreaktionen stellen diese Aktivität auf die Bedürfnisse des Keims ein (Courrier 1945 s. Vaes und de Meyer 1957; Adams und Lutwakmann 1956; Adams 1965; Beier 1967; Marcus und Shelesnyak 1967; Kirchner 1969). Spezielle Proteinkomponenten des Uterussekrets scheinen eine Bedeutung für die normale Entwicklung der Blastozysten zu haben (Schwick 1963; Beier 1967; Daniel und Krishnan 1967b; Krishnan und Daniel 1967). Bei ektopischer Implantation wird die Entwicklung des Embryoblasten gehemmt (Kirby 1963, 1965a). Allerdings gibt es keine Veranlassung für die Vorstellung, daß durch Einflüsse des Uterusmilieus etwa die Determinierung bestimmter Keimzellen zu Embryonalknoten- bzw. Trophoblastzellen geschehe. Die Sonderung dieser Zellen ist zweifellos bereits in Furchungsstadien vorbereitet. Im Uterus wird die Blastozystengestalt lediglich realisiert (s. S. 250ff.). Dementsprechend ist eine Blastozystenbildung grundsätzlich ebenso in der Tube möglich (Adams 1958); andererseits können auch junge Furchungsstadien von 16—32 Zellen, bei denen nach meinen Befunden die Trennung von präsumptiven Trophoblast- und Embryonalknotenzellen bereits erfolgt ist, sich im Uterus zu Blastozysten entwickeln (Adams 1956, 1960a). Von histochemischer Seite ist zu den hier liegenden stoffwechselphysiologischen Fragen wenig beizutragen. Die histochemische Analyse des Uterussekretes auf hochmolekulare Kohlenhydratsubstanzen ist wenig ergiebig: Die vorkommenden Mukosubstanzen (Glykoproteine) lassen freie benachbarte OH-Gruppen (PAS), Neuraminsäure und Schwefelsäureestergruppen in allen Stadien in etwa gleicher Weise erkennen. Die Blastozystenhöhle erscheint in Schnitten bis 6d p. c. leer. Ab 7 d p. c. werden dort sMS-Präzipitate nachweisbar, d. h. zu dem Zeitpunkt, zu dem Serumproteine der Mutter ins Blastozystenlumen eindringen (Gottschewski und Zimmermann 1961, Zimmermann u. a. 1963, Kirchner 1969). Sie verhalten

sich histochemisch etwas anders als das Uterussekret: Die PAS und ein NA-Gehalt sind in der Blastozystenhöhle nur angedeutet, im Uterussekret dagegen deutlich positiv. Die Substanzen des Blastozystenlumens zeigen ein auffälliges CEC-Verhalten: Sie ähneln Keratosulfaten. Von Keratosulfaten ist bekannt, daß sie eine negative bis schwache PAS geben. Eine Beziehung zu den von Kirchner 1969 mitgeteilten Befunden herzustellen, erscheint gegenwärtig noch schwierig. Der schwache Ausfall der PAS dieser sMS könnte durch einen hohen Anteil an Uteroglobin (Beier 1967) bedingt sein; nach Kirchner (1969) ist dieses PAS-negativ. Es wäre gut denkbar, daß das Uteroglobin durchaus eine Kohlenhydratkomponente enthält, die aber in der PAS nicht reagiert, beispielsweise wegen eines hohen Schwefelsäureestergehalts.

Beim Übertritt des Keims in den Uterus kommt es zu einer Umgestaltung der Hüllen. Nach Bövings Auffassung (1954ff.) wird die Zona bei der Expansion der Blastozyste soweit gedehnt (oder auch aufgelöst?), daß sie im Lichtmikroskop zumindest nicht mehr erkennbar ist. Die Mukoproteidschicht bleibt als Hülle des Keims erhalten und soll nach Böving durch Auflagerung von Uterussekret verstärkt werden. Die Blastozystenhüllen sind also zweischichtig (Teil I, Abb. 20—22, 34, 35); die innere Lage soll die Mukoproteidschicht sein (Mukolemma nach Böving), die äußere das aufgelagerte Uterussekret (Glöolemma nach Böving).

Nach meinen histochemischen Befunden tritt in der Mukoproteidschicht schon bei älteren Furchungsstadien eine Hale-negative Innenzone auf (Teil I, Abb. 28), die sich mit AB besonders stark färbt. Nach dem CEC-Verhalten ist sie vielleicht verarmt an Schwefelsäureestergruppen; dazu passen die starke AB, da diese bei sehr hohem Schwefelsäureestergehalt schwach oder negativ ausfallen kann, und die dort stärkere PAS. Wie Gothie (1958) nach ihren autoradiographischen Ergebnissen vermutet, verwenden Blastozysten schwefelsäureesterhaltige Substanzen der Hüllen zu ihrer „Ernährung".

Ähnliche Vorstellungen über einen Übertritt von Mukosubstanzen in den Keim äußert Kulangara (1961). In meinen histochemischen Tests ist die PAS, während sie bei der Mukoproteidschicht am 3. Tage nur schwach ausfällt, in allen Schichten der Blastozystenhülle bald stark positiv. Besonders betont ist sie stets in der inneren Schicht der Blastozystenhüllen (Teil I, Abb. 20—22; vgl. auch die Schemata). In der Stärke der Färbung wie der Lage ist diese Schicht der Zona vergleichbar. Bis 5d ist sie zur äußeren Schicht scharf, danach unscharf begrenzt. Ähnliche Ergebnisse wie die PAS bringt die Proteinfärbung HgBPB. Ab 5d p. c. wird in der ganzen Dicke der Blastozystenhüllen NA nachweisbar (Teil I, Abb. 36, Tabelle 7: VII 8—11, 185, 187, 200f. Von diesem Zeitpunkt an sind die Hüllen im Paraffin sehr spröde.

Nach alledem scheinen bei der Ausbildung der Blastozyste die Keimhüllen nicht nur gedehnt und mit einer neuen Lage (Sekret des Uterus) bedeckt zu werden, wie Böving (1954ff.) angibt, sondern offenbar kommt es zu einem gründlichen Umbau. Dabei werden vielleicht Schwefelsäureestergruppen der Mukoproteidschicht abgespalten und PAS-reagible Hydroxylgruppen frei. Dies fügt sich gut zu den Vorstellungen von Gothie (1958) und von Kulangara (1961) über einen Übergang von Material aus den Hüllen in den Keim. Offenbar werden dabei Schwefelsäureestergruppen durch die zweite Art von sauren Gruppen, NA, ersetzt. Woher diese NA stammt, ist zur Zeit nicht klar. Es erscheint mir unwahrscheinlich, daß sie in der Mukoproteidschicht in „maskierter" Form vorliegt, denn alle Prozeduren einschließlich alkalischer Vorbehandlung (Laktonspaltung?) bringen Hinweise auf einen NA-Gehalt nicht. Die NA der Zona dürfte nicht ausreichen, um alle NA der Blastozystenhüllen zu stellen. Das Uterussekret enthält NA. Dies mag die wesentliche Quelle sein (Schwefelsäureestergehalt s. Teil I, S. 180—211 und vgl. Boström und Odeblad 1952; Gothie 1955, 1960). Um eine einfache Auflagerung aber kann es sich nicht handeln, da Sialinsäuren auch in der inneren Lage der Blastozystenhüllen nachweisbar sind.

Dies hindert mich daran, die Bövingschen Bezeichnungen für die Blastozystenhüllen zu übernehmen.

Ich nehme an, daß das Material von Zona und Mukoproteidschicht, vielleicht zusammen mit Uterussekret und Sekreten des Trophoblasten, im Blastozystenstadium umgebaut und neu angeordnet wird. Beim gegenwärtigen Stand des Wissens möchte ich es vorziehen, auf eine Herleitung der einzelnen Schichten zu verzichten und nur allgemein von „Blastozystenhüllen" sprechen.

4.8. Implantation der Blastozyste im Uterus

7⅓d p. c. beginnt im Bereich der Trophoblastsprosse die Auflösung der Blastozystenhüllen (Teil I, Abb. 40; s. auch die Arbeiten von Böving).

Die mesometral liegenden relativ intakten Reste unterscheiden sich in einer Reihe von Tests von den antimesometral gelegenen, welche zu unförmigen Fetzen umgewandelt sind: Letztere scheinen im Verhältnis zum Gehalt an Schwefelsäureestergruppen ärmer an NA zu sein (Methylierung und Verseifung, AB bei *p*H 1, HID-AB, CEC). So läßt sich an eine NAase-Aktivität dieser Bereiche denken. Schon die „klebrige Umwandlung" der abembryonalen Bereiche der Hüllen 7d p. c., die von Böving (1954ff.) für die Orientierung des Keims im Uterus verantwortlich gemacht und auf einen lokal hohen *p*H zurückgeführt wird, könnte mit solchen Prozessen zusammenhängen, denn saure Gruppen haben für die physikalisch-chemischen Eigenschaften von sMS, z. B. die Viskosität, eine wesentliche Bedeutung (vgl. Gottschalk und Thomas 1961). Außerdem könnte eine NAase-Aktivität bei der Invasion des Trophoblasten eine Rolle spielen. Dabei kommt es nach Böving zu einer Lockerung der Verbindungen zwischen den Uterusepithelzellen. Die Trophoblastsprosse dringen in den Raum zwischen zwei Zellen ein (vgl. Teil I, Abb. 15c) und fusionieren mit den Endometrium-Zellen. Die Zelloberflächen des Uterusepithels, besonders deutlich der Bürstensaum, enthalten reichlich NA, während zum mindesten

die extraembryonalen Teile des Keims in ihren sMS auffälligerweise fast nur Schwefelsäureestergruppen erkennen lassen, so Trophoblast und Trophoblastsprosse und die Substanzen der Blastozystenhöhle. Das CEC-Verhalten ähnelt dem von Keratosulfaten (über Keratosulfat-ähnliche sMS in der Allantoisflüssigkeit des Hühnchens, die allerdings NA enthalten, s. Meyer u. a. 1967). Jedoch sind die Verhältnisse an den Zelloberflächen lichtmikroskopisch nicht recht zu beurteilen. Die Elektronenmikroskopie des Invasionsvorgangs legt die Vermutung nahe, daß dabei Oberflächenspannungsveränderungen eine Rolle spielen, an denen die sMS beteilgt sind (Glenister 1966a, b).

Schwick berichtet (1963) über einen Anstieg von NAase-Aktivität im Uterussekret bis $6^2/_3$ d p. c. Der Nachweis mußte allerdings bei saurem *p*H erfolgen; das Uterussekret aber ist alkalisch. Ich habe versucht, NAase-Aktivität histochemisch zu lokalisieren (Denker, a. a. O.). Da es bislang histochemische NAase-Tests nicht gibt, zog ich das Prinzip des Glykosidasennachweises von Dahlqvist und Brun (1962) heran. Das verwendete System ist sehr komplex, und es ist nicht ganz sicher, ob die erhaltene Lokalisation exakt ist. Ich beobachtete (7 d p. c.) eine Aktivität in der Tiefe der mesometralen Endometriums-Furchen, d. h. nicht am Ort der Auflösung der Keimhüllen bzw. der Invasion. Zum Nachweis war auch hier ein saurer *p*H notwendig.

Diese Ergebnisse müssen zu Zweifeln daran führen, daß die gezeigte NAase-Aktivität wesentliche Bedeutung für Keimhüllenauflösung und Invasion hat. Sie behält aber Interesse im Zusammenhang mit der Beobachtung proteolytischer Enzyme des Keims:

In Korrelation zum Implantationsgeschehen tritt im Trophoblasten, wie ich zeigen konnte (Denker, a. a. O.), eine sehr hohe proteolytische Aktivität auf. Die wirksamen Faktoren besitzen biochemische Eigenschaften, welche sie für die Aufgabe der Hüllenauflösung und Invasion als geeignet erscheinen lassen, nämlich sehr leichte Diffusibilität und Wirksamkeit bei alkalischem *p*H.

Unter der Vorstellung, daß die proteolytische Aktivität des Keims eine Rolle bei der Auflösung der Keimhüllen und der Implantation spielt, ergeben sich folgende Gesichtspunkte:

1. Die sMS der Blastozystenhüllen und der Zelloberflächen des Uterusepithels werden für die Proteolyse durch Abspaltung saurer Gruppen, z. B. durch NAase, vorbereitet, da saure Gruppen den MS zunächst eine Reistenz gegenüber Proteolyse verleihen (vgl. Runnström 1949 für Arbacia; Mora und Young 1959; Sela und Katchalski 1959; Gottschalk 1960b; Mehadevan u. a. 1967; Faillard und Pribilla 1965; Martin u. a. 1967; Texter u. a. 1967). Diese Vorstellungen lassen sich durch die Beobachtung stützen, daß die Hüllen nach NAase-Einwirkung durch Trypsin schneller abgebaut werden (s. Teil I, S. 204). Eine gewisse Resistenz gegenüber Proteolyse verleihen den MS neutrale Zucker (s. Faillard und Pribilla 1964), o daß auch andere Glykosidasen eine Rolle spielen können (die Trophoblastprosse zeigten eine Aktivität vom β-Galaktosidase und Glukosaminidase (Denker, a. a. O.).

2. Das Konzept einer gemeinsamen Aktivität von NAase und proteolytischen Enzymen macht eine positive Rückkoppelung denkbar: Nicht nur die Proteolyse ist nach NAase-Wirkung erleichtert, auch die NAase-Wirkung ist auf kleine Moleküle größer (s. Neuberger und Marshall 1966).

3. Die sMS der Reste der Hüllen ähneln in einigen Eigenschaften Keratosulfaten (schwache PAS, hoher Schwefelsäureestergehalt, hohe CEC). Von Keratosulfaten ist eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen bekannt (Meyer u. a. 1967). Wenn die Hüllen heterogen zusammengesetzt sind, könnten diese Reste also auch schlechthin die zurückbleibenden resistentesten Komponenten darstellen. Die sMS der Gewebe des Keims verhalten sich histochemisch ähnlich wie diese Reste der Hüllen. Sie mögen den Keim vor einem Angriff der eigenen proteolytischen Enzyme schützen.

4. Das Endometrium enthält offenbar wirksame Inhibitoren für das proteolytische Prinzip des Keims: Bei Kontakt des Trophoblasten mit dem Endometrium (physiologisch oder artefiziell bei der Montage) erlischt die Aktivität (Denker, a. a. O.). Vgl. dazu auch die Demonstration von Porteaseninhibitoren im Uterussekret durch Beier 1967a. (Zum Serum-Antitrypsin in der Schwangerschaft vgl. auch Gräfenberg 1909). Nach Mayer und Duluc (1966) und Mayer u. a. (1967) existieren im Uterus bei Ratte und Maus Faktoren, die die Implantation hemmen.

5. Die proteolytische Aktivität geht wahrscheinlich vorwiegend von den Trophoblastsprossen aus und wird evtl. scharf lokalisiert eingesetzt beim „Platzen" der Trophoblastsprosse, wie es Böving (1964a, 1966) beschreibt.

Für Maus und Ratte wird eine enzymatische Aktivität des Keimes in Frage gestellt oder zumindest eine Kombination mit anderen, z. B. mechanischen Faktoren angenommen: Maus s. Cole (1967); Ratte s. Dickmann und Noyes (1960); Dickmann (1967a); Alloiteau und Psychoyos (1966). Eine solche Aktivität befürwortet für die Maus Reinius (1967). Beim Meerschweinchen läßt sich eine proteolytische Aktivität der Blastozyste sicher nachweisen, während die Ratte im gleichen Test negative Ergebnisse bringt (Blandau 1949). Morphologische Untersuchungen der Implantation bei verschiedenen Nagern legen ebenfalls die Annahme einer Enzymwirkung auf die Zelloberflächen nahe (vgl. Potts 1966; Enders und Schlafke 1967; Porter 1967; Nilsson 1967; Mayer u. a. 1967; Finn und McLaren 1967; Deanesly 1967). Bei Maus und Ratte sind für die Orientierung des Keims die Existenz der Hüllen und ihre örtliche „Klebrigkeit" offenbar nicht Voraussetzung (s. Dickmann und Noyes 1960; Kirby u. a. 1967).

Die Implantation ist sicher Regulationen durch die Mutter unterworfen, die vielleicht, zumindest mittelbar, hormoneller Art sind (vgl. Shelesnyak und Kraicer 1963). Eine Auflösung der Hüllen erfolgt beim Kaninchen in vitro nicht, auch nicht in Anwesenheit von Hormonen (s. Glenister 1966a; New 1966), in vivo nicht nach Ovariektomie 7 d p. c. (Lutwak-Mann 1962). Nach Entfernung der Zona kommt es zu einer Implantation in vitro auch ohne Hormone (Glenister 1963, 1966a; vgl. auch Cole und Paul 1965). Zur Bedeutung von Progesteron für die Implantation des Kaninchens s. Allen und Corner (1929); Rennie und Davies (1965).

Sehr viel häufiger als beim Kaninchen sind die hormonalen Regulationen bei Maus und Ratte untersucht worden. In der Art dieser Regulationen bestehen aber offenbar große Unter-

schiede zu den Verhältnissen beim Kaninchen (Bedeutung von Östrogenen). Auf die sehr umfangreiche Literatur soll daher hier nicht eingegangen werden.

Die besprochenen Beobachtungen führen insgesamt zu folgenden Vorstellungen von den Prozessen der Auflösung der Blastozystenhüllen und der Implantation: Offenbar bestehen Unterschiede zwischen verschiedenen Arten. Die zahlreichen vorliegenden Untersuchungen an Ratte und Maus lassen ein klares Bild noch nicht zu. Daher mögen die Verhältnisse bei Kaninchen und Meerschweinchen als Modell dienen. Beim Kaninchen sind Keimhüllenauflösung und Implantation eng miteinander gekoppelt. Vermutlich sind an beiden Enzyme maßgebend beteiligt. Eine hohe proteolytische Aktivität des Trophoblasten ist beim Kaninchen wie beim Meerschweinchen dafür namhaft zu machen. Sie wird offensichtlich von den Trophoblastsprossen sehr exakt am Ort des Geschehens eingesetzt. Eine Rolle von Glykosidasen, besonders von NAase, ist nach substrathistochemischen, elektronenmikroskopischen und experimentellen Befunden und nach theoretischen Erwägungen zu vermuten, aber noch nicht abgeklärt. Alle beteiligten Prozesse unterliegen sicher zahlreichen Regulationen. Dabei ist eine Bedeutung von Inhibitoren der Enzyme, z. B. Proteaseninhibitoren, wahrscheinlich. Die Bereitstellung von Enzymen und Inhibitoren wird vermutlich durch Hormone der Mutter gesteuert (vgl. dazu die Arbeiten von Shelesnyak und Mitarb.). Die strenge raumzeitliche Ordnung des Geschehens wird aber sicher durch eine Vielzahl weiterer und bisher unbekannter Interaktionen zwischen Keim und Endometrium reguliert.

Die Implantation geht mit tiefgreifenden Veränderungen im Stoffwechsel des Keims einher (Gottschewski und Zimmermann 1961; Lutwak-Mann 1963; Zimmermann u. a. 1963; Zimmermann 1965, 1966, 1967). Zu diesem Zeitpunkt steigt die Mortalität sehr stark an (Adams 1960b; Böving 1963).

Zum Zeitpunkt, zu dem der Keim von der Tube in den Uterus übertritt, findet auch eine Umstellung seines Stoffwechsels statt (s. S. 286f.). Es ist das gleiche Entwicklungsstadium, in dem ein morphogenetischer Prozeß zu Ende geht: Die Scheidung von Embryonalknotenzellen und Trophoblastzellen (S. 248ff.). Zum Zeitpunkt der Implantation ist nicht nur wieder ein stoffwechselphysiologischer Umbruch im Gange, sondern auch eine neue Ebene in der Morphogenese erreicht: Die Körpergrundgestalt bildet sich. Dies gibt den äußeren Anlaß, die hier vorgelegte Arbeit mit der Betrachtung dieses Stadiums zu beschließen. Die mitgeteilten Beobachtungen können sicher unser Bild von den wesentlichen Prozessen dieser Phasen nur um einige Aspekte erweitern. Sie werfen zugleich mehr Fragen auf, als sie beantworten. Sie mögen helfen, Konzepte für weitere Experimente zu gewinnen.

5. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Dargestellt werden Befunde zur Differenzierung der Blastomeren während der Furchung und zur Frage einer Polarität der jungen Keimscheibe beim Kaninchen. In einer gemeinsamen Diskussion mit Ergebnissen, die in Teil I mitgeteilt wurden, werden folgende Vorstellungen entwickelt:

1. Bei der Besamung wird eine saure Mukosubstanz in den perivitellinen Raum abgegeben. Die Möglichkeit einer Bedeutung für den Polyspermieblock wird diskutiert (S. 272ff.).

2. Bei der Furchung kommt es früh zu einer Differenzierung von präsumptiven Embryonalknotenzellen und Trophoblastzellen. Die Umwachsung der ersteren durch die letzteren ist im wesentlichen nicht Ursache, sondern Ausdruck der Differenzierung.

Die zwei Gruppen von Blastomeren unterscheiden sich durch die Verteilung von Proteinen, RNS und später auch Glykogen, nicht aber von Mukosubstanzen (S. 248ff., 274ff.).

3. Die funktionelle Polarität der frühen Keimscheibe geht nicht mit einer polaren Anordnung hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen einher (S. 266ff., 285).

4. Vor Beginn wichtiger Morphogeneseschritte wird Glykogen in den Geweben deponiert: vor der Bildung der Blastozyste im Keim, bei der Implantation in Uterusepithel und Keim. Während des Ablaufs dieser Prozesse wird es abgebaut (S. 285ff.).

5. Die Keimhüllen werden beim Übergang in das Blastozystenstadium chemisch umgestaltet, was sich vor allem im Neuraminsäuregehalt kundtut. Das bedeutet, daß keine einfache Auflagerung von Uterussekret, sondern ein Umbau stattfindet. Ein Abbau Schwefelsäureesterhaltiger Gruppen während dieser Prozesse erscheint denkbar (S. 292).

6. Bei der Auflösung der Blatozystenhüllen und der Implantation scheint der Abbau der Glykoproteine durch proteolytische Enzyme des Keims wesentlich zu sein. Eine Beteiligung von Neuraminidase und anderen Glykosidasen ist auf Grund der Substratuntersuchungen und aus theoretischen Erwägungen denkbar, aber nicht gesichert (S. 293ff.).

6. Literatur

Für Arbeiten, die hier nicht aufgeführt sind, vgl. das Literaturverzeichnis von Teil I!

Adams, C. E. (1955), The frequency of occurence of supernumerary spermatozoa in rabbit ova, Studies on Fertility **VII**, 130–138 (Harrison, R. G. = Ed.).

– (1956), Egg transfer and fertility in the rabbit, Proceed. III Interntl. Congress Animal Reproduction, Cambridge 25th–30th June 1956.

– (1958), Egg development in the rabbit: the influence of post-coital ligation of the uterine tube and of ovarectomy, J. Endocrinol. **16**, 283–293.

– (1960a), Development of the rabbit eggs with special reference to the mucin layer, First Interntl. Congr. Endocrinol. (Copenhagen), p. 687.

– (1960b), Studies on prenatal mortality in the rabbit Oryctolagus cuniculus: The amount and distribution of loss before and after implantation, J. Endocrinol. **19**, 325–344.

– (1965), The influence of maternal environment on preimplantation stages of pregnancy in the rabbit, Ciba Foundation Sympos. on Preimplant. Stages of Pregnancy (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M = Eds.) (London), p. 345–373.

– Lutwak-Mann, Cecilia (1956), Endometrial carbonic anhydrase as hormone indicator for progesterone and related steroides, J. Endocrinol. **13**, XIX–XX.

Adams, C. W. M., Abdulla, Y. H., Bayliss, O. B. (1967), Osmium tetroxide as a histochemical and histological reagent, Histochemie **9**, 68–77.

Ahlgren, M. (1966), Development of fertilized tubal rabbit eggs in diffusion chambers in vivo. J. Reprod. Fert. **12**, 145–148.

Aketa, K. (1967), On the sperm-egg bonding as the initial step of fertilization in the sea urchin. Embryologia **9**, 238–245.

Allen, W. M., Corner, G. W. (1929), Physiology of the corpus luteum. III. Normal growth and implantation of embryos after very early ablation of the ovaries, under the influence of extracts of the corpus luteum. Amer. J. Physiol. **88**, 340–346.

Alloiteau, J. J., Psychoyos, A. (1966), Y a-t-il pour l'œuf de ratte deux façons de perdre sa zone pellucide. C. R. Acad. Sci. (Paris), Sér. D, **262**, 1561–1564.

Ambrose, E. J., Forrester, J. A. (1968), Electrical phenomena associated with cell movements. Aspects of cell motility. Sympos. Soc. Exptl. Biol. XXII (Miller, P. L. = Ed.) (Cambridge), p. 237–248.

Amoroso, E. C. (1966), in Diskussion in: Ciba Foundation Study Group No. 23 on Egg Implant. (Wolstenholme, G. E, W.; O'Connor, M. = Eds.), p. 100.

— Griffiths, W. F. B., Hamilton, W. J. (1942), The early development of the goat (Capra hirsus). J. Anat. (London) **76**, 377.

Assheton, R. (1898), The segmentation of the ovum of the sheep, with observations on the hypothesis of a hypoblastic origin for the trophoblast. Quart. J. Microsc. Sci. **41**, 205–261.

Austin, C. R. (1956), Cortical granules in hamster eggs. Exptl. Cell Res. **10**, 533–540.

— (1963), Fertilization and transport of the ovum. Mechanisms Concerned with Conception (Hartman, C. G. = Ed.) (New York), p. 285–320.

— (1965), Ultrastructural changes in the egg during fertilization and the initiation of cleavage. Ciba Foundation Sympos. on Preimpl. Stages of Pregnancy (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. = Eds.) (London), p. 3–28.

— (1967), Capacitation of spermatozoa. Interntl. J. Fert. **12**, 25–31.

— and Braden, A. W. H. (1954), Induction and inhibition of the second polar division in the rat egg and subsequent fertilization. Austral. J. Biol. Sci. **7**, 195–210.

— — (1956), Early reaction of the rodent egg to spermatozoon penetration. J. Exper. Biol. **33**, 358–365.

— and Lovelock, J. E. (1958), Permeability of rabbit, rat and hamster egg membranes. Exptl. Cell Res. **15**, 260–261.

Bataillon, E. (1906), Imprégnation et fécondation. C. R. Acad. Sci. (Paris) **142**, 1351–1353.

Behrend, W. (1964), Analyse der Elektrolyte im Uterus des Kaninchens. Staatsexamensarbeit, Marburg (unveröffentlicht).

Beier, H. M. (1967a), Biochemisch-entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Proteinmilieu für die Blastozystenentwicklung des Kaninchens (Oryctolagus cuniculus). Dissertation, Marburg (Zool. Jb. Anat. **85**, 72–190, 1968).

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

Van Beneden, E. (1875), 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. Belg., 2me Sér., **40**, 686–736.

— (1880), La formation des feuillets chez le lapin. Arch. Biol. **1**, 1–88.

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

— (1911), 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.

Bereiter-Hahn, J. (1967), Dissoziation und Reaggregation von Epidermiszellen der Larven von Xenopus laevis (Daudin) in vitro. Zeitrafferlaufbild- und Teilbildanalyse. Z. Zellforsch. **79**, 118–156.

Biggers, J. D., Whittingham, D. G., Donakue, R. P. (1967), The pattern of energy metabolism in the mouse occyte and zygote. Proceed. Natl. Acad. Sci. USA **58**, 560–567.

Bischoff, Th. L. W. (1842), Entwicklungsgeschichte des Kaninchen-Eies. (Braunschweig: F. Vieweg & Sohn.)

Bishop, D. W., Tyler, A. (1956), Fertilizin of mammalian eggs. J. Exper. Zool. **132**, 575–601.

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

Bo, W. J. (1961), The effect of hormone treatment on the phosphorylase activity of the rabbit uterus. J. Histochem. Cytochem. **9**, 430–433.

— Smith, M. S. (1964), Glycogen synthetase in the rabbit tongue and uterus. Anatom. Rec. **148**, 503–505.

— — (1966) A histochemical study on the glycogen synthesizing enzyme in the myometrium of the pregnant and pseudopregant rat. J. Reprod. Fert. **12**, 237–242.

— — Reiter, R., Pizzarello, D. J. (1965), The effect of ovarian hormones on the sulfo-mucopolysaccharides of the uterus. J. Histochem. Cytochem. **13**, 461–469.

Boström, H., Odeblad, E. (1952), Autoradiographic observations on the uptake of S-35 in the genital organs of the female rat and rabbit after injection of labelled sodium sulfate. Acta Endocrinol. **10**, 89–96.

Braden, A. W. H. (1952), Properties of the membranes of rat and rabbit eggs, Austral. J. Sci. Res. Ser. B **5**, 460–471.

— (1962), Spermatozoon penetration and fertilization in the mouse. Sympos. Genet. Biol. Italica (Reggio Emilia, Pavia) **9**, 94–101.

— Austin, C. R., David, H. A. (1954), The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. Austral. J. Biol. Sci. **7**, 391–409.

Brinster, R. L. (1967a), Carbon dioxide production from glucose by the preimplantation mouse embryo. Exptl. Cell Res. **47**, 271–277.

— (1967b), Carbon dioxide production from lactate and pyruvate by the preimplantation mouse embryo. Exptl. Cell Res. **47**, 634–637.

— (1967c), Lactate dehydrogenase activity in the preimplantation rabbit embryo. Biochim. Biophys. Acta **148**, 298.

Buongiorno-Nardelli, M., Bertolini, B. (1967), Subcellular localization of some acid hydrolases in Triturus cristatus spermatozoa. Histochem. **8**, 34–44.

Burkl, W. (1962), Segmentation und Fragmentation der Eizellen in atretischen Eierstockfollikeln. Z. Zellforschung **58**, 369–386.

Carter, S. (1965), Principles of cell motility: The direction of cell movement and cancer invasion. Nature **208**, 1183–1187.

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

— (1955a), Fertilization and normal development of follicular oocytes in the rabbit. Science **121**, 867–869.

— (1955b), The maturation of rabbit oocytes in cultures and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the Fallopian tubes. J. Exptl. Zool. **128**, 379–399.

— (1967), Effects of progesterone and related compounds on fertilization, transportation and development of rabbit eggs. Endocrinol. **81**, 1251–1260.

— and Bedford, J. M. (1962), Fertilizability of rabbit ova after removal of the corona radiata. Fert. Steril. **13**, 421.

Christie, G. A. (1966a). Implantation of the rat embryo: Glycogen and alkaline phosphatases. J. Reprod. Fert. **12**, 279–294.

Christie, G. A. (1966b), Glycogen and alkaline phosphatases in relation to decidual development in early pregnant rats. J. Anat. Physiol. (London), 431.
— (1967a). Histochemistry of implantation in the rabbit. Histochemie **9**, 13–29.
— (1967b). Implantation of the rat embryo: further histochemical observations on carbohydrate, RNA, and lipid metabolic pathways. J. Reprod. Fert. **13**, 281.
Cole, R. J. (1967), Cinematographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. J. Embryol. Exptl. Morph. **17**, 481–490.
— Paul, J. (1965), Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos, and cell strains derived from them. Ciba Foundation Sympos. on Preimplant. Stages of Pregnancy (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. = Eds.) (London), p. 82–112.
— Edwards, R. G., Paul, J. (1965), Cytodifferentiation in cell colonies and cell strains derived from cleaving ova and blastocyst of the rabbit. Exptl. Cell Res. **37**, 501–504.
— — — (1966), Cytodifferentiation and embryogenesis in cell colonies and tissue cultures derived from ova and blastocysts of the rabbit. Developm. Biol. **13**, 385–407.
Dahlqvist, A., Brun, A. (1962), A method for the histochemical demonstration of disaccharidase activities: application to invertase and trehalase in some animal tissues. J. Histochem. Cytochem. **10**, 294–302.
Dalcq, A. M. (1951), New descriptive and experimental data concerning the mammalian egg, principally of the rat (with a rectification of a previous interpretation) I, IIa, IIb. Proceed. Kon. Nederl. Akad. Wet., Ser. C, **54**, 351–363, 364–372, 469–479.
— (1954), Nouvelles donnés structurales et cytochimiques sur l'œuf des mammifères. Rev. Gen. Sci. Pures Appl. **61**, 19–41.
— (1955), Progresses of synthesis during development of rodent's eggs and embryos. Studies on Fertility (Harrison, R. G. = Ed.) (Oxford) **7**, 113–132.
— (1956). Distribution et évolution de quelques métabolites dans l'œuf des rongeurs. C. R. Ass. Anat. **89**, 409–419.
— (1959), Les manifestations de l'adénosinetriphosphatase dans les premiers stades embryonaires des mammifères. C. R. Acad. Sci. (Paris) **249**, 2851–2853.
— (1962), Evolution de l'organisation morphogénétique dans l'oocyte chez le Rat et la Souris. Anat. Anz. **109**, 373–382.
— (1965), Structure germinale et morphogénèse animale. Rev. Interntl. Philosophie **3–4**, 342–360.
Daniel, J. C. jr. (1963), Some kinetics of blastocyst formation as studied by the process of reconstitution. J. Exptl. Zool. **154**, 231–237.
— (1964), Some effects of steroids on cleavage of rabbit eggs in vitro. Endocrinol. **75**, 706–710.
— (1965), Studies on the growth of 5-day-old rabbit blastocysts in vitro. J. Embryol. Exptl. Morphol. **13**, 83–95.
— (1967), The pattern of utilization of respiratory metabolic intermediates by preimplantation rabbit embryos in vitro. Exptl. Cell Res. **47**, 619–623.
— Krishnan, R. S. (1967a), Amino acid requirements for growth of the rabbit blastocyst in vitro. J. Cellular Physiol. **70**, 155–160.
— — (1967b), A protein fraction from the rabbit uterus that promotes blastulation. J. Cell. Biol. **35**, 30A.
— Levy, J. D. (1964), Action of progesterone as a cleavage inhibitor of rabbit ova in vitro. J. Reprod. Fert, 7, 323–329.
Deanesly, R. (1967), The role of the fertilized egg: reactions in the guinea-pig uterus at ovo-implantation and after thread traumatization. J. Reprod. Fert. **14**, 87.
De Geeter, L. (1954), Etudes sur la structure de l'œuf vierge et les premiers stades de développement chez le Cobaye et le Lapin. Arch. Biol. (Liège) **65**, 363–436.

Denker, H. W., Zur Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. Med. Dissertation, Marburg (in Vorbereitung).
Dettlaff, T. A. (1962), Cortical changes in Acipenserid eggs during fertilization and artificial activation. J. Embryol. Exptl. Morphol. **10**, 1–26.
Dick, Claire, Johns, E. W. (1968), The effect of two acetic acid containing fixatives on the histone content of calf thymus deoxyribonucleoprotein and calf thymus tissue. Exptl. Cell Res. **51**, 626–632.
Dickmann, Z. (1965), Sperm penetration into and through the zona pellucida of the mammalian egg. Ciba Foundation Sympos. on Preimplant. Stages of Pregnancy (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. = Eds.) (London), p. 169–182.
— (1967a), Shedding of the zona pellucida by the rat blastocyst. J. Exptl. Zool. **165**, 127.
— (1967b), Hormonal requirements for the survival of blastocysts in the uterus of the rat. J. Endocrinol. **37**, 455.
— Noyes, R. W. (1960), The zona pellucida at the time of implantation. Fert. Ster. **12**, 310–318.
Eagle, H., Levine, E. M. (1967), Growth regulatory effects of cellular interaction. Nature **213**, 1102–1106.
Edwards, R. G. (1964), Cleavage of one- and two-celled rabbit eggs in vitro after removal of the zona pellucida. J. Reprod. Fert. **7**, 413–415.
Ejsmont-Szumańska, Grażyna (1968), Mucopolysaccharides and glycogen in rat endometrium and vaginal mucosa during the oestrous cycle. Folia Histochem. Cytochem. (Kraków) **6**, 113–132.
Enders, A. C., Schlafke, S. J. (1965), 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.) (London), p. 29–59.
— (1967), A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. Amer. J. Anat. **120**, 185–226.
Fallon, J. F., Austin, C. R. (1967), Fine structure of gametes of Nereis limbata (Annelida) before and after interaction. J. Exper. Zool. **166**, 225–242.
Finn, C. A., McLaren, Anne (1967), A study of the early stages of implantation mice. J. Reprod. Fert. **13**, 259–267.
Fridhandler, L. (1961), Pathways of glucose metabolism in fertilized rabbit ova at various preimplantation stages. Exptl. Cell Res. **22**, 303–316.
— Hafez, E. S. E., Pincus, G. (1957a), Respiratory metabolism of mammalian eggs. Proceed. Soc. Exptl. Biol. Med. **92**, 127.
— — — (1957b), Developmental changes in the respiratory activity of rabbit ova. Exptl. Cell Res. **13**, 132–139.
Gabaeva, N. S. (1966), (Eihüllen bei Säugern, russ.). Arkh. Anat. Gistol. Embriol. **51/8**, 98–112.
Gahrtson, G. (1966), The periodic acid-Schiff reaction in neutrophil leucocytes — influence of fixation and amylase digestion. Histochemie **6**, 112–119.
Garber, Beatrice (1963), Inhibition of glucosamine of aggregation of dissociated embryonic cells. Developm. Biol. **7**, 630–641.
— (1967), Zelldissoziation und -aggregation in der Embryonalentwicklung. Naturwiss. Rundschau **20**, 96–104.
Glenister, T. W. (1963), Observations on mammalian blastocysts implanting in organ culture. Delayed Implantation (Enders, A. C. = Ed.) (Chicago), p. 171–179.
— (1966a), Nidation processes in organ culture. Interntl. J. Fert. **11**, 412–423.
— (1966b), in Diskussion in: Ciba Foundation Study Group No. 23 on Egg Implant. (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. = Eds.) (London), p. 96.

Gothié, S. (1955), Réparatition du P 32 et du S 35 dans le tractus digestif et génital de Lapine. Semaine des Hôpiteaux (Paris) **31**, 3221–3223.
— (1958), Contribution à l'étude de la membrane pellucide de l'œuf de Lapine à l'aide du S^{35}. J. Physiol. (Paris) **50**, 293–294.
— (1960), Répartition du ^{35}auS cours de la nidation après injection de $^{35}SO_4Na_2$. Bull. Soc. Roy. Belg. Gynéc. Obstét. **6**, 625.
Gottschalk, A. (1960), Sialic acids: their molecular structure and biological function in mucoproteins. Bull. Soc. Chem. Biol. **42**, 1387–1393.
— Thomas, M. A. W. (1961), Studies on mucoproteins. V. The significance of N-acetyl-neuraminic acid for the viscosity of ovine submaxillary gland mucoprotein. Biochim. Biophys. Acta **46**, 91–98.
Gottschewski, G. H. M. (1965), Über die Wirkung teratogener Substanzen in der proikogenen bzw. idiogenen Phase der Embryonalentwicklung des Hauskaninchens Oryctolagus cuniculus. Verh. Deutsche Zool. Ges. in Jena 1965, S. 68–94.
— Zimmermann, W. (1961), Nachweis von mütterlichen Proteinen und TMV-Antikörpern in der Dottersackflüssigkeit von Kaninchenfruchtblasen zur Zeit der Nidation. Naturwiss. **48**, 557.
Gräfenberg, E. (1909), Der Antitrypsingehalt des mütterlichen Blutserums während der Schwangerschaft. Münch. Med. Wochenschrift. **56**, 702–704.
— (1910), Beiträge zur Physiologie der Eieinbettung. Z. Geburtshilfe **65**, 1–35.
Greenwald, G. S. (1957), Interruption of pregnancy in the rabbit by the administration of estrogen. J. Exptl. Zool. **135**, 461–482.
— (1967), Species differences in egg transport in response to exogenous estrogen. Anat. Rec. **157**, 163–172.
Gregoire, A. T., Ramsey, H., Adams, A. (1967), The effect of various doses of oestradiol 17-β on glycogen deposition in the rat uterus, cervix and vagina. J. Reprod. Fert. **14**, 231.
Hadek, R. (1965), The structure of the mammalian egg. Interntl. Rev. Cytol. **18**, 29–71.
Hafez, E. S. E., White, I. G. (1967), Endometrial and embryonic enzymes in relation to implantation of the rabbit blastocyst. Anat. Rec. **159**, 273–280.
Hebard, Caroline N., Herold, R. C. (1967), The ultrastructure of the cortical cytoplasm in the unfertilized egg and first cleavage zygote of Xenopus laevis. Exptl. Cell Res. **46**, 553–570.
Heuser, C. H., Streeter, G. L. (1929), 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. Embryol. **20**, 1–30.
Hill, J. P., Tribe, M. (1924), The early development of the cat. Quart. J. Microsc. Sci. **68**, 513–602.
Hill, T. L. (1967), Electric fields and the cooperativity of biological membranes. Proceed. Natl. Acad. Sci. USA **58**, 111–114.
Hillebrandt, W. (1969), Quantitative Beziehungen zwischen den Plasmaorganellen von Oozyte und Ei des Kaninchens. Staatsexamensarbeit, Marburg (unveröffentlicht).
Homburger, F., Bernfeld, P., Tregier, A., Grossman, M. S., Harpel, P. (1963), Endometrial secretions. Ann. N. Y. Acad. Sci. **106**, 683–691.
Hubrecht, A. A. W.. (1902), Furchung und Keimblattbildung bei Tarsius spectrum. Verhand. d. k. Akad. v. Wetensch. t. Amsterdam (Tweede Sect.) **8**, 1–113.
Hübner, K. A. (1955), Histochemische Untersuchungen über Kohlehydrate in Endometrium und Placenta. Zbl. Gynäkol. **77**, 689–697.
Ishida, K. (1954), Cytochemical studies of tubal ova. Tohoku J. Agr. Res. (Sendai) **5**, 1–11.
Ishihara, K. (1964), Release of acid polysaccharides following fertilization of sea urchin eggs. A chemical study of changes in the cell surface. Exptl. Cell Res. **36**, 354–367.

Iwamatsu, T. (1967), On acquisition of developmental capacity in oocytes of the medaka (Oryzias latipes). Ann. Zool. Jap. **40**, 6–19.
Izquierdo, L. (1954), Méthode de fixation de la coloration vitale en bleu de toluidine. Quelques résultats concernant l'œuf du Rat. C. R. Séances Soc. Biol. (Paris) **148**, 1504–1507.
— (1955), Fixation des œufs de Rat colorés vitalement par le bleu de Toluidine. Technique et observations cytologiques. Arch. Biol. **66**, 403–438.
Kemp, M. E., Istock, N. L. (1967), Cortical changes in growing oocytes and in fertilized pricked eggs of Rana pipiens. J. Cell Biol. **34**, 111–122.
Kirby, D. R. S. (1963), The influence of the uterine environment on the development of mouse eggs. J. Embryol. Exptl. Morphol. **10**, 496.
— (1965a), The role of the uterus in the early stages of mouse development. Ciba Foundation Sympos. on Preimpl. Stages of Pregn. (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. = Eds.) (London), p. 325–339.
— (1965b), in Diskussion in: Ciba Foundation Sympos. on Preimplant. Stages of Pregnancy (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. = Eds.) (London), p. 24,25.
— Potts, D. M., Wilson, I. B. (1967), On the orientation of the implanting blastocyst. J. Emryol. Exptl. Morphol. **17**, 527–532.
Kirchner, Chr. (1969), Untersuchungen an uterusspezifischen Glykoproteinen während der frühen Gravidität des Kaninchens Oryctolagus cuniculus. Dissertation, Marburg.
Kordan, H. A. (1967), Localized interfacial forces resulting from implanted plastics as possible physical factors involved in tumor formation. J. Theoret. Biol. **17**, 1–11.
Kraemer, P. M. (1967), Configuration change of surface sialic acid during mitosis. J. Cell Biol. **33**, 197–200.
Krauskopf, Christina (1967), Die protoplasmatischen Systeme in Oozyte und 2-Zellenstadium des Kaninchenes nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Dissertation, Marburg. (= Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Struktur der Oozyte und des 2-Zellenstadiums beim Kaninchen. I. Oozyte; II. Blastomeren. Z. Zellforschung **92**, 275–295 und 296–312 (1968).
Krishnan, R. S., Daniel, J. C. jr. (1967), „Blastokinin": Inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. Science **158**, 490–492.
Krzyzanowski, M. (1966), Purification and some properties of alpha-amylase from rabbit skeletal muscles. Bull. Acad. Pol. Sci., Sér. Sci. Biol. **14**, 675–680.
Kubota, T. (1967), A regional change in the rigidity of the cortex of the egg of Rana nigromaculata following extrusion of the second polar body. J. Embryol. Exptl. Morphol. **17**, 331–340.
Kulangara, A. C. (1961), The origin and function of polysaccharides in the uterine lumen. Yb. Carnegie Inst. Wash. **60**, 432–434.
Lageron, A., Wegmann, R. (1964), Modifications enzymologiques du vagin et de l'utérus de la ratte en périodes normales et sous l'effet de la folliculine et de la progestérone. Ann. Histochim. **9**, 125–135.
Lobel, Bertha L., Weissman, Anne, Levy, Emilia, Shelesnyak, M. C. (1968), Studies on the chemanism of nidation. XXIX. Localization of phosphorylase activity in relation to implantation, steroid synthesis and myometrial adaptation during gestation in the rat. Interntl.. J. Fert. **13**, 33–57.
Lutwak-Mann, Cecilia (1959), Biochemical approach to the study of ovum implantation in the rabbit. Mem. Soc. Endocrinol. **6**, 35–49.
— (1962), Glucose, lactic acid and bicarbonate in rabbit blastocyst fluid. Nature **193**, 653–654.
— (1963), Uterine-blastocyst relationships at the time of implantation: biochemical aspects. Delayed Implantation (Enders, A. E. = Ed.) (Chicago) 293–302.

Lutwak-Mann, Cecilia, (1966), Some physiological and biochemical properties of the mammalian blastocyst. Bull. Schweiz. Akad. Med. Wissensch. **22**, 101–122.

Majki, S., Medda, J., Bose, A. (1967), A study on the surface charge on the differentiating central nervous system in chick. Naturwiss. **54**, 208.

Marcus, G. J., Shelesnyak, M. C. (1967), Studies on the mechanism of nidation. XXVI. Proestrous estrogen as a hormonal parameter of nidation. Endocrinol. **6**, 1038–1042.

Mariano, M. (1967), Histochemical investigation on egg shell polysaccharides in Capillaria hepatica (Bancroft 1918, Capillaridae, Trichuroidea). Acta Histochem. (Jena) **26**, 144–150.

Mayer, G., Duluc, A. (1966), Homo-transplantation et hétérotransplantation intratesticulaires chez le Rat et la Souris de blastocystes en phase de préimplantation et de léthargie. C. R. Acad. Sci. (Paris) **263**, 111–1114.

— Nilsson, O., Reinius, S. (1967), Cell membrane changes of uterine epithelium and trophoblast during blastocyst attachment in the rat. Z. Anat. Entwicklungsgesch. **126**, 43–48.

McGaughey, R. W., Daniel, J. C. jr. (1966), Effect of oestradiol-17 β on fertilized rabbit eggs in vitro. J. Reprod. Fert. **11**, 325–331.

McGeachin, R. L., Gleason, J. R., Adams, M. R. (1958), Amylase distribution in extrapancreatic, extrasalivary tissues. Arch. Biochem. Biophys. **75**, 403—411.

Meyer, K., Bhavanandan, V. P., Yung, D., Lee, L. T., Howe, C. (1967), The keratosulfate-like mucopolysaccharide of chick allantoic fluid. Proceed. Natl. Acad. Sci. USA **58**, 1655–1659.

Mintz, Beatrice (1964a), Formation of genetically mosaic mouse embryos, and early development of „lethal (t^{12}/t^{12}) — normal" mosaics. J. Exptl. Zool. **157**, 273–292.

— (1964b), Gene expression in the morula stage of mouse embryos, as observed during development of t^{12}/t^{12} lethal mutants in vitro. J. Exptl. Zool. **157**, 267–272.

— (1965a), Experimental genetic mosaicism in the mouse. Ciba Foundation Sympos. on Preimplant. Stages of Pregnancy (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. = Eds.) (London), p. 194–207.

— (1965b), in Diskussion in: ebenda, p. 23f.

Molnar, J. (1967), Glycoproteins of Ehrlich ascites carcinoma cells. Incorporations of (^{14}C) glucosamine and (^{14}C) sialic acid into membrane proteins. Biochem. **6**, 3064–3076.

Monesi, V., Salfi, V. (1967), Macromolecular synthesis during early development in the mouse embryo. Exptl. Cell Res. **46**, 632–635.

Mora, P. T., Young, B. G. (1959), Reversible inhibition of enzymes by interaction with synthetic polysaccharide macroanions. Arch. Biochem. Biophys. **82**, 6.

Moser, F. (1939a), Studies on a cortical layer response to stimulating agents in the Arbacia egg. I. Response to insemination. J. Exptl. Zool. **80**, 423–445.

— (1939b), Studies on a cortical layer response to stimulating agents in the Arbacia egg. II. Response to chemical and physical agents. J. Exptl. Zool. **80**, 447–471.

Mulnard, J. (1965a), Aspects cytochimiques de la régulation in vitro de l'œuf de souris après destruction d'un des blastomères du stade II. I. La phosphomonoestérase acide. Bull. Acad. Roy. Méd. Belg., IIe Sér., **5**, 31–67.

— (1965b), Studies of regulation of mouse ova in vitro. Ciba Foundation Sympos. on Preimplant. Stages of Pregnancy (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. = Eds.) (London), p. 123–138.

— (1966), Les mecanismes de la régulation aux premiers stades du développement des Mammifères. Bull. Soc. Zool. Fr. **91**, 253–277.

— (1967), Analyse microcinématographique du développement de l'œuf de souris du stade II au blastocyste. Arch. Biol. (Liège) **78**, 107–138.

— Dalcq, A. M. (1955), Les polysaccharides dans le développement de l'œuf tubaire du Rat. C. R. Séances Soc. Biol. **149**, 836–839.

New, D. A. T. (1966), The culture of vertebrate embryos. (London/New York.)

Nicolas, J. S., Hall, B. V. (1942), Experiments on developing rats. II. The developing of isolated blastomeres and fused eggs. J. Exptl. Zool. **90**, 441.

Nilsson, O. (1967), Attachement of rat and mouse blastocystes onto uterine epithelium. Interntl. J. Fert. **12**, 5–13.

Nordling, S., Vaheri, A., Saxén, S., Penttinen, K. (1965), The effects of anionic polymers on cell attrachement and growth behaviour, with a note on similarity in the effect of fresh human serum. Exptl. Cell Res. **37**, 406–419.

Noyes, R. W. (1952), Fertilization of follocular ova. Fert. Ster. **3**, 1–12.

— Dickmann, Z. (1960), Relationship of ovular age to endometrial development. J. Reprod. Fert. **1**, 186–196.

Nutting, E. F., Sollman, P. B. (1967), Delay of implantation in intact rats treated with progestins. Acta Endocrinol. **54**, 8–18.

Odor, D. Louise, (1965) ‚The ultrastructure of unilaminar follicles of the Hamster ovary'. Amer. J. Anat. **116**, 493—522.

Okada, Y., Murayama, F. (1966), ‚Requirement of calcium ions for the cell fusion reaction of animal cells by HVJ'. Exptl. Cell. Res. **44**, 527—551.

Orsini, Margaret Ward (1965), ‚Factors affecting loss of the zona pellucida in the hamster'. J. Anat. **99**, 822.

— McLaren, Anne (1967), Loss of the zona pellucida in mice, and the effect of tubal ligation and ovariectomy. J. Reprod. Fert. **13**, 485–499.

Parvis, V. P., Rossi, G. (1966), Données histochimiques à propos de la sécrétion de la trompe utérine humaine. C. R. Ass. Anat. **133**, 757–762.

Pasteels, J. J. (1966), La réaction corticale de fécondation de l'œuf de Nereis diversicolor, étudiée au microscope électronique. Acta Embryol. Morphol. Exptl. (Palermo) **9**, 155–163.

Petzoldt, U., Untersuchungen über die Ionenverhältnisse in Uterus und Blastozyste des Kaninchens (Oryctolagus cuniculus). Dissertation, Marburg (in Vorbereitung).

Peyre, A., Laporte, P. (1966a), Evolution des acides sialiques épididymaires chez le Rat impubère et adulte. C. R. Acad. Sci. (Paris) **263**, 1872–1875.

— — (1966b), Action de la testostérone et de l'oestradiol sur les sialo-protéines de la queue de l'épididyme de Rat impubère castré. C. R. Soc. Biol. **160**, 2178 .

Piko, L. (1967), Repeated fertilization of fertilized rat eggs after treatment with versene (EDTA). Amer. Zool. **1**, 467.

Porter, D. G. (1967), Observations on the development of mouse blastocycts transferred to the testis and kidney. Amer. J. Anat. **121**, 73–85.

Potts, M. (1966), The attachement phase of ovoimplantation. Amer. J. Obstet. Gynec. **96**, 1122–1128.

Pratt, R. M. jr., Daniel, J. C. jr. (1967), Structural specificity of progesterone for inhibiting cleavage of the rabbit egg in vitro. Steroids **9**, 257–262.

Rambourg, A., Leblond, C. P. (1967), Electron microscope observations on the carbohydrate rich cell coat present at the surface of cells in the tar. J. Cell Biol. **32**, 27–53.

Reinius, S. (1967), Ultrastructure of blastocyst attachement in the mouse. Z. Zellforsch. **77**, 257–266.

Rennie, P., Davies, J. (1965), Implantation in the rabbit following administration of 20 α-hydroxypregnen-3-one and 20 β-hydroxypregnen-3-one. Endocrinol. **76**, 535–537.

Ringler, I. (1961), The composition of rat unterine luminal fluid. Endocrinol. **68**, 281–291.

Rosenbaum, R. (1958), Histochemical observations on the cortical region of the oocytes of Rana pipiens. Quart. J. Microsc. Sci. **99**, 155–169.

Rothschild, Lord, Swann, M. M. (1951), The conduction time of the block to polyspermy in the sea-urchin egg. Exptl. Cell Res. **2**, 137.

Rubin, H. (1966), Fact and theory about the cell surface in carcinogenesis. Major Problems in Developmental Biology (Locke, M. = Ed.) = 25. Sympos. Soc. Developm. Biol. (New York, London), p. 315–337.

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

— (1952), The cell surface in relation to fertilization. Sympos. Soc. Exptl. Biol. **6**, 39–88.

— Immers, J. (1966), The animalizing action of trypsin on embryos of the sea urchin (Psammechinus miliaris, Paracentrotus lividus.) Arch. Biol. (Liège) **77**, 365–410.

Rüsse, I. (1967), Samenzellen der Säugetiere zwischen Begattung und Befruchtung. Naturwiss. **54**, 501–505.

Sanford, Barbara H. (1967), An alteration in tumor histocompatibility induced by neuraminidase. Transplantation **5**, 1273–1279.

Schwick, H. G. (1963), Chemisch-entwicklungsphysiologische Beziehungen von Uterus zu Blastocyste des Kaninchens Oryctolagus cuniculus. Dissertation, Marburg (Roux' Arch. Entwicklungsmech. **156**, 283–343 1965).

Seidel, F. (1936), Entwicklungsphysiologie des Insektenkeimes. Verh. Deutsch. Zool. Ges. (1936), 291–336.

— (1952a), Die Entwicklungspotenzen einer isolierten Blastomere des Zweizellenstadiums im Säugetierei. Naturwiss. **39**, 355–356.

— (1952b), Regulationsbefähigung der embryonalen Säugetierkeimscheibe nach Ausschaltung von Blastemteilen mit einem UV-Strahlenstichapparat. Naturwiss. **39**, 553–554.

— (1954), Das entwicklungsphysiologische Verhalten des Säugerkeimes beim Beginn seiner Uteruswanderung. Verh. Deutsch. Zool. Ges. (Tübingen 1954), 371–380.

— (1960a), Die Entwicklungsfähigkeiten isolierter Furchungszellen aus dem Ei des Kaninchens. Roux' Arch. Entwicklungsmech. **152**, 43–130.

— (1960b), Körpergrundgestalt und Keimstruktur. Eine Erörterung über die Grundlagen der vergleichenden und experimentellen Embryologie und deren Gültigkeit bei phylogenetischen Überlegungen. Zool. Anzeiger **164**, 245–305.

— (1969), Entwicklungspotenzen des frühen Säugetierkeimes. Arbeitsgemeinschaft für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen, Westdeutscher Verlag Köln.

Sela, M., Katchalski, E. (1959), Biological properties of poly-α-amino acids. Advan. Protein Chem. **14**, 391–478.

Shelesnyak, M. C., Kraicer, P. F. (1963), The role of estrogen in nidation. In: Delayed Implantation (Enders, A. C. = Ed.), p. 265–279.

Sheridan, J. D. (1966), Electrophysiological study of special connections between cells in the early chick embryo. J. Cell Biol. **31**, C 1–5.

Silagi, Selma (1963), Some aspects of the relationship of RNA metabolism to development in normal and mutant mouse embryos cultivated in vitro. Exptl. Cell Res. **32**, 149–152.

Da Silva Sasso, W. (1959), Existence of hyaluronic acid at the zona pellucida of the rabbit's ovum. Acta Anat. (Basel) **36**, 352–357.

Smithberg, M. (1953), The effect of different proteolytic enzymes on the zona pellucida of mouse ova. Anat. Rec. **117**, 554.

Soupart, P., Noyes, R. W. (1964), Sialic acid as a component of the zona pellucida of the mammalian ovum. J. Reprod. Fert. **8**, 251–253.

Srivastava, P. N., Adams, C. E., Hartree, E. F. (1965), Enzymic action of acrosomal preparations on the rabbit ovum in vitro. J. Reprod. Fert. **10**, 61–67.

Stegner, H. E. (1967), Die elektronenmikroskopische Struktur der Eizelle. (Berlin, Heidelberg, New York) = Ergebnisse der Anat. u. Entwicklungsgesch., Bd. **39**, H. 6.

— Wartenberg, H. (1961a), Elektronenmikroskopische und histotopochemische Befunde an menschlichen Eizellen. Arch. Gynäkol. **196**, 23–34.

— — (1961b), Elektronenmikroskopische und histotopochemische Untersuchungen über Struktur und Bildung der Zona pellucida menschlicher Eizellen. Z. Zellforschung **53**, 702–713.

Sugawara, S., Hafez, E. S. E. (1967a), Effect of steroid hormones on biochemical characteristics of blastocysts in overiectomized rabbits. Anat. Rec. **158**, 281.

— — (1967b), Elektrophoretic patterns of proteins in the blastocoelic fluid of the rabbit following ovariectomy. Anat. Rec. **158**, 115–119.

Szollosi, D. (1967), Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. Anat. Record **159**, 431–446.

Takashima, R., Mori, S., Kawano, M. (1955), The role of hyaluronidase in fertilization. Bull. Exptl. Biol. **5**, 75–81.

Tarkowski, A. K. (1959), Experiments on the deveopment of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature **184**, 1286–1287.

— (1965), Embryonic and postnatal development of mouse chimeras. Ciba Foundation Sympos. on Preimplant. Stages of Pregnancy (Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. = Eds.) (London), p. 183–193.

— Wróblewska Joanna (1967), Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. J. Embryol. Exptl. Morphol. **18**, 155–180.

Thiele, H. (1967), Prinzip einer Strukturbildung. Naturwiss. **54**, 136–139.

Thomson, J. L. (1967), Effect of inhibition of carbohydrate metabolism on the development of preimplantation mouse embryos. Exptl. Cell Res. **46**, 252–262.

— Brinster, R. L. (1966), Glycogen content of preimplantation mouse embryos. Anat. Rec. **155**, 97–102.

Tondeur, M. (1961), Recherches sur la nature des granulations imprégnables par l'osmium dans les œufs de petits mammifères. Arch. Biol. **72**, 331–411.

Trelstad, R. L., Revel, J.-P., Hay, E. D. (1966), Tight junctions between cells in the early chick embryo as visualized with the electron microscope. J. Cell Biol. **31**, C 6–10.

— Hay, E. D., Revel, J.-P. (1966), Organization and fine structure of the primitive tissues in the chick embryo. J. Cell Biol. **31**, 135 A.

— — — (1967), Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. Developm. Biol. **16**, 78–106.

Vaes, G., de Meyer, R. (1957), Etude histochimique du glycogène utérin chez la Lapine; ses variations au cours du diabète alloxanique et sous l'action de la cortisone. Ann. Endocrinol. **18**, 828–840.

Vazquez-Nin, G. H., Sotelo, J. R. (1967), Electron microscopic study of the atretic oocytes of the rat. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **80**, 528.

Vilter, V. (1966), Histochimie de l'oviducte mature du Triturus alpestries L. de montagne, C. R. Soc. Biol. **160**, 2245.

— (1967a), Histochimie des gaines ovulaires chez le Triton alpestre. C. R. Soc. Biol. **161**, 63.

— (1967b), Histologie de l'oviducte chez Salamandra atra mature, Urodèle totalement vivipare de haute montagne. C. R. Soc. Biol. **161**, 260.

Voss, H. (1963), Topochemischer Nachweis von Glykogen im perivitellinen Raum des Froscheies (Rana fusca Rösel). Acta Histochem. (Jena) **15**, 347–350.

Walaas, O. (1952), Effect of oestrogens on the glycogen content of the rat uterus. Acta Endocrinol. **10**, 175–192.

WALES, R. G., WHITTINGHAM, D. G. (1967), A comparison of the uptake and utilization of lactate and pyruvate by one- and two-cell mouse embryos. Biochim. Biophys. Acta **148**, 703–712.

WARTENBERG, H. (1956), Topochemische Untersuchungen an den Ovarialeiern von Xenopus laevis und Rana fusca. Acta Histochem. (Jena) **3**, 25–71.

WATTERS, C. D. (1967), A new technique for the dissociation of embryonic cells. J. Cell Biol. **35**, 139A–140A.

WEISS, L. (1967), Studies of cell deformability. IV. A possible role of calcium in cell contact phenomena. J. Cell Biol. **35**, 347–356.

WESSEL, M. (1967), Untersuchungen zum Genitalzyklus der Hausmaus, Mus musculus Linné 1758, und Entwurf einer Normentafel der Embryonalentwicklung. Zool. Jb. Anat. **84**, 375–424.

WESTMANN, A. (1930), Study of the function of the mucous membrane of the uterine tube. Acta Obstet. Gynec. Scand. **10**, 288–298.

WHITTINGHAM, D. G. (1966), A critical phase in the cultivation of mouse ova in vitro, J. Cell. Biol. **31**, 123A.

WINNICKI, A. (1967), Plasticity and hardening of the rainbow-trout egg membranes. Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Sci. Biol. **15**, 779–783.

— BARTEL, R. (1967), The effect of limited water intake on the strength of egg coverings in the salmonid fishes. Zool. Polon. **17**, 59–72.

WITSCHI, E., GRAVES, A. P. (1946), Deutoplasmic substances in the egg of the golden hamster and their reduction during the preimplantation stage of development. Anat. Rec. **94**, 360.

WOLPERT, L., GUSTAFSON, T. (1967), Zellbewegung und Zellkontakt bei der Seeigel-Morphogenese. Endeavour **26**, 85–90.

— GINGELL, D. (1968), Cell surface membrane and amoeboid movement. Aspects of Cell Motility. Sympos. Soc. Exptl. Biol. (Cambridge) **22**, 169–198.

YANAGIDA, M., NODA, H. (1967), Cell contact and cell surface properties in the cellular slime mold, Dictyostelium discoideum. Exptl. Cell Res. **45**, 399–414.

YANAGISAWA, K., LOOMIS, W. F. jr., SUSSMAN, M. (1967), Developmental regulation of the enzyme UDP-galactose polysaccharide transferase. Exptl. Cell Res. **46**, 328–334.

YOSHINAGA, K., ADAMS, C. E. (1967), Reciprocal transfer of blastocysts between the rat and rabbit. J. Reprod. Fert. **14**, 325–328.

ZIMMERMANN, W. (1960), Die Wasserstoffionenkonzentration im weiblichen Genitaltrakt und in der Keimblase vor, während und nach der Nidation. Verh. Deutsch. Zool. Ges. i. Bonn, 143–149.

— (1966), Die Bedeutung der Nidation beim Säugetier für die immunologische Toleranz zwischen Mutter und Fet. Naturwiss. Rundschau **19**, 18–21.

— (1967), Die Beeinflußbarkeit der Trächtigkeit des Kaninchens durch eine Immunreaktion. Verh. deutsch. Zool. Ges. i. Göttingen = Zool. Anz. Suppl. **30**, 285–289.

— GOTTSCHEWSKI, G. H. M., FLAMM, H., KUNZ, CH. (1963), Experimentelle Untersuchungen über die Aufnahme von Eiweiß, Viren und Bakterien während der Embryogenese des Kaninchens. Developm. Biol. **6**, 233–249.

ZOTIN, A. I. (1961), Fizjologija vodnovo obmena u zarodysej ryb i kruglorotych. (Physiologie des Wasserhaushalts der Keime von Fischen und Cyclostomen, russ.), (Moskva).

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

DRUCKFEHLERBERICHTIGUNG

S. 153: Abb. 15 b: 230 x.

S. 155: untere Tabelle:

Niere, Kaninchen	Sialomuzin
Colon, Maus, Ratte, Kaninchen	Sulfomuzin

S. 167: letzter Absatz, Zeile 4: Trophoblasten

S. 169: letzter Absatz, Zeile 4: (vgl. Abb. 40, 46).

S. 176: 6. Zeile von oben:
(Tabelle 4, V 9; 5, V 3; Abb. 18, 26)

S. 184: Abb. 33, Unterschrift: 2. Zeile: Entwässerung
3. Zeile: 90 x.

S. 232: Tab. 8: 6. und 7.: alle Werte 1 Zeile tiefer setzen:

6.	Trophoblast nahe Keimscheibe	++	++	...
7.	abembryonal	(+) -+	+	...

S. 238: 20. Zeile von unten (BÖVING):
- (1962), Anatomical analysis...

S. 244: 26. Zeile von oben (SPICER, LEPPI, STOWARD):
hydrate-rich

S. 245: 9. Zeile von unten (ZIMMERMANN 1964):
...Hyg., 1 Orig., 194, 253-266.

S. 267: 1. Absatz, vorletzte Zeile:
..., daß er zerstört wird oder in stark...

S. 282: 17. Zeile von unten: Abb. 23 a).

S. 284: 10. Zeile von oben: Wesentliche Schritte...

S. 292: 5. Zeile von unten: S. 185, 187, 200 f.).Von...

S. 302: 5. Zeile von oben (GOTHIE):
- (1960), Répartition du ^{35}S au cours...

S. 305: 19. Zeile von oben (ORSINI): J.Anat. 99, 922.