

## Immunhistochemischer Nachweis des 26k-Proteins der gap junctions im Uterusepithel des Kaninchens in Abhängigkeit von der Reproduktionsphase

E. WINTERHAGER<sup>1</sup>, R. DERMIETZEL<sup>2</sup>, F. BRÜMMER<sup>3</sup> und H.-W. DENKER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Abteilung Anatomie der RWTH Aachen, <sup>2</sup>Abteilung Anatomie der Universität Essen, <sup>3</sup>Biologisches Institut der Universität Stuttgart, BRD

Das Uterusepithel von Kaninchen zeigt in der Frühphase der Gravidität eine mit konventionellen morphologischen Methoden gut untersuchte Transformationsphase (DAVIES und HOFFMAN, 1975). Dagegen ist die morphologische Umstrukturierung, die der Teil des Cavumepithels zeigt, der der Blastozyste unmittelbar anliegt und ab 6<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Tage post coitum (d p. c.) die sog. Implantationskammer bildet, wenig untersucht. Wir konnten bereits zeigen, daß es speziell in dieser Implantationskammer zur Ausbildung großer und vor allen Dingen zahlreicher gap junctions zwischen den Uterusepithelzellen kommt (WINTERHAGER et al., 1985). Epithelzellen nichtgravidier Tiere und auch pseudogravidier Tiere in derselben hormonellen Phase (jedoch blastozystenfrei) bilden hingegen solche Kommunikationsstrukturen nur in äußerst geringem Maße aus. Mit Hilfe intrazellulärer Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes „Lucifer yellow“ konnte gezeigt werden, daß es sich bei diesen gap junctions in der Implantationskammer um offene Kanäle handelt, da der Farbstoff in abgestufter Intensität in die anderen Zellen übertritt. Wir finden in allen untersuchten Reproduktionsphasen eine gut Korrelation zwischen dem Auftreten morphologisch nachweisbarer gap-junction-Strukturen und dem Farbstoff-Kopplungsmuster zwischen den Uterusepithelzellen (BRÜMMER et al., 1985).

Das Endometrium der Implantationskammer ist stark gegliedert und zeigt morphologische Unterschiede auf: Plazentar-, Paraplazentar- und Obplazentarwülste bzw. oberflächliche und tiefere Kryptenabschnitte. Bei Gefrierbruchuntersuchungen sowie intrazellulären Injektionen ist eine eindeutige Zuordnung und die Erstellung eines Verteilungsmusters der gap junctions innerhalb dieser Implantationskammer nicht möglich. Wir haben daher die Untersuchungen mit einem histochemischen Ansatz, die die Auswertung großflächiger Schnitte durch die ganze Implantationskammer gestattet, weitergeführt. Dazu wurde ein monoklonaler Antikörper (Prof. WILLECKE, Zellbiologie Essen) gegen eine Proteinuntereinheit der gap junction, das sog. 26k-Protein (JANSSEN-TIMMEN et al., zum Druck eingereicht), in der indirekten Immunfluoreszenztechnik angewandt. Auch mit Hilfe dieser Methode zeigt sich, daß nichtgravidier Tiere wie auch pseudogravidier Tiere keine Reaktion aufweisen. Bei graviden Tieren wird jedoch ab 6 d p. c. eine typische punktuelle Reaktion auf den lateralen Membranen der Uterusepithelzellen in der sich ausformenden Implantationskammer nachweisbar. Dies ist ein Tag früher, als mit Hilfe der Gefrierbruchmethode und der intrazellulären Injektion von „Lucifer yellow“ gap junctions nachweisbar werden. Die Immunfluoreszenz ist im Uterusepithel nur in unmittelbarer Nähe der Blastozyste zu erkennen. Im Uterusepithel der angrenzenden blastozystenfreien Segmente ist die Reaktion negativ. Zum Implantationszeitpunkt (7 d p. c.) ist eine ausgeprägte Fluoreszenz im Epithel der gesamten Implantationskammer charakteristisch, wobei kein Unterschied in der Reaktion zwischen den Zellen auf dem Plazentar-, dem Paraplazentar- oder dem Obplazentarwulst festzustellen ist. Interessanterweise finden wir jedoch nie eine Markierung in den tiefen Kryptenabschnitten. Auch im Gefrierbruch

weisen die Zellen der tiefen Kryptenabschnitte keine Gap-junction-Strukturen auf. Diese Zellpopulation der tiefen Krypten wird auch in späteren Stadien nicht in den weiteren Umformungsprozeß der Uterusepithelzellen zu dem typischen Endometrium der Implantationskammer (veränderte Kern-Plasma-Relation, Kernmorphologie sowie symplasmatische Umwandlungen des Epithels) mit einbezogen. In den blastozystenfreien Segmenten finden wir 7 d p. c. im Oberflächenepithel eine intensive, relativ homogene Immunfluoreszenz im Gegensatz zu Gefrierbruchuntersuchungen und Farbstoffkopplung, die nur sporadisch eine Kopplung der Zellen aufzeigen konnten.

Diese Ergebnisse, die mit den drei Methoden gewonnen wurden, lassen folgende Interpretation zu: Die Uterusepithelzellen des Kaninchens sind außerhalb der Gravidität, in der frühen Pseudogravidität und der Präimplantationsphase der Gravidität nicht durch gap junctions miteinander verbunden. Die spezifische Ausbildung dieser Kopplungsstrukturen in der Implantationskammer muß auf ein Signal zurückgeführt werden, das von der implantationsbereiten Blastozyste ausgeht. Die stoffliche Natur des Signals ist unbekannt. Interessant ist, daß es sich um eines der frühesten bisher bekannten embryonalen Signale zu handeln scheint, die eine eindeutige Reaktion auf der maternalen Seite hervorrufen. Dieses Signal muß schon 6 d p. c. ausgesendet werden, da der immunhistochemische Nachweis des bereitgestellten Gap-junction-Proteins schon einen Tag vor der Implantation gelingt. Die Antwort auf dieses Signal scheint sich kontinuierlich von der Implantationskammer aus auf die blastozystenfreien Segmente auszubreiten. Herauszuheben ist auch, daß anscheinend nicht alle Zellen auf das Signal mit einer Bildung dieses Proteins reagieren können (z. B. die Zellen der tiefen Krypten), d. h. daß die Zellen offenbar in einem bestimmten Determinations- oder Differenzierungszustand sein müssen.

- BRÜMMER, F., WINTERHAGER, E., DENKER, H.-W., HÜLSER, D. F.: Cell-cell communication via gap junctions in rabbit uterine epithelium related to implantation. *Europ. J. Cell Biol. Suppl.* 7 (Vol. 36), 11 (1985)
- DAVIES, J., HOFFMAN, L. H.: Studies on the progestational endometrium of the rabbit. II. Electron microscopy, day 0 to 13 of gonadotrophin-induced pseudopregnancy. *Am. J. Anat.* 142, 335-366 (1975)
- JANSSEN-TIMMEN, U., TRAUB, O., DERMIETZEL, R., WILLECKE, K.: Reduced number of gap junctions in rat hepatocarcinomas detected by monoclonal antibody (zum Druck eingereicht)
- WINTERHAGER, E., BRÜMMER, F., DENKER, H.-W.: Gap junction formation in the uterine epithelium in response to embryo recognition. *Europ. J. Cell Biol. Suppl.* 7 (Vol. 36), 74 (1985)

Anschrift: Dr. E. WINTERHAGER, Abteilung Anatomie der RWTH Aachen, Melatener Straße 211, D - 5100 Aachen.