

## Enzymatischer Abbau der Embryonalhüllen des Lanzettfischchens, *Branchiostoma lanceolatum*, während des Schlüpfens

Hatching through Enzymatic Breakdown of the Embryonic Coats in the Lancelet, *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalochordata)

J. Manuel Denucé

Zoologisch Laboratorium I, Katholieke Universiteit, Toernooiveld, 6525 ED Nijmegen, Nederland

Z. Naturforsch. **51c**, 113–118 (1996); received September 8/October 23, 1995

*Branchiostoma lanceolatum*, *Amphioxus*, Hatching Enzyme, Metalloproteinase

A study was made of the hatching process of the lancelet, *Branchiostoma lanceolatum* (*Amphioxus*), under laboratory conditions. Embryos in the early neurula stage (5 to 6 pairs of somites) escape through a hole made in the fertilization envelope, following intensive rotatory movements and partial digestion of the envelope. Using the chromogenic substrate Hide Powder Azure (HPA) at pH 8.0, proteolytic activity was detected in the hatching medium. The effect of various protease inhibitors was investigated. Whereas the activity was only slightly affected by inhibitors of trypsin, chymotrypsin or thiol proteases, chelating agents such as EDTA and 1,10-phenanthroline prevented the degradation of HPA, as well as the breakdown of the vitelline membrane of alcohol fixed oocytes by the protease from hatching fluid. These data suggest the presence of a metalloprotease in the hatching medium. How far this enzyme can be compared with hatching enzymes found in echinoderms and fishes (where they have been identified as matrix degrading metalloproteases), awaits further study of the lancelet enzyme, including its isolation and purification.

### Einleitung

Das von dem deutschen Zoologen P.S.Pallas 1774 entdeckte Lanzettfischchen zählte zuerst zu den Weichtieren oder Mollusken. Später wurde es als einziger Vertreter dem Unterstamm der Akranier (Schädellosen) zugeordnet. Lange hat man *Branchiostoma* (oder *Amphioxus*, wie das Tier meistens in der embryologischen Literatur genannt wird) als direkten Vorfahren der Wirbeltiere betrachtet. Gegen enge phylogenetische Beziehungen zu anderen Chordaten, insbesondere den Vertebraten, sprechen jedoch eine Reihe von Organreduktionen und Spezialisierungen. Die deskriptive Embryologie von *Branchiostoma* hat viele Jahre hindurch das embryologische Schrifttum dominiert. Die Monographie von Conklin (1932) nimmt darin eine zentrale Stelle ein. In der stürmischen Entwicklung der chemischen Embryologie in den dreißiger und vierziger Jahren wird merkwürdigerweise *Branchiostoma* nur in seltenen Fällen als Versuchstier benutzt, im Gegensatz zu Amphibien, Echinodermen und Säuge-

tieren. Neuerdings tritt in der Literatur eine zunehmende Anzahl molekulargenetischer Arbeiten in den Vordergrund. Sie befassen sich an erster Stelle mit Homologien zwischen Vertebraten- und *Amphioxus*hirnen, mit dem Vorkommen von homeotischen Genen als Ausgangspunkt. Von diesen Hoxgenen ist bekannt, daß sie die Identität und Reihenfolge der Körpersegmente bestimmen. Merkwürdigerweise enthält das *Amphioxus*genom nur eine Hoxengruppe, die als Archetyp der Hoxengruppen der modernen Vertebraten gedeutet wird (Garcia-Fernandez und Holland, 1994; Carroll, 1995).

Im Laufe seiner Entwicklung zeigt der Embryo des Lanzettfischchens eine bedeutende Volumenvergrößerung, die sich insbesondere ab der Neurula bemerkbar macht. In diesem Stadium wächst der Embryo in der Länge, schlüpft aus den Embryonalhüllen und nimmt allmählich die schlanke Gestalt der Larve an. Im Frühsommer 1994 ist uns während videomikroskopischer Aufnahmen der Entwicklung aufgefallen, daß die geschlüpften Neurulae leere Hüllen hinterlassen, die nur an bestimmten Stellen Öffnungen aufzeigen. Diese Beobachtung, sowie der Nachweis von proteolyti-

Sonderdruckanforderungen an Prof.J.M.Denucé.

0939–5075/96/0100–0113 \$ 06.00 © 1996 Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. All rights reserved.

D



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

scher Aktivität im Schlüpfmedium, könnte ein Indiz dafür sein, daß Lanzettfischchen ein Schlüpfenzym produzieren, womit sie sich im fortgeschrittenen Gastrula- oder Neurulastadium von den umgebenden Hüllen befreien. Es schien deshalb angebracht den Schlüpfprozeß und die mögliche Beteiligung von Enzymen, im Lichte der Typenverwandtschaft der Akranier zu den übrigen Chordatieren, einschließlich der Vertebraten, näher zu untersuchen.

Die Vermutung, daß das Schlüpfen bei *Branchiostoma* enzymatisch verläuft, konnte bestätigt werden. Außerdem geht aus Versuchen mit Inhibitoren hervor, daß das Schlüpfenzym Eigenschaften einer Metallprotease besitzt.

## Material und Methoden

### Eier und Embryonen

Die Experimente wurden im Mai und Juni an der Meeresstation der Biologischen Anstalt Helgoland durchgeführt. Adulte Exemplare von *Branchiostoma lanceolatum* (Länge: 4.5 bis 5.0 cm) wurden am Helgoländer Fangplatz, etwa 5 Seemeilen nordöstlich der Insel, gesammelt und sofort in gläsernen Behältern mit frischem Seewasser und einem Bodenbelag von "Amphioxusgrund" untergebracht. Die Wassertemperatur war durchschnittlich 12–13°C. Als Futter dienten zum Teil Flagellaten der Gattung *Dunaliella*, zum Teil Detritus und Plankton, das durch das 75 µm Sieb hindurchgeht. Durch eine äußerliche Beobachtung der Gonaden konnte man deutlich unreife von reifen Exemplaren trennen. Letztere wurden in kleineren, durchlüfteten Becken bei Zimmertemperatur (17–20°C) gebracht und normalem Tageslichtwechsel ausgesetzt, zwecks Gewinnung der Eier oder Embryonen. Für die Bestimmung des jeweiligen Entwicklungsstadiums diente die ausführliche Beschreibung von Conklin (1932) für *B. lanceolatum* aus dem Golf von Neapel, wie auch die summarische Tabelle von Drach (1948), die übrigens zum größten Teil an Conklin anlehnt. Unseres Wissens nach liegen für Embryonen des Lanzettfischchens aus der südlichen Nordsee keine genauen Altersbestimmungstabellen vor. Der Zeitpunkt des Abblaus konnte nur annähernd kalkuliert werden (zwischen 9 und 11 Uhr nachts). Eine erste Eiablage fand meistens am ersten oder

zweiten Tag nach dem Fangen statt. Sie wiederholte sich nur einmal.

### Lebendbeobachtungen

Der Fortschritt der Embryogenese, insbesondere das Verhalten der schlüpfreifen Embryonen, wurde an einem Olympus Mikroskop BH-2 studiert. Die Embryonen wurden zu diesem Zweck in flache Mikroküvetten übergeführt. Zusätzlich wurden videomikroskopische Aufnahmen gemacht (Sony CCD Videocamera model XC-711 P, in Kombination mit einem Panasonic stereo video cassette recorder NV-F 70 HQ).

### Gewinnung des Schlüpfmediums

Embryonen im späten Gastrulastadium wurden 3–4 mal in filtriertem Seewasser gewaschen. Anhand von Proben die in gewissen Zeitabständen genommen wurden, wurde die Entwicklung unter dem Binokular verfolgt. Kurz vor Erreichen des Neurulastadiums wurde die überstehende Seewassermenge durch Dekantierung oder Absaugen bis zu einer 1 cm hohen Schicht reduziert, einem Endvolumen von etwa 40–50 ml entsprechend. Nach erfolgtem Schlüpfen wurden die Embryonen durch Filtrierung vom Schlüpfmedium getrennt. Letzteres wurde bis auf Weiteres im Kühlschrank oder tiefgefroren aufbewahrt.

### Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Der Nachweis von proteolytischen Enzymen im Schlüpfmedium wurde mit Hide Powder Azure (HPA) (Calbiochem) als Substrat vorgenommen. Dieses Substrat besteht aus einem kollagenreichen Rinderhautpräparat, das mit Remazol Brilliant Blau markiert ist. Es hat sich in früheren Arbeiten herausgestellt (Denucé und Formisano, 1982; Paulij *et al.*, 1992) daß bei Verwendung von HPA die Spaltwirkung von verschiedenen Schlüpfenzymen ungewöhnlich hoch ist. Fünf Milligramm dieses Substrats wurden mit 1.5 ml nichtkonzentriertem Schlüpfmedium versetzt. Nachdem durch Zugabe von Borsäure-Kaliumchlorid-Natronlauge (Merck'sche Standardlösung) ein pH-Wert von 8.0 erreicht war, wurde im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente filtriertes Seewasser. Nach 5 Stdn. wurde die Reaktion durch Abkühlung im Eisbad sistiert. Die Spaltung des chromo-

genen Substrats unter Freisetzung einer blauen Farbe wurde durch Messung der optischen Durchlässigkeit gegenüber dem Blindwert bei 578 nm bestimmt.

Zwecks Charakterisierung der Schlüpfprotease wurden die nachfolgenden Hemmstoffe dem Versuchsansatz zugefügt: Chymostatin (eine Mischung von A-, B- und C-Komponenten), Leupeptin hemisulfat, N $\alpha$ -Tosyl-L-lysinchloromethylketon (TLCK), Antipain (38 600 E/mg), 1,10-Phenanthrolin, N-Äthylmaleimid, Äthylendiamintetraessigsäure Na-Salz (EDTA), Trypsininhibitor aus Sojabohnen (SBTI), (ca. 35 E/mg) und Kallikrein-Trypsin-Inhibitor (Trasylo<sup>®</sup>1, (6600 E/mg). Die Molaritäten bzw. Konzentrationen sind aus Tab. I ersichtlich.

#### Nachweis von Schlüpfenzym-Aktivität

In 80-proz. Alkohol fixierte, unbefruchtete Eier von erwachsenen Exemplaren wurden nach wiederholtem Spülen in filtriertem Seewasser in flachen Mikroküvetten mit Schlüpfmedium bei 20° inkubiert, mit oder ohne Proteaseinhibitoren. Der Abbau, bzw. die Verhinderung des Abbaus der Dottermembran als natürlichem Substrat wurde mikroskopisch verfolgt und in regelmäßigen Zeitabschnitten auf Videoband aufgenommen. Außerdem wurden auch lebende Neurulae der Einwirkung des Schlüpfmediums ausgesetzt.

### Ergebnisse

#### Das Schlüpfen der Embryonen

Bei mikroskopischer Betrachtung findet man, daß die Mehrzahl der Embryonen im frühen Neurulastadium schlüpft. Ausnahmsweise verlassen die Embryonen die Hüllen schon im späten Gastrulastadium. Daß der Schlüpfvorgang nahe ist, wird durch rotierende Bewegungen angekündigt. Die Neurulae drehen sich erst sehr langsam, später aber erheblich schneller rund um die Längsachse, mit Hilfe der ektodermalen Zilien, während mit dem Vorderende nahezu ununterbrochen gegen die innere Seite der Befruchtungsmembran gedrückt wird. An einer bestimmten Stelle reißt die Hülle auf und die Neurula fängt an, frei herumzuschwimmen. Da die Hüllen der

schlüpfreifen Frühneurula durchscheinend sind und in diesem Stadium jede Pigmentierung fehlt, lassen sich einzelne Strukturen gut identifizieren, wie aus Abb. 1 ersichtlich wird. Fünf bis 6 Paar Somiten haben sich entwickelt. Die beiden vordersten Somiten zeigen schon Cölomhöhlen. Die Anlage der Chorda ist schwer zu sehen, da sie von den Somiten verdeckt wird. Dagegen läßt sich der Urdarm (Archenteron) ohne Weiteres erkennen. Ein aktiver Nahrungserwerb ist jedoch erst nach der Bildung des linksseitigen Larvenmundes möglich. Ein dorsaler Fortsatz des Urdarmes liegt vor den ersten Segmenten. Aus ihm entstehen später das Räderorgan sowie die Hatschek'sche Grube. Störungen des Schlüpfvorganges, wie Steckenbleiben von halbgeschlüpften Embryonen, wurden nie beobachtet.

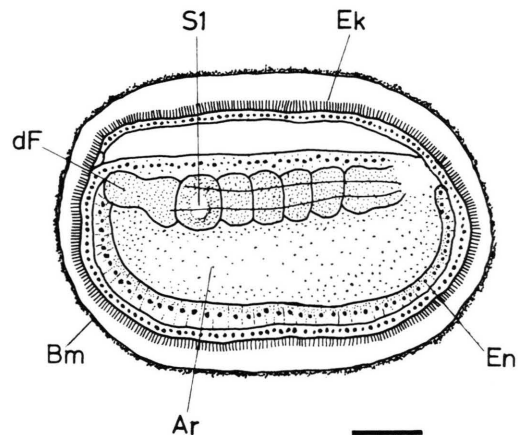


Abb. 1. Schlüpfreife Neurula von *Branchiostoma lanceolatum* (Seitenansicht). Ar Archenteron (Urdarm); Bm Befruchtungsmembran; dF dorsaler Fortsatz; Ek Ektoderm mit Cilien; En Entoderm; S1 erster Somit (Urwirbel). Maßstrich = 30µm.

#### Proteasen im Zuchtmedium

In der Kulturflüssigkeit von zwei verschiedenen Gelegen konnte nach erfolgreichem Schlüpfen proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. HPA erwies sich als ein sehr empfindliches Substrat, da bei pH 8.0 schon nach etwa 1 Std eine deutliche Blaufärbung auftrat. Kontrollansätze mit Seewasser zeigten keinerlei proteolytische Aktivität. Die Enzymaktivität in der Kulturflüssigkeit wurde weder durch Einfrieren, noch durch mehrwöchiger Aufbewahrung im Kühlschrank beeinträchtigt.

<sup>1</sup> Eingetragenes Warenzeichen der Bayer AG.

Tab. I. Einfluß von natürlichen und synthetischen Inhibitoren auf die Schlüpfprotease.

Inhibitor	Molarität bzw. Konzentration	Restaktivität* (%)
Kein Inhibitor		100
Leupeptin	0.1 mg/ml	92
Antipain	0.6 mg/ml	86
TLCK	5 mM	83
N-Äthylmaleimid	10 mM	81
Chymostatin	0.6 mg/ml	78
SBTI	0.1 mg/ml	78
Kallikrein Inhibitor	0.6 mg/ml	74
1,10-Phenanthrolin	10 mM	41
EDTA	10 mM	7

\* Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

Über die Reaktion der Protease mit bestimmten Inhibitoren gibt Tab. I Aufschluß. Der Abbau von HPA wird am stärksten durch die Komplexbildner EDTA und Phenanthrolin gehemmt. Nur ein schwacher Verlust der Aktivität wird durch die Serinproteasenhemmstoffe SBTI, TLCK, Antipain, Chymostatin und Leupeptin, sowie durch Äthylmaleimid, einem Inhibitor der Thiolproteasen, herbeigeführt.

#### Abbau der Dottermembran/Befruchtungsmembran

Aus Abb. 2 ist ersichtlich, daß nach ungefähr 16 Std. Kontakt mit dem Zuchtmedium die Außenseite des Eies nicht mehr durch eine Dottermembran begrenzt wird und das Ei eine Quellung aufweist. Im direkten Umfeld liegt eine Anzahl von winzigen granulären Strukturen, wahrscheinlich Dotterkörnern und/oder corticale Granula. Kontrolleier, die die gleiche Zeit in Meerwasser verblieben, zeigen unter der Dottermembran Zonen

mit aneinander grenzenden Vakuolen, die nur in mit Alkohol fixierten Eiern sichtbar sind. Eine Gallertschicht, wie von Holland und Holland (1989) bei *Branchiostoma floridae* beschrieben, wurde im vorliegenden fixierten Material nicht beobachtet. Der oben geschilderte Abbau der Dottermembran wird unterbunden, wenn den fixierten Eiern neben Schlüpfmedium die Komplexbildner EDTA oder Phenanthrolin zugefügt werden. Im Falle von Phenanthrolin lassen die Eier sich kaum von den Kontrollen unterscheiden.

Den Einfluß von nichtkonzentriertem Schlüpfmedium auf lebende Neurulae zeigt Tab. II. Nach einer Inkubationszeit von 17 Std. ist bei 31% der Embryonen die Befruchtungsmembran aufgelöst. Bei Kontrollen, die in Meerwasser gehalten wurden, gibt es 28% membranlose Neurulae. Bei gleichaltrigen Embryonen verläuft also der Abbau der Befruchtungsmembran bei Kontrollen ebenso schnell als bei Schlüpfmedium ausgesetzten Neurulae. Die Lebenskraft der Neurulae wird durch die Behandlung keineswegs beeinträchtigt, denn schließlich schlüpfen sämtliche Embryonen.

#### Diskussion

Der Nachweis eines proteolytischen Enzyms in der Zuchtflüssigkeit von frisch geschlüpften Frühneurulae und der partielle Abbau der Hüllen unter dem Einfluß des Enzyms deuten auf ein Schlüpfenzym. Bei *Branchiostoma floridae* wird das unbefruchtete Ei von einer Gallertschicht und einer Dotterhaut umhüllt (Holland und Holland, 1989). Eine Gallertschicht fehlt bei *B. lanceolatum*. Nach enzymatischer Auflösung der Dotterhaut

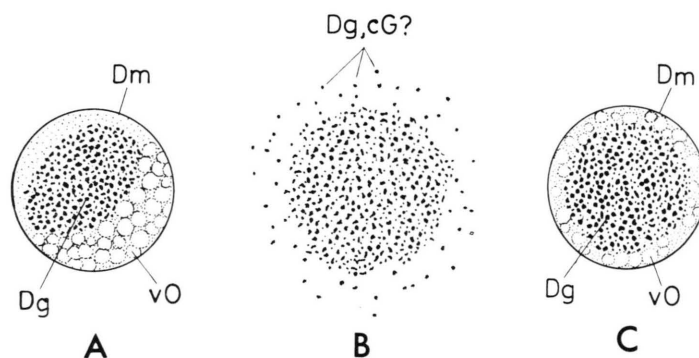


Abb. 2. Wirkung von Schlüpfmedium auf alkoholfixierte, unbefruchtete Oocyten von *Branchiostoma lanceolatum*. (A) Oocyte in Meerwasser (Kontrolle); (B) Oocyte nach Behandlung mit Schlüpfmedium: die Dottermembran wurde abgebaut, das Ooplasm ist aufgequollen und im Umfeld liegen lose körnige Partikel; (C) Oocyte nach Behandlung mit Schlüpfmedium, in Anwesenheit von 10 mM 1,10-Phenanthrolin: die Dottermembran ist intakt geblieben und es fand kein Ausstoß von Partikeln statt. Dg Dottergranula; cG corticale Granula; Dm Dottermembran; vO vakuolisiertes Ooplasm. Maßstrich = 30 µm.



Tab. II. Einfluß von extern verabreichtem Schlüpfmedium auf Embryonen im Frühneurulastadium (Behandlungsdauer: 19 Std. bei 20°C).

	Medium Meerwasser	Schlüpfmedium
	(n=107)	(n=64)
mit Hüllen:	77 (72%)	44 (69%)
ohne Hüllen:	30 (28%)	20 (31%)

lockern sich die corticalen Granula, und man könnte sich vorstellen, daß sie aus der Eizelle herausfließen (siehe Abb.2 B). Weniger wahrscheinlich ist, daß es sich bei den zerstreuten Körnchen um Dotterkörnchen handelt. Auffallend ist, daß das proteolytische Enzym ausschließlich die Dotterhaut angreift. Weder das Eiplasma, noch die granulären Bestandteile (innerhalb oder außerhalb des Eies) werden aufgelöst. Die Dottermembran von fixierten Eiern wird hundertprozentig abgebaut. Dagegen findet man in *in vivo* Versuchen nach mehreren Stunden noch unverdaute Reste der Befruchtungsmembran, die die Dotterhaut ersetzt hat. Bei *Branchiostoma floridae* fehlt vor dem Schlüpfakt die äußere Schicht der Befruchtungsmembran an mehreren Stellen. Zugleich wird die anliegende sog. hyaline Schicht erheblich dünner (Holland und Holland, 1989).

Die Versuche mit lebenden, ungeschlüpften Frühneurulae haben gezeigt, daß die Befruchtungsmembran für externes Enzym undurchlässig ist. So wird verständlich, warum schlüpfende Embryonen durch ihr Sekret das Auskriechen von ungeschlüpften Individuen nicht veranlassen können.

Die chemische Zusammensetzung der Dotterhaut wurde bei der fernöstlichen Art *Branchiostoma belcheri* untersucht (Fang und Welsch, 1995). Die Oberfläche der Membran reagiert sehr stark mit verschiedenen Lektinen, was auf die komplexe Natur der Glykoproteine und auf die Vielfalt der Kohlenhydratresiduen an dieser Stelle deutet. Von Salmonideneiern ist bekannt, daß der hohe Gly-Lys-Isopeptidgehalt als Hauptursache für die Festigkeit der Hüllen nach der Befruchtung zu betrachten ist (Hagenmaier *et al.*, 1976). Entsprechende Untersuchungen an Eiern von *Amphioxus* liegen nicht vor.

Die Hemmung des im Schlüpfwasser enthaltenen proteolytischen Enzyms durch die Komplexbildner EDTA und Phenanthrolin deutet auf eine

Metallprotease hin. Schlüpfenzyme mit Metallproteasecharakter wurden in fast allen untersuchten Fischarten beschrieben (für eine Übersicht siehe Yamagami, 1988). Ausnahmen bilden die Embryonen vom Zebrafisch (*Brachydanio rerio*) (Denucé und Thijssen, 1975) und von *Fundulus heteroclitus* (Kaighn, 1964), wo Serinprotease-Aktivität nachgewiesen wurde. Das *Rana chensinensis*-Schlüpfenzym wird sowohl durch EDTA als durch DFP (einem Inhibitor von trypsinartigen Proteasen) gehemmt (Katagiri, 1975), und auch beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird die Dotterhaut von Proteasen mit zweifältigem Charakter abgebaut (Urch und Hedrick, 1981). Bei den Ascidien, die den Cephalochordaten phylogenetisch nahestehen, enthält das Schlüpfmedium der Seescheide *Ciona intestinalis* eine Protease, die hundertprozentig durch Komplexbildner inhibiert wird, aber zum Teil auch empfindlich für Inhibitoren der Serinproteasen ist (Denucé, 1975). Dagegen verzögern oder blockieren Hemmstoffe für Trypsin den Schlüpfvorgang bei der japanischen Ascidienart *Halocynthia roretzi* (Hoshi und Numakunai, 1981). Leider wurden in diesem Fall keine Inhibitoren von Metallproteasen eingesetzt. In Anbetracht neuzeitlicher Auffassungen einer phylogenetischen Verwandtschaft zwischen Cephalochordaten und Echinodermen sei noch erwähnt, daß Seeigelembryonen die Hüllen mit Hilfe einer Zn-Protease verlassen (Lepage und Gache, 1990; Nomura *et al.*, 1991). Biochemische Untersuchungen am partiell gereinigten Schlüpfenzym von *Loligo vulgaris* deuten auf das Vorkommen von Metallproteasen bei Cephalopoden (Tintenfischen) hin (Paulij *et al.*, 1992). Denker (1977) hat als erster das zeitliche und räumliche Vorkommen eines trypsinähnlichen Enzyms in der Kaninchenblastocyste, unmittelbar vor der Implantation, beschrieben. Entsprechende Untersuchungen am Mäuse-Embryo deuten in die gleiche Richtung (Perona und Wassarman, 1986). Durch Anwendung einer umfassenden Reihe von Inhibitoren gelang es japanischen Forschern, die Ähnlichkeit des Mäuseschlüpfenzym mit Serinproteasen vom Trypsintyp zu bestätigen (Sawada *et al.*, 1990; Sawada *et al.*, 1992; Yamazaki *et al.*, 1994).

Aus dem Vorhergehenden läßt sich schließen, daß Schlüpfenzyme in zwei Kategorien eingeteilt werden können: einerseits gibt es die Gruppe der Metallproteasen die die Embryonalhüllen von Fi-

schen, Echinodermen, Cephalopoden und Cephalochordaten (partiell) auflösen, andererseits gibt es die trypsinartigen Serinproteasen, die das Schlüpfen von Säugetierblastocysten ermöglichen. Einen unsicheren Status haben vorläufig noch die Ascidien und Amphibien, für die Schlüpfenzyme beider Typen (Metall- und Serinproteasen) beschrieben wurden. Molekularbiologische Untersuchungen von gereinigten Schlüpfenzymen von Vertretern der Echinodermen (in casu der Seeigel *Paracentrotus lividus*) (Lepage und Gache, 1990) und *Hemicentrotus pulcherrimus* (Nomura *et al.*, 1991) sowie von Fischen (in casu des Reisfisches *Oryzias latipes*, mit den zwei konstituierenden Enzymen HCE und LCE) (Yasumasu *et al.*, 1994) haben gezeigt, daß im aktiven Zentrum eine Zn bin-

dende Sequenz vorkommt. Dieses HExxH Motiv ist kennzeichnend für die sog. Matrix-Metallproteinasen, wie z.B. Kollagenase, Elastase, Stromelysin und Gelatinase. Über das Vorkommen dieser Sequenz im Schlüpfenzym von *Branchiostoma lanceolatum* kann, solange das Enzym nicht isoliert und gereinigt wurde, nur spekuliert werden.

### Dank

Der Biologischen Anstalt Helgoland (Meeresstation) möchte ich für die gastfreundliche Aufnahme und für die Bereitstellung von tierischem Material und Geräten verbindlichst danken. Kallikrein-Trypsin-Inhibitor (Trasylol®) und Antipain wurden von der Bayer AG (Sparte Pharma) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

- Carroll S.B. (1995), Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* **376**, 479–485.
- Conklin E.G. (1932), The embryology of *Amphioxus*. *J.Morph.* **54**, 69–151.
- Denker H.W. (1977), Implantation. The role of proteinases, and blockage of implantation by proteinase inhibitors. *Adv. Anat.Embryol.Cell Biol.* **53**, 1–123.
- Denucé J.M. (1975), Proteolytic activity in *Ciona intestinalis*, associated with hatching. *Arch.Intern.Physiol.Biochim.* **83**, 958–959.
- Denucé J.M. und Formisano, A. (1982), Circumstantial evidence for an active contribution of Hoyle's gland to enzymatic hatching of cephalopod embryos. *Arch.Int.Physiol.Biochim.* **90**, 185–186.
- Denucé J.M. und Thijssen F.J.W. (1975), Les protéases de la glande de l'éclosion des téléostéens. Application de la technique du substrat-film. *Arch.Biol.* **86**, 391–398.
- Drach P. (1948), Embranchement des Cephalocordés, in: *Traité de Zoologie*, XI (Echinodermes, Stomocordés, Procordés) (P.P.Grassé, Hrsg), 932–1037. Masson et Cie., Paris.
- Fang Y.Q. und Welsch U. (1995), A histochemical study of the distribution of lectin binding sites in the developing oocytes of the lancelet *Branchiostoma belcheri*. *Cell Tissue Res.* **280**, 427–434.
- Garcia-Fernandez J. und Holland P.W.H. (1994), Archetypal organization of the *Amphioxus* Hox gene cluster. *Nature* **370**, 563–566.
- Hagenmaier H.E., Schmitz I. und Föhles J. (1976), Zum Vorkommen von Isopeptidbindungen in der Eihülle der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Rich). *Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem.* **357**, 1435–1438.
- Holland N.D. und Holland L.Z. (1989), Fine structural study of the cortical reaction and formation of the egg coats in a lancelet (= *Amphioxus*), *Branchiostoma floridae* (Phylum Chordata: subphylum Cephalochordata=Acrania). *Biol.Bull.* **176**, 111–122.
- Hoshi M. und Numakunai T. (1981), Hatching enzyme of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Acta Embryol.Morphol.Exper.n.s.* **2**, 163–169.
- Kaighn M.E. (1964), A biochemical study of the hatching process in *Fundulus heteroclitus*. *Dev.Biol.* **9**, 56–80.
- Katagiri C. (1975), Properties of the hatching enzyme from frog embryos. *J.Exp.Zool.* **193**, 109–118.
- Lepage T. und Gache C. (1990), Early expression of a collagenase-like enzyme gene in the sea urchin embryo. *EMBO J.* **9**, 3003–3012.
- Nomura K., Tanaka H., Kikkawa Y., Yamaguchi M. und Suzuki, N. (1991), The specificity of sea urchin hatching enzyme (envelysin) places it in the mammalian matrix metalloproteinase family. *Biochemistry* **30**, 6115–6123.
- Paulij W.P., Verhoof H.C.C.M. und Denucé J.M. (1992), Partial purification and characterization of *Loligo vulgaris* hatching enzyme obtained from hatching medium. *Comp.Biochem.Physiol.* **101 B**, 617–622.
- Perona R.M. und Wassarman P.M. (1986), Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. *Dev.Biol.* **114**, 42–52.
- Sawada H., Yamazaki K. und Hoshi M. (1990), Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. *J.Exp. Zool.* **254**, 83–87.
- Sawada H., Hoshi M., Someno T., Suzuki R. und Yamazaki, K. (1992), Inhibition of mouse blastocyst hatching by subsite-specific trypsin inhibitors, peptidyl arginyls. *Develop. Growth & Differ.* **34**, 357–362.
- Urch U.A. und Hedrick J.L. (1981), Isolation and characterization of the hatching enzyme from the amphibian, *Xenopus laevis*. *Arch.Biochem.Biophys.* **206**, 424–431.
- Yamagami K. (1988), Mechanisms of hatching in fish, in *Fish Physiology*, Vol. **XIA**, (W.S.Hoar und D.J.Randall, Hrsg.), 447–499. Academic Press, New York.
- Yamazaki K., Suzuki R., Hojo E., Kondo S., Kato, Y., Kamioka, K., Hoshi M. und Sawada H. (1994), Trypsin-like hatching enzyme of mouse blastocysts: evidence for its participation in hatching process before zona shedding of embryos. *Develop. Growth & Differ.* **36**, 149–154.
- Yasumasu S., Iuchi I. und Yamagami K. (1994), cDNAs and the genes of HCE and LCE, two constituents of the medaka hatching enzyme. *Develop.Growth & Differ.* **36**, 241–250.