Die rätselhaften Grottenkrebse der Blue Holes

Sind Remipedia primitive Crustaceen oder schwimmende Insekten?

Torben Stemme, Gerd Bicker, Steffen Harzsch, Stefan Koenemann



Foto: Thomas M. Iliffe

Zusammenfassung

Zu den erst seit den frühen 80er Jahren bekannten Grottenkrebsen Remipedia Yager 1981 wurden seit ihrer Entdeckung zahlreiche Theorien bezüglich ihrer Abstammungsverhältnisse postuliert. So sind Hypothesen von einer basalen Stellung innerhalb der Crustacea über eine Verbindung zu verschiedenen niederen und höheren Krebsen bis hin zu einer nahen Verwandtschaft mit Hexapoda bekannt. In diesem Artikel werden die neuesten Erkenntnisse auf diesem Gebiet präsentiert. Des Weiteren wird ein relativ neuer Ansatz zur Lösung der Verwandtschaftsbeziehungen vorgestellt. Bei dieser als Neurophylogenie bezeichneten Disziplin werden Merkmale der Neuroanatomie und Neuroentwicklungsbiologie analysiert. Ein spezieller Merkmalkomplex ist die Morphologie und Verteilung von serotonergen Zellen im Bauchmark der Arthropoda, welcher mit Hilfe der Immunhistochemie dargestellt werden kann. Hier wird die Methode der Immunhistochemie vorgestellt und erste Ergebnisse zum serotonergen System der Remipedia präsentiert.



Abb. 1 Fotos einiger Arten der Remipedia (nicht maßstabsgetreu). A: *Cryptocorynetes haptodiscus*. B: *Speleonectes tulumensis*. C: *Godzilliognomus frondosus*. Fotos Thomas M. Iliffe.

Einleitung

Remipedia

Die Remipedia zählen zu den bemerkenswertesten zoologischen Neufunden der letzten 30 Jahre. Während einer Tauchexpedition auf den Bahamas wurden 1979 erstmals Individuen dieser bis dahin unbekannten Gruppe von Gliederfüßern (Arthropoda) entdeckt und als eine neue Klasse der Crustacea beschrieben (Yager 1981). Nach dieser Entdeckung wurden und werden immer wieder neue Arten gefunden, sodass mittlerweile 24 gesicherte Arten aus drei Familien bekannt sind (Tab. 1). Darüber hinaus liegen Exemplare von circa fünf unbeschriebenen Arten vor (Abb. 1). Zuletzt wurde die Art *Speleonectes atlantida* Koenemann et al. 2009b beschrieben. Alle rezenten Remipedien werden der Ordnung Nectiopoda Schram 1986 zugeteilt. Die Nectiopoda wiederum sind in drei Familien unterteilt. Die Godzilliidae Schram et al. 1986 umfassen die drei Gattungen *Godzillius*, *Godzilliognomus* und *Pleomothra*. Die Familie Speleonectidae Yager 1981 enthält vier Gattungen:

Tab. 1 Die taxonomische Einteilung der Remipedia in Familien und Gattungen und die Anzahl der rezenten Arten pro Gattung.

Familie	Gattung		Anzahl rezenter Arten
Godzilliidae	*Godzillius*	Schram et al. 1986	Monotypisch
	Godzilliognomus	Yager 1989	2
	Pleomothra	Yager 1989	2
Speleonectidae	*Speleonectes*	Yager 1981	12
	Lasionectes	Yager & Schram 1986	2
	Cryptocorynetes	Yager 1987	3
	Kaloketos	Koenemann et al. 2004	Monotypisch
Micropacteridae	*Micropacter*	Koenemann et al. 2007a	Monotypisch

Speleonectes, *Lasionectes*, *Cryptocorynetes* und *Kaloketos*. Außerdem wurde von Koenemann et al. (2007a) eine neue Familie, die Micropacteridae, beschrieben.

Das Hauptverbreitungsgebiet der Remipedien liegt in den Höhlensystemen der Karibik. Außerdem gibt es einzelne, offenbar isolierte Fundstellen auf den Kanarischen Inseln (Lanzarote) und in West-Australien (Abb. 2C). Der Körper der hermaphroditischen (zwittrigen) Remipedia ist in einen Kopf- und einen lang gestreckten Rumpfbereich gegliedert (Abb. 2 A, B), der aus bis zu 42 gleichförmigen Segmenten bestehen kann (Koenemann et al. 2006). Im adulten Zustand erreichen kleine Arten eine Länge von ca. 9 mm, bei großen Arten können es bis zu 45 mm sein. Remipedia besitzen weder Pigmente noch Augen, es handelt sich um obligatorische Grottenkrebse. Alle bekannten Arten besiedeln sogenannte anchialine Höhlensysteme (Schram et al. 1986) (Abb. 3), welche in der Karibik gemeinhin

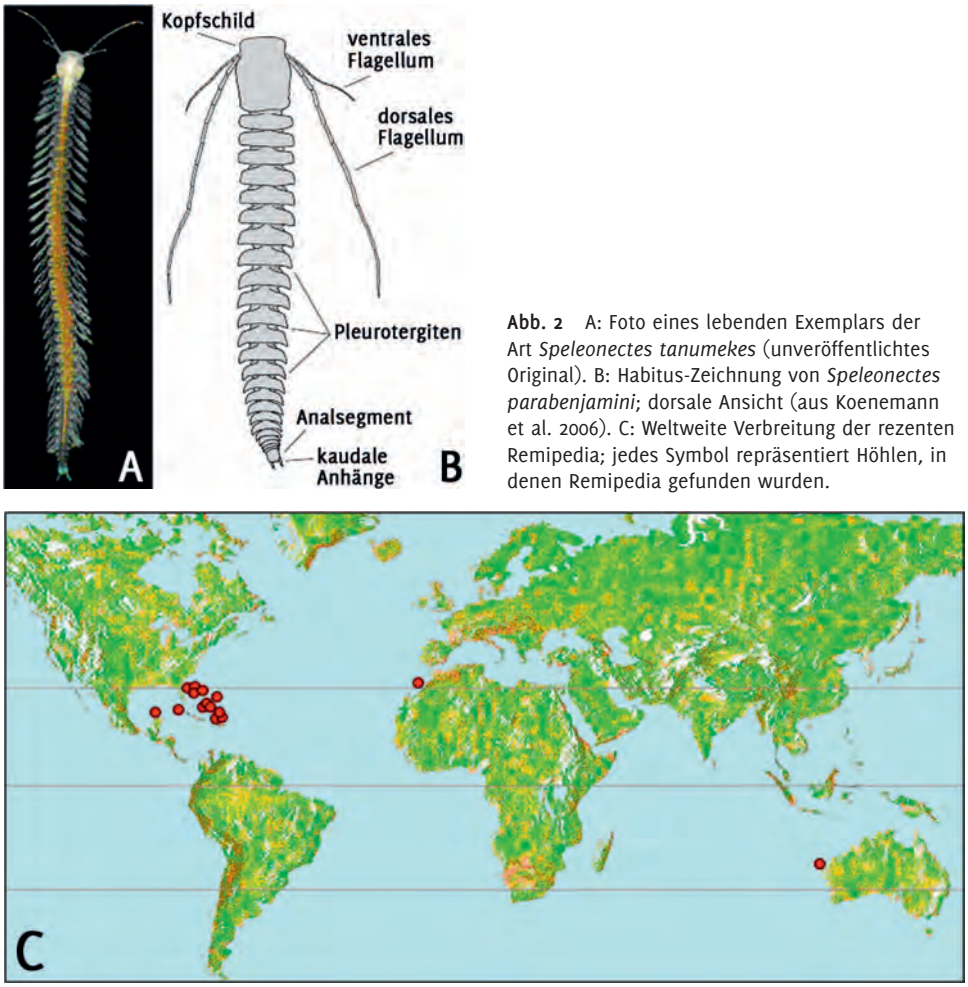


Abb. 2 A: Foto eines lebenden Exemplars der Art *Speleonectes tanumekes* (unveröffentlichtes Original). B: Habitus-Zeichnung von *Speleonectes parabenjamini*; dorsale Ansicht (aus Koenemann et al. 2006). C: Weltweite Verbreitung der rezenten Remipedia; jedes Symbol repräsentiert Höhlen, in denen Remipedia gefunden wurden.



Abb. 3 Aufnahme während der Lanzarote-Expedition 2008 im Lavatunnel Atlantida, bei der die neue Art *Speleonectes atlantida* gefunden wurde (Koenemann et al. 2009b). Die Ausrüstung der Taucher verdeutlicht den immensen Aufwand, diese Höhlen zu untersuchen. Foto Jill Heinerth.

auch als Blue Holes bezeichnet werden. Der Begriff „anchialin", erstmals erwähnt von Holthuis (1973), wurde 1986 von Stock et al. neu definiert. Demnach bestehen anchialine Habitate aus halinen Wasserkörpern, normalerweise mit einer eingeschränkten Exposition zur Oberfläche und stets vorhandenen, mehr oder weniger stark ausgeprägten Verbindungen zum Meer, wobei sie merklich marinen aber auch terrestrischen Einflüssen unterliegen. Remipedia finden sich ausschließlich unterhalb der Sprungschicht, welche sich zwischen Salz- und Süßwasser aufgrund der Dichteunterschiede ausbildet (Halokline).

Aufgrund der späten Entdeckung dieser Krebsgruppe und dem nur schwer zugänglichen Lebensraum sind einige Aspekte zur Biologie der Remipedia noch unbekannt. Beispielsweise ist relativ wenig über die Ökologie und das Verhalten dieser Krebse untersucht worden. Die Embryonalentwicklung wurde erst vor drei Jahren beschrieben, nachdem erstmals Nauplius-Larven auf der Bahamas-Insel Abaco gefunden wurden (Koenemann et al. 2007b, 2009a). Bezüglich des Nervensystems der Remipedia liegen bisher nur Studien zur Gehirnanatomie vor (Fanenbruck et al. 2004; Fanenbruck & Harzsch 2005). Untersuchungen der ventralen Nervenkette, auch Bauchmark genannt, fehlen bis zum heutigen Tag (allgemeine Erläuterungen zum Nervensystem der Arthropoda siehe „Exkurs").

Ebenso sind die genauen Verwandtschaftsbeziehungen der Remipedia innerhalb der Arthropoda noch umstritten. Mittlerweile sind zahlreiche Theorien zur Stellung der Remipedia postuliert worden. Diese werden in diesem Artikel vorgestellt und im Rahmen der neuesten Erkenntnisse

Exkurs: Nervensystem der Arthropoda

Trotz einfacher Bauweise befähigt das Nervensystem der Arthropoda zu verschiedenen, zum Teil komplexen Sinnesleistungen. Es lässt sich einteilen in das enterische (ENS), das periphere (PNS) und das zentrale Nervensystem (ZNS). Das ENS reguliert alle Verhaltensmuster, welche mit der Nahrungsaufnahme, Verdauung und Ausscheidung assoziiert sind. Bei der Europäischen Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* und dem Tabakschwärmer *Manduca sexta* wird die Häutung ebenfalls vom ENS beeinflusst, wobei Luft verschluckt wird, um die alte Cuticula zu sprengen (Ayali 2004). Über das PNS werden externe Reize aus der Umgebung des Tieres, aber auch interne Informationen des Körpers zum ZNS gesandt (Kandel et al. 2000). Das PNS ist über Nervenbahnen mit dem ZNS verbunden. Das ZNS besteht aus dem dorsal gelegenen Gehirn, welches mit der ventral liegenden Nervenkette, auch Bauchmark genannt, über paarige circumoesophageale Konnektive verbunden ist. Gehirn und Bauchmark sind segmentierte Strukturen, wobei die segmentalen Ganglien über paarige longitudinale Konnektive in Verbindung stehen. Die Ganglien setzen sich zusammen aus zwei bilateralsymmetrischen Hemiganglien, welche durch Kommissuren verbunden sind (Reichert 2000). Diese Form des ZNS bezeichnet man auch als Strickleiternervensystem.

Die Ganglien des Bauchmarks sorgen für eine Innervierung der Körpersegmente. Bei hoch entwickelten Invertebraten sind die Ganglien in eine Rinde aus Zellkörpern und einen sogenannten Neuropilkern unterteilt (Reichert 2000). Als Zellkörper wird der Teil der Nervenzelle (Neuron) benannt, in dem sich der Zellkern und weitere wichtige Organellen (z. B. Mitochondrien, Golgikörper, endoplasmatisches Reticulum) befinden. Als Neuropil bezeichnet man spezielle Bereiche im Nervensystem, in denen keine Zellkörper vorkommen, sondern nur die als Neuriten bezeichneten Zellfortsätze der Nervenzellen. Je nach Anzahl dieser vom Zellkörper ausgehenden Zellfortsätze lassen sich Nervenzellen in monopolare, bipolare oder sogar multipolare Neurone einteilen.

Vom Bauchmark werden über die in die Peripherie ziehenden Nervenfasern die Körperanhänge und Organe des jeweiligen Segments innerviert. Gleichzeitig werden aus der Peripherie sensorische Eingänge erhalten und verarbeitet. Außerdem werden Fasern aus jedem Ganglion über die Konnektive in andere Segmente und in das Gehirn projiziert (Kandel et al. 2000).

Die Informationsübertragung zwischen einzelnen Neuronen findet an speziellen Strukturen statt, den sogenannten Synapsen. Man unterscheidet zwei Typen: Zum einen die elektrische zum anderen die chemische Synapse (Reichert 2000; Kandel et al. 2000). Bei der chemischen Synapse dienen Neurotransmitter als Botenstoffe, um die Information von einer Nervenzelle zur anderen weiter zu leiten. Diese Botenstoffe lassen sich in niedermolekularen Transmitter und Neuropeptide einteilen. Zur ersten Klasse gehört der in dieser Arbeit untersuchte Neurotransmitter Serotonin.

diskutiert. Hierbei wird ein relativ neuer Ansatz zur Lösung der phylogenetischen Beziehungen gewählt. Am Beispiel serotonerger Zellen im Nervensystem der Remipedia wird auf diese Weise ein spezieller Merkmalskomplex zur Evaluierung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Arthropoda verwendet.

Phylogenie der Gliederfüßer und Remipedia

Die Verwandtschaftsverhältnisse (Phylogenie) innerhalb der Arthropoda werden seit dem 19. Jahrhundert kontrovers diskutiert (z. B. Edgecombe 2010; Jenner 2010; Koenemann et al. 2010; Regier et al. 2010). Die traditionellen Vergleiche morphologischer Merkmale oder verschiedener Baupläne werden seit einigen Jahrzehnten durch molekulare Studien ergänzt. Hierbei werden molekulare Sequenzdaten der Taxa verglichen, also die Abfolge der Grundbausteine (Nukleotide) der DNA beziehungsweise RNA oder die Aminosäureabfolge der Proteine.

Die orthodoxe Auffassung eines gemeinsamen Ursprungs Tracheen-atmender Arthropoden, den Tracheata (Abb. 4), erstmals erwähnt bei Haeckel (1866) und später neu definiert von Pocock (1893a, b), gilt heute weitgehend als überholt, und ist durch neue Hypothesen zur Arthropoda-Phylogenie ersetzt worden. So wurde das Konzept der Pancrustacea (u. a. Friedrich & Tautz 1995, 2001; Regier & Shultz 1997) vorgeschlagen, bei dem die Hexapoda und Crustacea zu Schwestergruppen (oft unter gegenseitigem Ausschluss einiger Vertreter dieser beiden Gruppen) vereinigt werden. Ein weiteres Konzept postuliert eine enge Verwandtschaft der Myriapoda und Chelicerata, genannt Paradoxopoda (Mallat et al. 2004) beziehungsweise Myriochelata (Pisani et al. 2004). Ein Taxon Myriochelata ist wiederum per Definition nicht mit der Verwandtschaft Mandibeln tragender Arthropoden, den Mandibulata (erstmals bei Snodgrass 1935), bestehend aus Myriapoda, Crustacea und Hexapoda, vereinbar (Abb. 4).

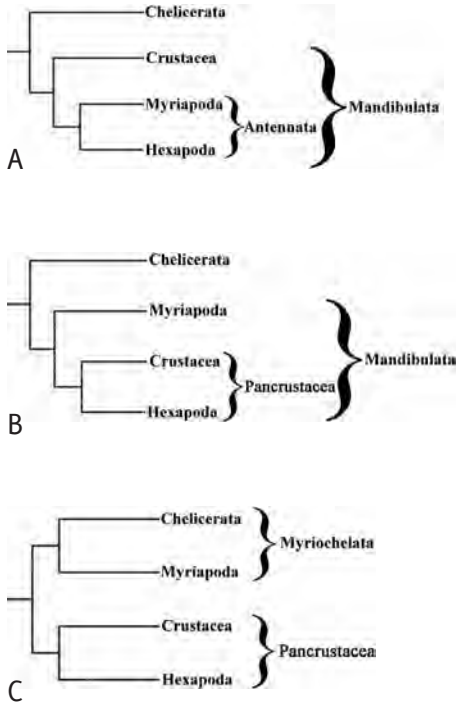


Abb. 4 Verschiedene Hypothesen zur Phylogenie der Arthropoda. A: Im Tracheata-Konzept sind Myriapoda und Hexapoda Schwestergruppen. B: Beim Pancrustacea-Konzept stehen die Crustacea und Hexapoda in einer Klade. Zu beiden Theorien ist das Taxon Mandibulata kompatibel. C: Im Myriochelata-Konzept bilden Chelicerata und Myriapoda sowie Crustacea und Hexapoda jeweils Schwestergruppen. Modifiziert nach Westheide & Rieger 2007.

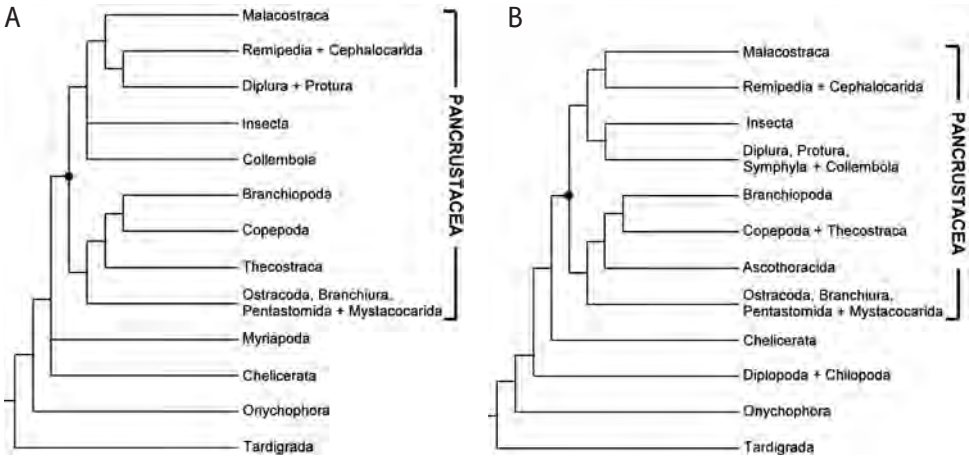


Abb. 5 Phylogenetische Bäume der Analysen von 88 Arthropoden-Taxa anhand der DNA-Marker COI, 16S und 18S aus Koenemnann et al (2010). Remipedia bilden eine Klade mit Cephalocarida, welche wiederum in einem Schwestergruppenverhältnis zu basalen Hexapoden (A) beziehungsweise Malacostraca (B) stehen. Der schwarze Punkt markiert die Pancrustacea-Klade.

Bei Vergleichen morphologischer Merkmale wurden Remipedia aufgrund ihres außergewöhnlichen Bauplans häufig als primitive Krebsgruppe angesehen oder fungierten z. B. a priori als Außengruppe in phylogenetischen Analysen (Schram 1986; Ax 1999; Wills 1997). Diese theoretischen Vorannahmen konnten allerdings bislang nicht überzeugend untermauert werden. Mehrere umfangreiche phylogenetische Analysen der Arthropoda/Metazoa scheinen einer basalen Stellung der Remipedia zu widersprechen (Schram & Koenemann 2004; Giribet et al. 2001; Shultz & Regier 2000; Regier et al. 2008, 2010; Spears & Abele 1997; Koenemann et al. 2010).

Neuere phylogenetische Studien zur Stellung der Remipedia innerhalb der Arthropoda sprechen für eine Verwandtschaft zu höher entwickelten Crustacea (Malacostraca) beziehungsweise Hexapoda. So wurden aufgrund von Vergleichen der Gehirnstrukturen Ähnlichkeiten zu Malacostraca und Hexapoda vermutet (Fanenbruck et al. 2004; Fanenbruck & Harzsch 2005). Dies wird durch Gemeinsamkeiten in der Entwicklung und der Antennenmorphologie unterstützt (Koenemann et al. 2009a). Molekulare Vergleiche von Sequenzen des Blutfarbstoffs Hämocyanin, welcher dem Sauerstofftransport bei bestimmten Invertebraten dient, ergaben überraschend viele Gemeinsamkeiten zwischen Remipedia und Hexapoda (Ertas et al. 2009).

Aktuelle molekulare Studien, welche die zurzeit umfangreichsten auf dem Gebiet der Arthropoda-Phylogenie darstellen (Koenemann et al. 2010; Regier et al. 2008, 2010), zeigen ein Schwestergruppenverhältnis von Remipedia zu Cephalocarida. Die Schwester-Taxa zu dieser phylogenetischen Gruppierung wiederum sind basale Hexapoda. Somit scheint sich die Vermutung zu erhärten, dass die Remipedia keine primitive Krebsgruppe sind, sondern mit den höheren Krebsen oder sogar Hexapoda in Verbindung gebracht werden müssen (zusammengefasst in Abb. 5).

Serotonin-immunreaktive Neurone als phylogenetisches Merkmal

Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um zusätzliche Hinweise auf die genauen Abstammungsverhältnisse zu erhalten. Alternative Herangehensweisen zur Klärung der Arthropoden-Phylogenie sind von großer Wichtigkeit, da sie neue Impulse in diesem Zusammenhang geben können. Ein spezieller, in diesem Artikel beschriebener Ansatz hierfür ist der Vergleich von Merkmalen aus den Bereichen der Neuroanatomie und Neuroentwicklungsbiologie. Die Neurophylogenie betrachtet diese Merkmale in einem phylogenetischen Kontext (Harzsch 2002).

Die Idee ist nicht neu. Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts begannen Holmgren (1916) und Hanström (1928) die Gehirnarchitektur der Arthropoda zur Lösung der Phylogenie heranzuziehen. Im Laufe der letzten Jahre hat dieses Feld viel Aufmerksamkeit erfahren. Neben einer Vielzahl von untersuchten Merkmalkomplexen (zusammengefasst in Harzsch 2006) wurde auch die Verteilung serotonerger Nervenzellen im Bauchmark der Crustacea in einem phylogenetischen Kontext untersucht (Harzsch & Waloszek 2000).

Das biogene Monoamin Serotonin (5-Hydroxytryptamin) gilt seit seiner Entdeckung Mitte des 20. Jahrhunderts (Rapport et al. 1948) als eine der am weitesten verbreiteten Substanzen im Tierreich. Sowohl im Nervensystem als auch in nichtneuronalem Gewebe konnte es bei einer Vielzahl von Invertebraten nachgewiesen werden. Die Funktion von Serotonin im Nervensystem der Invertebraten ist vielfältig. So konnte in diesem Zusammenhang unter anderem ein Einfluss auf das Aggressionsverhalten, Flug-, beziehungsweise Schwimmverhalten sowie die Lernfähigkeit und circadiane Rhythmik verschiedener Tiergruppen gezeigt werden (Kravitz 1988; Bicker & Menzel 1989).

Diese funktionelle Vielfältigkeit des Serotonins und das Vorkommen in allen Bereichen des Tierreichs deuten auf ein frühes Auftreten von Serotonin in der Stammesentwicklung hin. Dies gilt besonders für seine Funktion als Botenstoff, weshalb es vermutlich schon in sehr ursprünglichen Nervensystemen als Neurotransmitter fungierte (Hay-Schmidt 2000).

Die Serotonin-immunreaktiven Neurone des Bauchmarks eignen sich aufgrund verschiedener Eigenschaften für phylogenetische Untersuchungen. Zum einen wurde das serotonerge System in vielen Taxa der Arthropoda untersucht, somit ist eine relativ hohe Datendichte vorhanden. Zum anderen ist die Anzahl serotonerger Nervenzellen im Bauchmark gering, wodurch sie individuell identifizierbar und so leichter zu vergleichen sind. Beispielsweise besitzt das Bauchmark des Flusskrebses *Procambarus clarkii* nur ungefähr 30 serotonerge Zellkörper (Real & Czternasty 1990). Des Weiteren weisen die Neurite dieser Serotonin-immunreaktiven Nervenzellen eine individuelle Morphologie auf, sodass jede dieser Zellen gut identifizierbar ist (Harzsch & Waloszek 2000).



Abb. 6 Darstellung der direkten und indirekten Methode zur Immundetektion. Epitope (gelb, hellblau, rot) des AG (blau) werden vom primären AK (schwarz) erkannt. Die AK binden spezifisch an diese Epitope (spezifisches Epitop in dieser Darstellung rot). Bei der direkten Methode ist der Primär-AK mit Fluorochromen konjugiert (grün). Bei der indirekten Methode binden konjugierte Sekundär-AK (grau) an den Primär-AK (modifiziert nach Luttmann et al. 2009).

Methoden

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie, auch Immunzytologie, ist ein seit Jahrzehnten gebräuchliches Standardverfahren in vielen Gebieten der Naturwissenschaften. Gekoppelt wird diese Methode mit der so genannten Immunfluoreszenztechnik. Hierbei werden die Antikörper (AK) mit Fluorochromen markiert, welche bei der späteren Auswertung am Mikroskop durch monochromatisches Licht angeregt werden, je nach Fluorochrom aber Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. Die AK binden an bestimmte Strukturen (Epitope) auf dem Zielmolekül (Antigen; AG), in diesem Fall Serotonin. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen zwei Möglichkeiten zum Nachweis der gewünschten Substanz: der direkten und der indirekten AG-AK-Reaktion. Bei der direkten Methode ist der Primär-AK bereits mit Fluorochromen markiert, bei der indirekten werden weitere AK (Sekundär- beziehungsweise Tertiärreagenzien) eingeschaltet, welche mit den Fluorochromen markiert sind (Abb. 6).

Der Vorteil der indirekten Methode ist eine Verstärkung des Signals, begründet durch eine erhöhte Anzahl an Fluorochrom-Molekülen pro Primär-AK-AG-Bindung, da mehrere Sekundär-AK an einen Primär-AK binden, welche jeweils mit Fluorochromen konjugiert sind. Nachteile sind der größere Zeitaufwand durch weitere Inkubationsschritte und die Möglichkeit einer erhöhten Hintergrundfärbung.

Zu den gebräuchlichsten Fluorochromen zählen Carbocyanin 3 und Alexa Fluor 488. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Fluorochrome sind Doppelfärbungen möglich. Hierbei werden mehrere AK, welche mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert sind, gegen verschiedene AG eingesetzt. Im Folgenden wird eine Doppelfärbung von Serotonin und Synapsin erläutert. Synapsine sind spezielle Proteine des präsynaptischen Kompartiments, welche die Neurotransmittervesikel an Komponenten des Zytoskeletts verankern können. Des Weiteren findet der Fluoreszenz-Farbstoff 4‘,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Verwendung. Dieser bindet spezifisch an DNA-Moleküle und erlaubt eine Detektion von Zellkernen und somit Zellkörpern. Durch eine Kopplung von Synapsin- und Zellkernfärbung lassen sich Zellkörper-Regionen und Neuropil-Regionen unterscheiden, was bei der Orientierung im Gewebe von Nutzen ist.

In Tabelle 2 ist ein Standard-Protokoll der Immunhistochemie zur Detektion von Serotonin und Synapsin, sowie zur Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne dargestellt. Anhand dieses Protokolls, bei dem die indirekte Methode verwendet wird, werden im Folgenden alle wichtigen Schritte erläutert. Generell ist es empfehlenswert, allen Pufferlösungen 0,5% Natriumazid hinzuzufügen. Dies ist eine etablierte Methode, um eine Verunreinigung der Puffer durch Mikroorganismen zu vermeiden. Natriumazid stört beim Elektronentransport in der Atmungskette, indem das aktive Zentrum bestimmter Enzyme irreversibel blockiert wird.

Fixierung

Die Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (PFA) hat zwei entscheidende Funktionen. Zum einen wird ein spezieller Serotonin-Aldehyd-Komplex hergestellt, welchen der Serotonin-AK benötigt, um überhaupt an das Antigen anbinden zu können. Zum anderen wird so für eine Verknüpfung von

Proteinen im Gewebe gesorgt. Das Gewebe wird konserviert und gehärtet, wodurch alle makromolekularen Strukturen an Ort und Stelle bleiben. Dabei werden Proteine mehr oder weniger stark denaturiert und über Quervernetzung verbunden. Dies ist ein kritischer Schritt, da auch das zu untersuchende Molekül nicht vor Denaturierung geschützt ist. Somit kann es vorkommen, dass das AG durch das Fixativ in einem Grad denaturiert wird, woraufhin der AK das Epitop nicht mehr zu erkennen vermag. Als Fixativ zur Immundetektion von Serotonin hat sich 4%iges PFA bewährt (Abb. 7). Nach entsprechender Inkubationszeit wird das Gewebe mindestens 2 h bei mehrmaligem Lösungswechsel mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um überschüssiges Fixativ aus dem Gewebe zu entfernen.

Einbetten und Schneiden

Die Einbettung der Individuen erfolgt in 4 % Agarose in destilliertem Wasser. Vor dem Einbetten in der noch etwa 50 °C

Tab. 2 Protokoll der Immunhistochemie zur Detektion von Serotonin und Synapsin, sowie zur Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne (modifiziert nach Stern et al. 2007). Erläuterungen: Aqua dest.: Destilliertes Wasser; Cy3: Carbocyanin 3; DABCO: Triethylendiamin; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol; DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank; JIRL: Jackson Immuno Research Laboratories; min: Minute; MP: Molecular Probes; NHS: Nomalserum vom Pferd; PBS: Phosphat gepufferte Salzlösung; PFA: Paraformaldehyd; RT: Raumtemperatur; T: Temperatur; TX: Triton X-100; ü. N.: über Nacht.

Schritt	Chemikalien	T	Dauer
Fixierung	4 % PFA	4 °C	ü. N.
Waschen	4-maliger Wechsel, PBS	RT	je 30 min
Einbetten + Schneiden (Vibratom)	Poly-L-Lysin; 4 % Agarose in Aqua dest.		
Permeabilisierung	0,3 % Saponin in PBS-TX 0,2 %	RT	45 min
Waschen	4-maliger Wechsel, PBS-TX 0,2 %	RT	je 30 min
Blocken	5 % NHS in PBS-TX 0,2 %	RT	180 min
Primär-AK	Rabbit-Anti-Serotonin (Sigma) 1:5000 + Mouse-Anti-Synapsin SYNORF1 (E. Buchner, Würzburg, DSHB)1:30 in Block-Lösung	4 °C	2 Tage
Waschen	4-maliger Wechsel, PBS-TX 0,2 %	RT	je 30 min
Sekundär-AK	Goat-Anti-Rabbit Cy3-konjugiert (JIRL) 1:250 + Goat-Anti-Mouse (MP) Alexa Fluor 488-konjugiert 1:250 + 1 µg/ml DAPI in Block-Lösung	4 °C	ü. N.
Waschen	4-maliger Wechsel, PBS-TX 0,2 % letzter Wechsel PBS	RT	je 30 min
Eindecken	Mowiol + 25 mg/ml DABCO		

warmen Agarose wird das Gewebe mit Poly-L-Lysin inkubiert. Diese Behandlung stabilisiert die Verbindung von Gewebe und Einbettmedium aufgrund der guten adhäsiven Eigenschaften des Poly-L-Lysin. Nach einigen min wird überschüssiges Poly-L-Lysin entfernt, sodass nur ein kleiner Film das Präparat umgibt, und die Einbettung durchgeführt. Dabei werden die Präparate auf dem Boden eines Wägeschälchens ausgerichtet und mit der flüssigen Agarose überschichtet. Nach Aushärten wird der Agarose-Block mit eingeschlossener Probe mit einer herkömmlichen Rasierklinge getrimmt, in ein Vibratom eingespannt und umgeben von PBS geschnitten. Die Technik des Vibratomschneidens gilt als eine einfache und schnelle Methode, um Gewebeschnitte herzustellen. Hierbei wird eine Rasierklinge in wässrigem Medium (PBS) durch das Präparat geführt. Dabei vibriert die Klinge, wodurch sich eine saubere Schnittfläche ergibt, außerdem werden Scherkräfte durch geringe Stauchung des Präparates minimiert.

Permeabilisierung

Im folgenden Schritt werden die fertigen Schnitte mit 0,3 % Saponin in Phosphat gepufferter Salzlösung mit Triton X-100 (PBS-TX) 0,2 % für mindestens 45 min inkubiert. Saponin ist ein von verschiedenen Pflanzenfamilien bekanntes Detergenz. Das hier verwendete Saponin wurde aus der Rinde des Seifenrinden-Baumes *(Quillaja saponaria)* gewonnen. Diese pflanzlichen Glykoside bilden in Wasser seifenartige Lösungen. Durch eine Reaktion der Saponine mit dem Cholesterol der Zellmembranen eukaryotischer Zellen kommt es zur Perforation der Membran. Dadurch wird dem AK das Eindringen in die Zelle erleichtert.

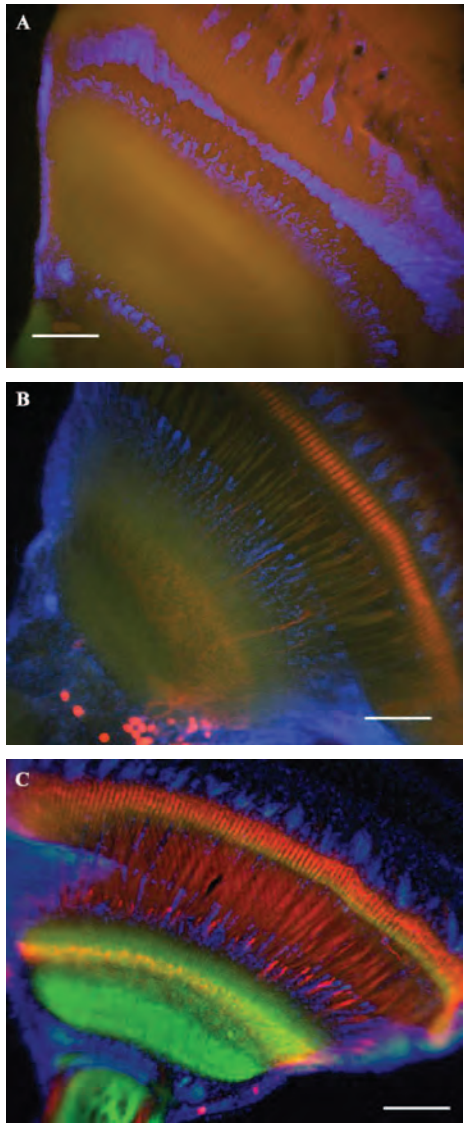


Abb. 7 Ergebnisse von verschiedenen Fixierungen zur Serotonin- (rot) und Synapsin-Immundetektion (grün) (blau: Zellkernfärbung mit DAPI). Eine Fixierung mit AAF (85 % Eisessig, 10 % Formalin, 5 % Ethanol) (A) sowie eine Vorfixierung mit 4 % PFA und Nachfixierung mit AAF (B) zeigen keine beziehungsweise schwache Färbungen. Das beste Ergebnis wird bei einer Fixierung mit 4 % PFA erzielt (C). Maßstab: 200 µm.

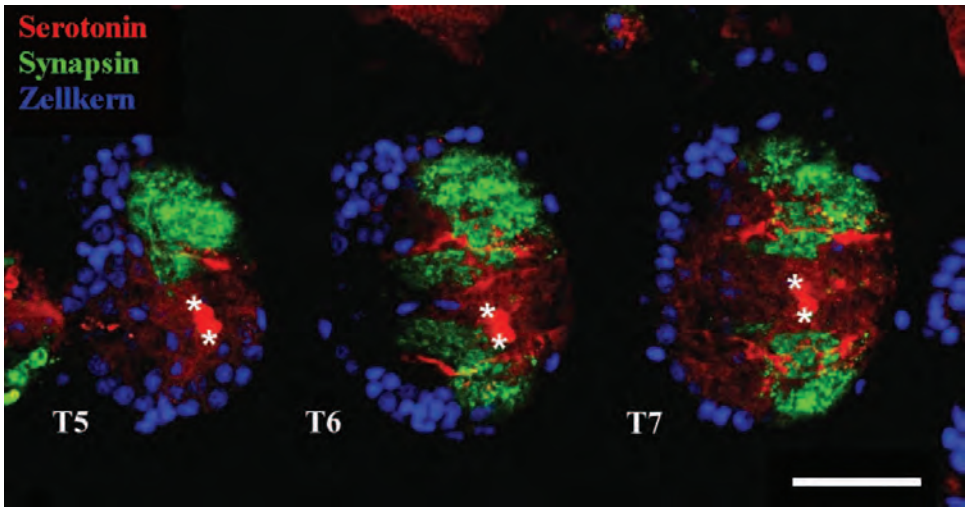
Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungen

Nach mehreren Wasch-Schritten mit PBS-TX 0,2% für insgesamt mindestens 2 h folgt die Überführung in 5% NHS (Normalserum vom Pferd) in PBS-TX 0,2% über Nacht zur Blockierung unspezifischer AK-Bindungen. Durch den Vorgang des Blockierens soll die unspezifische Hintergrundfärbung so gering wie möglich gehalten werden. Auch wenn AK spezifisch an das AG binden, kommt es dennoch immer wieder zu unspezifischen Bindungen, welche zu einer falsch positiven Färbung führen. Häufigste Ursache hierfür ist die Tendenz von Proteinen, hydrophobe und auch elektrostatische Bindungen auszubilden. Um dem entgegenzuwirken, bietet man in der Blocklösung konkurrierende Proteine an. Hydrophobe Bindungen zwischen den Proteinen treten in wässriger Lösung insbesondere dann auf, wenn deren Grenzflächenspannung niedriger ist, als die des umgebenden Wassers. Triton X-100 als nichtionisches Detergenz verringert die Oberflächenspannung und reduziert so die Ausbildung von hydrophoben Bindungen (Luttmann et al. 2009).

Primär-Antikörper-Bindung

Direkt im Anschluss nach Abnahme der Blocklösung werden die primären AK auf die Gewebeschnitte gegeben. Dieser bindet an das entsprechende AG (hier Serotonin beziehungsweise Synapsin). Hierbei ist zu beachten, dass eine ausgewogene Balance zwischen der Konzentration des AK und der Inkubationszeit beibehalten wird. Eine zu hohe Konzentration und/oder zu lange Inkubationszeit kann die Wahrscheinlichkeit von unspezifischer

Abb. 8 Aufnahme eines Horizontalschnittes (60 µm) von den Ganglien des fünften bis siebten Thorakalsegmentes (T5-7) von *Nebalia bipes*. Pro Ganglion sind zwei zentral gelegene serotonerge Zellkörper zu beobachten (Sternchen) (Rot: Serotonin; Grün: Synapsin; Blau: Zellkernfärbung). Anterior ist links. Maßstab: 50 µm.



Hintergrundreaktion erhöhen, umgekehrt aber kann eine zu geringe Konzentration und/oder zu kurze Inkubation das spezifische Signal verringern.

Sekundär-Antikörper-Bindung

Nach erneuten Wasch-Schritten mit PBS-TX 0,2% über mindestens 2 h werden die Proben mit sekundären AK über Nacht inkubiert. Wie oben erläutert sind die sekundären AK mit Fluorochromen gekoppelt und binden an den primären AK. Es ist Gleiches zu beachten wie bei der Primär-AK-Bindung. In dieser Lösung ist auch 1 µg/ml des Fluoreszenz-Farbstoffes DAPI enthalten. Um die Präparate vor dem Prozess des Ausbleichens zu schützen, werden die Schnitte während der Inkubation dunkel gelagert. Zum Abschluss erfolgt eine weitere Serie von Wasch-Schritten, ebenfalls über mindestens 2 h mit PBS-TX 0,2%. Der letzte Wasch-Schritt wird mit PBS durchgeführt.

Eindecken

Zum Schluss werden die Gewebeschnitte auf herkömmlichen Objekträgern in Mowiol eingedeckt. Mowiol eignet sich gut zum Eindecken, da es bei Raumtemperatur komplett aushärtet. Danach sind die Präparate theoretisch unbegrenzt haltbar. Ein Ausbleichen der Präparate – also eine irreversible Zerstörung der Fluorochrome, vor allem durch starken Lichteinfluss – ist nicht auszuschließen. Verringert wird das Ausbleichen durch Zugabe von Triethylendiamin (DABCO), welches dem Mowiol in einer Konzentration von 25 mg/ml hinzugegeben wird. Nach Aushärten des Mowiols (über Nacht, staubgeschützt bei Raumtemperatur) können die fertigen Präparate staubgeschützt, dunkel und trocken bei 4 °C nahezu unbegrenzt gelagert werden. In Abbildung 8 ist eine gut gelungene Beispielfärbung des Bauchmarks von *Nebalia bipes* (Malacostraca) abgebildet.

Ergebnisse und Diskussion

Das serotonerge System im Bauchmark der Pancrustacea

In Bezug auf die Phylogenie der Arthropoda wurden mit Hilfe der oben erläuterten Methode der Immunhistochemie in verschiedenen Studien für das serotonerge System im Bauchmark Grundmuster für höhere Taxa postuliert (Harzsch & Waloszek 2000; Harzsch 2003, 2004).

Innerhalb der Pancrustacea liegen Grundmuster des serotonergen Systems für Entomostraca, Malacostraca, Zygentoma und Pterygota vor (Harzsch & Waloszek 2000; Harzsch 2002, 2003). Generell bestehen diese Muster aus zwei Gruppen von maximal zwei Neuronen im anterioren und posterioren Teil der Hemiganglia (Abb. 9). Die Neurone dieser Zellpaare lassen sich individuell aufgrund ihrer Lage und Morphologie identifizieren und homologisieren. Die Grundmuster von Entomostraca, Malacostraca und Zygentoma zeigen eine gleiche Anzahl von Neuronen, nämlich zwei anteriore und zwei posteriore serotonerge Zellpaare (ASZ beziehungsweise PSZ). Unterschieden werden sie nur aufgrund ihrer Neuritenmorphologie. Jedes serotonerge Neuron der Entomostraca besitzt einen ipsilateralen und einen kontralateralen Neuriten, es handelt sich somit um bipolare Neurone. Bei Malacostraca zeigen die anterioren Zellkörper einen kontralateral wandernden Neuriten,



Abb. 9 Grundmuster des serotonergen Systems im Bauchmark von Großgruppen der Pancrustacea, dargestellt an einem Hemiganglion. Bei ungefüllten Neuronen ist eine Zugehörigkeit zum Grundmuster umstritten. Gestrichelte Linie der Hemiganglien stellt die Mittellinie dar. Anterior ist oben. Modifiziert nach Harzsch (2003).

während die posterioren Zellkörper einen ipsilateralen Neuriten aufweisen. Bei Hexapoda wurden bisher basale Insekten (Zygentoma) und Fluginsekten (Pterygota) untersucht. In diesen Gruppen projizieren wiederum alle Neuriten nach kontralateral, wobei in Zygentoma je zwei ASZ und PSZ vorhanden sind. Bei den Pterygota zeigen sich nur im posterioren Bereich serotonerge Neurone. Neben den beiden PSZ ist ein zusätzliches Zellpaar im Grundmuster der Pterygota möglich, allerdings könnte dieses Zellpaar auch eine Apomorphie einzelner Pterygota sein (Harzsch 2003).

Phylogenetische Überlegungen

Vergleicht man nun diese Strukturmuster miteinander, finden sich innerhalb der Pancrustacea nur bei Entomostraca bipolare Neuronen. Malacostraca besitzen im Grundmuster lediglich monopolare Neuronen, allerdings wurden in dem Amerikanischen Hummer *Homerus americanus* (Beltz & Kravitz 1983) und in der Mauerassel *Oniscus asellus* (Thompson et al. 1994) in einzelnen Fällen Neurone nachgewiesen, bei denen sich ein primärer Neurit direkt nach dem Verlassen des Zellkörpers in einen kontralateral und einen ipsilateral projizierenden Ast aufspaltet. Bei *H. americanus* ist der ipsilaterale Neurit komplett vorhanden, während sich der zweite Neurit der Mittellinie annähert, diese aber nicht überquert. Dies könnte eine evolutionäre Transformation der bipolaren Neuronen bei Entomostraca in monopolare Neuronen bei Malacostraca bedeuten (Harzsch & Waloszek 2000). Hexapoda besitzen ausschließlich monopolare serotonerge Neuronen. Vergleiche zwischen Pancrustacea-Taxa mit monopolaren Neuronen im Strukturmuster zeigen, dass Hexapoda nur kontralaterale Projektionen ausbilden, wohingegen Malacostraca als einzige Gruppe ipsilaterale Projektionen besitzen.

Vorläufige Ergebnisse zum Nervensystem der Remipedia zeigen wie erwartet ein Strickleiternervensystem. Eine Doppelfärbung von Synapsin und Zellkernen lässt die generelle Morphologie der Ganglien erkennen (Abb. 10). Neuropilregionen im Kern der Ganglien zeigen eine Synapsin-positive Immunreaktion. Die Zellkernfärbung mit DAPI lässt hingegen Zellen im äußeren Bereich der Ganglien erkennen.

Aus Vorversuchen vermuten die Autoren, dass sich das serotonerge System der Remipedia aus einem ASZ und zwei PSZ zusammensetzt. Außerdem lassen sich in den meisten Fällen drei zentrale serotonerge Zellpaare (ZSZ) erkennen, deren Neuriten bisher nicht nachvollzogen werden konnten. Bei Zygentoma konnte ebenfalls ein ZSZ festgestellt werden. Somit besitzen lediglich Remipedia und basale Hexapoda ZSZ.

Aufgrund dieser Beobachtungen für das

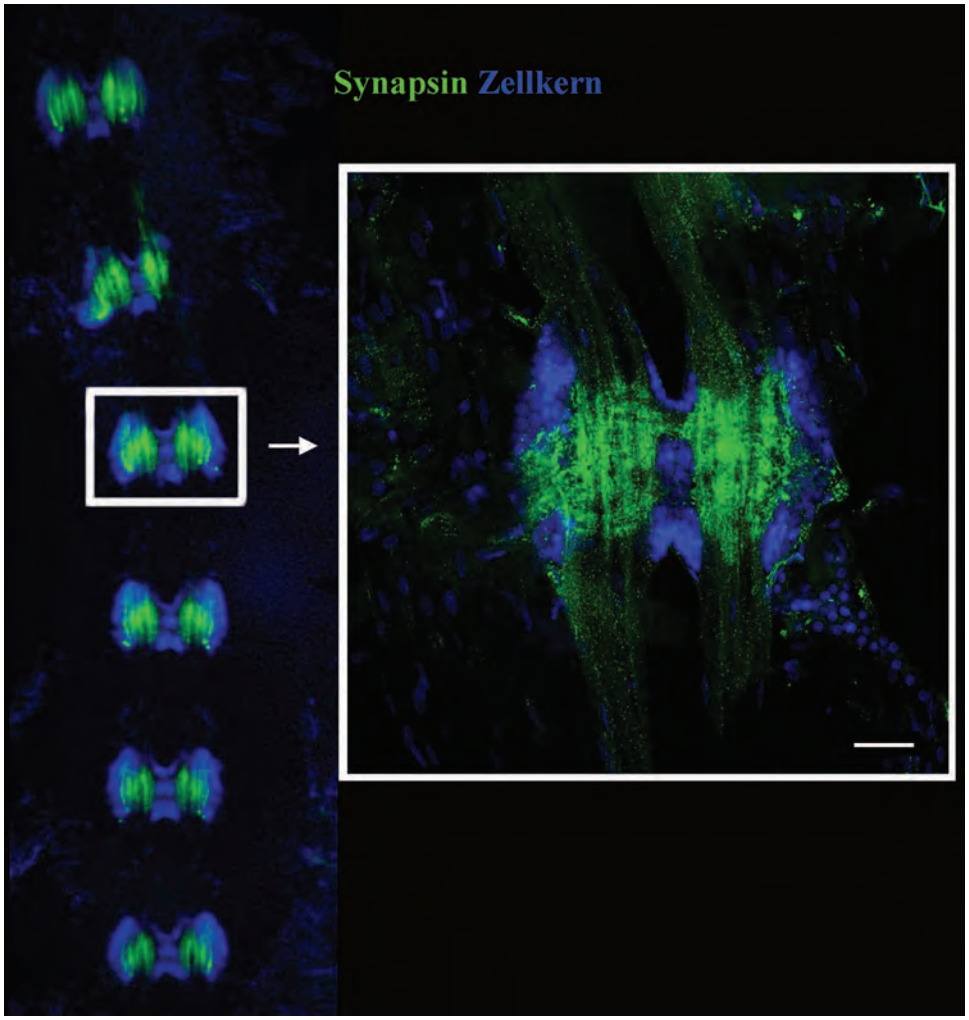


Abb. 10 Synapsin-Immunfärbung (grün) und Fluoreszenzmarkierung der DNA (blau) eines Horizontalschnittes (60 µm) durch den Rumpf von *Godzilliognomus frondosus*. Das zentrale Neuropil ist umgeben von den Zellkörpern der Neurone. Anterior ist oben. Maßstab der Vergrößerung: 50 µm.

serotonerge System der Pancrustacea (zusammengefasst in Tab. 3) lassen sich folgende Verwandtschaftsverhältnisse vermuten: Innerhalb der Pancrustacea stehen die Entomostraca als basales Taxon. In einem Schwestergruppenverhältnis dazu stehen die Malacostraca, welche wiederum einer Klade aus den Insecta (Zygentoma und Pterygota) und Remipedia gegenüberstehen (Abb. 11).

Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich eine Ähnlichkeit in den Strukturmustern der Remipedia und Hexapoda erkennen. Weitere Ähnlichkeiten zeigen sich bei der Betrachtung der ZSZ. Remipedia besitzen meist drei ZSZ. Von der Lage her sind ähnliche Zellen bei Zygentoma gefunden worden (Harzsch 2002), allerdings nur ein Zellpaar. Eine Homologisierung dieser Neurone ist aber

Tab. 3 Zusammenfassung der Merkmale des serotonergen Systems im Bauchmark für die Großgruppen der Pancrustacea. Erläuterungen: Anz. ZP: Anzahl Zellpaare; ASZ: anteriore serotonerge Zellen; k. A.: keine Angabe; k. D.: keine Daten bekannt, da keine Zellkörper vorhanden; PSZ: posteriore serotonerge Zellen; ZSZ: zentrale serotonerge Zellen.

Taxon	Bipolare Neurone	ASZ		PSZ		ZSZ	
		Anz. ZP	Projektion	Anz. ZP	Projektion	Anz. ZP	Projektion
Zygentoma	Nein	2	Kontralateral	2	Kontralateral	1	k. D.
Pterygota	Nein	0	k. A.	2 (3)	Kontralateral	0	k. A.
Malacostraca	Nein	2	Kontralateral	2	Ipsilateral	0	k. A.
Entomostraca	Ja	2	Kontra-/Ipsilateral	2	Kontra-/Ipsilateral	0	k. A.

unsicher, da die Projektionen der Neurite nicht bekannt sind. Bei alleiniger Betrachtung des serotonergen Systems im Bauchmark von Pancrustacea, bezogen auf die bestehenden Grundmuster, ist ein Schwestergruppenverhältnis von Remipedia und Hexapoda aufgrund gemeinsamer Merkmale wie konralaterale Projektionen der monopolaren PSZ und ASZ sowie das Vorhandensein von ZSZ möglich.

Schlussfolgerungen

Vor allem während der letzten 10 Jahre hat eine wachsende Anzahl phylogenetischer Analysen, die sich sowohl auf molekularbiologische Daten als auch morphologische Merkmale stützen, das Pancrustacea-Konzept untermauert (Abb. 4), wobei eine enge Verwandtschaft zwischen Remipedia, Malacostraca und Hexapoda postuliert wurde (Moura & Christoffersen 1996; Fanenbruck et al. 2004; Fanenbruck & Harzsch 2005; Ertas et al. 2009; Regier et al. 2008, 2010; Koenemann et al. 2010). Diese Tendenz spiegelt sich auch in den bisherigen Ergebnissen zum serotonergen System der Arthropoda wieder, womit die ursprünglichen Theorien einer basalen Stellung der Remipedia immer weniger unterstützt wird und eine enge Verwandtschaft dieser Grottenkrebse mit den Insekten immer wahrscheinlicher wird.

Allerdings handelt es sich bei den hier präsentierten Daten bezüglich der Remipedia um vorläufige Ergebnisse, weitere Versuche sind nötig. Des Weiteren müssen zusätzliche Taxa untersucht werden, um eine Phylogenie der Arthropoda mit Hilfe des serotonergen Systems zu bestätigen. Dazu zählen besonders Vertreter der Cephalocarida und basalen Hexapoda (Diplura, Protura, Collembola). Die Cephalocarida erscheinen in einer Vielzahl aktueller Untersuchungen als Schwestergruppe der Remipedia. Auch sind bisher keine Angaben zum serotonergen System basaler Hexapoden, wie Protura oder

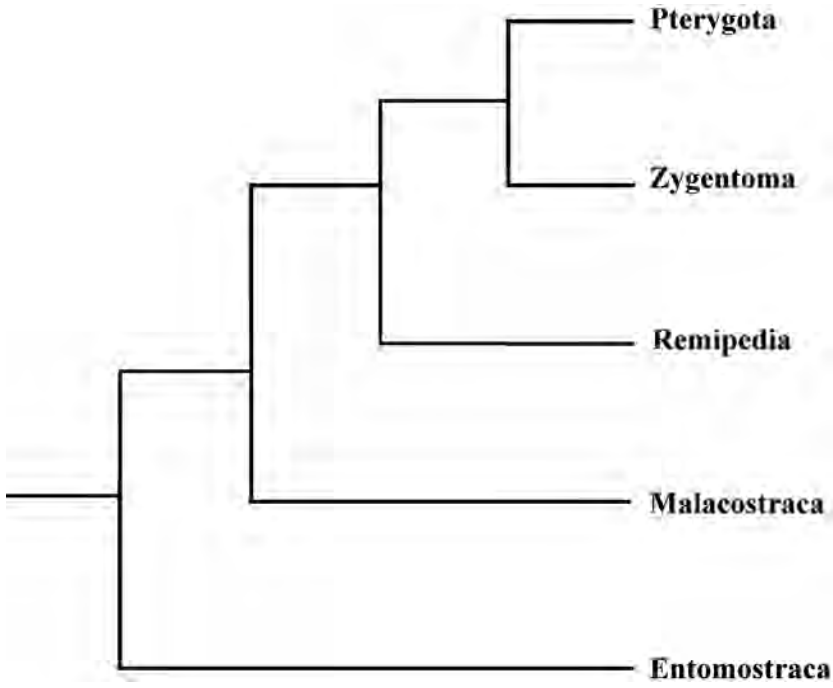


Abb. 11 Hypothetisches Abstammungsverhältnis innerhalb der Pancrustacea aufgrund immunhistologischer Darstellungen zum serotonergen System im Bauchmark. Demnach bilden Remipedia und Insecta (Zygentoma und Pterygota) eine Schwestergruppe.

Diplura, bekannt. Diese Gruppen könnten aber wichtige Daten zur weiteren Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Pancrustacea liefern. Die basalen Hexapoden sind ein wichtiges Taxon, um die Betrachtung der phylogenetischen Verhältnisse aufgrund von Merkmalen des serotonergen Systems zu vertiefen.

Außerdem muss in nachfolgenden Studien die vermutete Homologie der einzelnen serotonergen Neurone nachgewiesen werden. Taghert & Goodman (1984) konnten durch detaillierte Studien zur Zellgenealogie belegen, dass alle serotonergen Neurone im Bauchmark der Heuschrecken *Schistocerca americana* und *Melanoplus differentialis* vom Neuroblasten 7-3 gebildet werden. Aufgrund ihrer Position entsprechen diese serotonergen Neurone den PSZ innerhalb der oben beschriebenen Grundmuster. Allerdings wurde die Entstehung des serotonergen Systems bei anderen Pancrustacea mit Ausnahme von *Drosophila* (Schmid et al. 1999) nie über eine Markierung der Zellstammbäume nachgewiesen. Dies sollte in Zukunft unbedingt nachgeholt werden, um eindeutig zu klären, ob die serotonergen Neurone zu homologisieren sind.

Literatur

Ax, Peter (1999): Das System der Metazoa II. Ein Lehrbuch der phylogenetischen Systematik. – Stuttgart.

Ayali, Amir (2004): The Insect Frontal Ganglion and Stomatogastric Pattern Generator Networks. – Neurosignals 13: 20–36.

Beltz, Barbara S.; Kravitz, Edward A. (1983): Mapping of serotonin-like immunoreactivity in the lobster nervous system. – Journal of Neuroscience 3: 585–602.

Bicker, Gerd; Menzel, Randolf (1989): Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. – Nature 337: 33–39.

Edgecombe, Gregory D. (2010): Arthropod phylogeny: An overview from the perspectives of morphology, molecular data and the fossil record. – Arthropod Structure and Development 39: 74–87.

Ertas, Beyhan; von Reumont, Björn M.; Wägele, Johann Wolfgang; Misof, Bernhard; Burmester, Thorsten (2009): Hemocyanin suggests a close relationship of Remipedia and Hexapoda. – Molecular Biology and Evolution 26: 2711–2718.

Fanenbruck, Martin; Harzsch, Steffen; Wägele, Johann Wolfgang (2004): The brain of the Remipedia (Crustacea) and an alternative hypothesis on their phylogenetic relationships. – Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America 101: 3868–3873.

Fanenbruck, Martin; Harzsch, Steffen (2005): A brain atlas of *Godzilliognomus frondosus* Yager, 1989 (Remipedia, Godzilliidae) and comparison with the brain of *Speleonectes tulumensis* Yager, 1987 (Remipedia, Speleonectidae): implications for arthropod relationships. – Arthropod Structure and Development 34: 343–378.

Friedrich, Markus; Tautz, Diethard (1995): Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. – Nature 376: 165–167.

Friedrich, Markus; Tautz, Diethard (2001): Arthropod rDNA phylogeny revisited: a consistency analysis using Monte Carlo simulation. – Annales de la Société Entomologique de France 37: 21–40.

Giribet, Gonzalo; Edgecombe, Gregory D.; Wheeler, Ward C. (2001): Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. – Nature 413: 157–161.

Haeckel, Ernst Heinrich Philipp August (1866): Generelle Morphologie der Organismen: allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie. – Bd. 2, Allgemeine Entwickelungsgeschichte der Organismen. – Berlin.

Hanström, Bertil (1928): Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere unter Berücksichtigung seiner Funktion. – Berlin.

Harzsch, Steffen (2002): Neurobiologie und Evolutionsforschung: „Neurophylogenie" und die Stammesgeschichte der Euarthropoda. – Neuroforum 4: 267–273.

Harzsch, Steffen (2003): Evolution of identified arthropod neurons: the serotonergic system in relation to *engrailed*-expressing cells in the embryonic ventral nerve cord of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards 1873 (Malacostraca, Pleocyemata, Homarida). – Developmental Biology 258: 44–56.

Harzsch, Steffen (2004): Phylogenetic Comparison of Serotonin-Immunoreactive Neurons in Representatives of the Chilopoda, Diplopoda, and Chelicerata: Implications for Arthropod Relationships. – Journal of Morphology 259: 198–213.

Harzsch, Steffen (2006): Neurophylogeny: Architecture of the nervous system and a fresh view on arthropod phylogeny. – Integrative and Comparative Biology 46: 162–194.

Harzsch, Steffen; Waloszek, Dieter (2000): Serotonin-immunoreactive neurons in the ventral nerve cord of Crustacea: a character study aspects of arthropod phylogeny. – Arthropod Structure and Development 29: 307–322.

Hay-Schmidt, Anders (2000): The evolution of the serotonergic nervous system. – Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science 267: 1071–1079.

Holmgren, N. (1916): Zur vergleichenden Anatomie des Gehirns von Polychaeten, Onychophoren, Xiphosuren, Arachniden,

Crustaceen, Myriapoden und Insekten. – Kunglige Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar 56: 1–315.
Holthuis, Lipke B. (1973): Caridean shrimps found in land-locked saltwater pools at four Indo-West Pacific localities (Sinai Peninsula, Funafuti Atoll, Maui and Hawaii Islands), with the Description of One New Genus and Four New Species. – Zoologische Verhandelingen 128: 1–48.
Jenner, Ronald A. (2010): Higher-level crustacean phylogeny: Consensus and conflicting hypotheses. – Arthropod Structure and Development 39: 143–153.
Kandel, Eric R.; Schwartz, James H.; Jessell, Thomas M. (2000): Principles of neural science. – New York.
Koenemann, Stefan; Bloechl, Armin; Martínez, Alejandro; Iliffe, Thomas M.; Hoenemann, Mario; Oromí, Pedro (2009b): A new, disjunct species of *Speleonectes* (Remipedia, Crustacea) from the Canary Islands. – Marine Biodiversity 39: 215–225.
Koenemann, Stefan; Iliffe, Thomas M.; van der Ham, Joris L. (2007a): Micropacteridae, a new family of Remipedia (Crustacea) from the Turks and Caicos Islands. – Organisms Diversity and Evolution 7: 52–54.
Koenemann, Stefan; Iliffe, Thomas M.; Yager, Jill (2004): *Kaloketos pilosus*, a new genus and species of Remipedia (Crustacea) from the Turks and Caicos Islands. – Zootaxa 618: 1–12.
Koenemann, Stefan; Jenner, Ronald A.; Hoenemann, Mario; Stemme, Torben; von Reumont, Björn M. (2010): Arthropod phylogeny revisited, with a focus on crustacean relationships. – Arthropod Structure and Development 39: 88–110.
Koenemann, Stefan; Olesen, Jørgen; Alwes, Frederike; Iliffe, Thomas M.; Hoenemann, Mario; Ungerer, Petra; Wolff, Carsten; Scholtz, Gerhard (2009a): The post-embryonic development of Remipedia (Crustacea) – additional results and new insights. – Development, Genes and Evolution 219: 131–145.
Koenemann, Stefan; Schram, Frederick R.; Bloechl, Armin; Hoenemann, Mario; Iliffe, Thomas M.; Held, Christoph (2007b): Post-embryonic development of remipede crustaceans. – Evolution and Development 9: 117–121.
Koenemann, Stefan; Schram, Frederick R.; Iliffe, Thomas M. (2006): Trunk segmentation patterns in Remipedia. – Crustaceana 79: 607–631.
Kravitz, Edward A. (1988): Hormonal control of behaviour: amines and the biasing of behavioural output in lobsters. – Science 241: 1775–1781.
Luttmann, Werner; Bratke, Kai; Küpper, Michael; Myrtek, Daniel (2009): Der Experimentator: Immunologie. – Heidelberg.
Mallatt, Jon M.; Garey, James R.; Shultz, Jeffrey W. (2004): Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. – Molecular Phylogenetics and Evolution 31: 178–191.
Moura, G.; Christoffersen, Martin L. (1996): The system of the mandibulate arthropods: Tracheata and Remipedia as sister groups, "Crustacea" non-monophyletic. – Journal of Comparative Biology 1: 95–113.
Pisani, Davide; Poling, Laura L.; Lyons-Weiler, Maureen; Hedges S. Blair (2004): The colonization of land by animals: molecular phylogeny and divergence times among arthropods. – BioMed Central Biology 2: 1.
Pocock, Reginald I. (1893a): On the classification of the tracheate Arthropoda. – Zoologischer Anzeiger 16: 271–275.
Pocock, Reginald I. (1893b): On the classification of the tracheate Arthropoda – A correction. – Nature 49: 124.
Rapport, Maurice M.; Green, Andrew A.; Page, Irvine H. (1948): Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. – Journal of Biological Chemistry 176: 1243–1251.
Real, Didier; Czternasty, Gérard (1990): Mapping of serotonin-like immunoreactivity in the ventral nerve cord of crayfish. – Brain Research 521: 203–212.
Regier, Jerome C.; Shultz, Jeffrey W. (1997): Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods. – Molecular Biology and Evolution 14: 902–913.

Regier, Jerome C.; Shultz, Jeffrey W.; Ganley, Austen R.; Hussey, April; Shi, Da; Ball, Bernard; Zwick, Andreas; Stajich, Jason E.; Cummings, Michael P.; Martin, Joel W.; Cunningham, Clifford W. (2008): Resolving arthropod phylogeny: exploring phylogenetic signal within 41 kb of protein-coding nuclear gene sequence. – Systematic Biology 57: 920–938.

Regier, Jerome C.; Shultz, Jeffrey W.; Zwick, Andreas; Hussey, April; Ball, Bernard; Wetzer, Regina; Martin, Joel W.; Cunningham, Clifford W. (2010): Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. – Nature 463: 1079–1083.

Reichert, Heinrich (2000): Neurobiologie. – 2. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart.

Schmid, Aloisia; Chiba, Akira; Doe, Chris Q. (1999): Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. – Development 126: 4653–4689.

Schram, Frederick R. (1986): Crustacea. – Oxford, New York.

Schram, Frederick R.; Koenemann, Stefan (2004): Are crustaceans monophyletic? – In: Cracraft, J.; Donaghue, M.J.: Assembling the Tree of Life. – Oxford, New York.

Schram, Frederick R.; Yager, Jill; Emerson, Michael J. (1986): Remipedia, part I. Systematics. – San Diego society of Natural History Memoirs 15: 1–60.

Shultz, Jeffrey W.; Regier, Jerome C. (2000): Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear proteinencoding genes supports a crustacean – hexapod clade. – Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science 267: 1011–1019.

Snodgrass, Robert E. (1935): The principles of Insect Morphology. – New York.

Spears, Trisha; Abele, Lawrence G. (1997): Crustacean phylogeny inferred from 18S rDNA. – In: Fortey, R.A.; Thomas, R.H.: Arthropod Relationships. The Systematics Association Special Volume, 55: 169–187; London.

Stern, Michael; Knipp, Sabine; Bicker, Gerd

Glossar

anchialine Habitate Bestehen aus salzhaltigen (halinen) Wasserkörpern, welche normalerweise eine eingeschränkte Exposition zur Oberfläche und stets vorhandene, mehr oder weniger stark ausgeprägte Verbindungen zum Meer besitzen, wobei sie merklich marinen, aber auch terrestrischen Einflüssen unterliegen.

Antigen Substanz, die vom Immunsystem als fremd erkannt wird und meist eine Immunreaktion auslöst. Die Bezeichnung Antigen leitet sich von der Eigenschaft ab, die Bildung von Antikörpern auszulösen, die gegen genau diese Antigene gerichtet sind.

Antikörper Antikörper (Immunglobuline) sind Proteine, die in Wirbeltieren als Reaktion auf bestimmte Stoffe, so genannte Antigene, gebildet werden. Antikörper stehen im Dienste des Immunsystems.

Apomorphie Abgeleitetes Merkmal; evolutive Neuheit (ein in der Evolution „neu entwickeltes" Merkmal).

Arthropoda Gliederfüßer, bestehend aus Chelicerata (Kieferklauenträger), Myriapoda (Tausendfüßler), Crustacea (Krebstiere), Hexapoda (Sechsfüßer).

Entomostraca Niedere Krebse, z. B. Ruderfußkrebse, Muschelkrebse.

Epitop Der antikörperbindende Bereich eines Antigens.

Fluorochrome Moleküle, die Licht bestimmter Wellenlänge absorbieren und anschließend Licht größerer Wellenlänge und damit geringerer Energie emittieren.

Hexapoda Sechsfüßer, bestehend aus Insekten, Doppelschwänzen, Beintastlern und Springschwänzen.

Immundetektion Der Nachweis von Antigenen über antigenspezifische Antikörper.

Immunfluoreszenztechnik Zusammenfassende Bezeichnung für Techniken, bei denen Fluorochrommarkierte Antikörper zur Detektion von Molekülen oder Strukturen, die Zellen oder sonstige Zielobjekte

(2007): Embryonic differentiation of serotonin-containing neurons in the enteric nervous system of the locust (*Locusta migratoria*). – Journal of Comparative Neurology 501: 38–51.
Stock, Jan H.; Iliffe, Thomas M.; Williams, Dennis (1986): The concept "anchialine" reconsidered. – Stygologia 2: 90–92.
Taghert, Paul H.; Goodman, Corey S. (1984): Cell determination and differentiation of identified serotoninimmunoreactive neurons in the grasshopper embryo. – Journal of Neuroscience 4: 989–1000.
Thompson, Kenneth S. J.; Zeidler, Martin P.; Bacon, Jonathan P. (1994): Comparative anatomy of serotonin-like imunoreactive neurons in isopods: putative homologues in several species. – Journal of Comparative Neurology 347: 553–569.
Westheide, Wilfried; Rieger, Reinhard M. (2007): Spezielle Zoologie. – Stuttgart, Jena.
Wills, Matthew A. (1997): A phylogeny of recent and fossil Crustacea derives from morphological characters. – In: Fortey, R. A.; Thomas, R. H.: Arthropod Relationships. – The Systematics Association Special Volume 55, 189–209; London.
Yager, Jill (1981): Remipedia, a new class of Crustacea from a marine cave in the Bahamas. – Journal of Crustacean Biology 1: 328–333.
Yager, Jill (1987): *Cryptocorynetes haptodiscus*, new genus, new species, and *Speleonectes benjamini*, new species, of remipede crustaceans from anchialine caves in the Bahamas, with remarks on distribution and ecology. – Proceedings Biological Society Washington 100: 302–320.
Yager, Jill (1989): *Pleomothra apletocheles* and *Godzilliognomus frondosus*, two new genera of remipede crustaceans (Godzilliidae) from anchialine caves in the Bahamas. – Bulletin Marine Science 44: 1195–1206.
Yager, Jill; Schram, Frederick (1986): *Lasionectes entrichoma*, n. gen., n. sp. (Crustacea, Remipedia) from anchialine caves in the Turks and Caicos, B.W.I. – Proceedings of the Biological Society Washington 99: 65–70.

charakterisieren, verwendet werden. Grob unterschieden werden direkte (Primärantikörper ist bereits markiert) und indirekte (Markierung an Sekundär- oder Tertiärreagenzien) Techniken.

Invertebrata Wirbellose, z. B. Schwämme, Würmer, Weichtiere.

ipsilateral Auf derselben Körperseite oder -hälfte gelegen.

Klade Zweig(e) in einem Stammbaum.

kontralateral Auf der entgegengesetzten Körperseite oder -hälfte gelegen.

Malacostraca Höhere Krebse, z. B. Garnelen, Krabben, Hummer.

Phylogenie Die Evolutionsgeschichte einer Art oder einer Artengruppe, besonders im Hinblick auf Abstammungslinien und die Beziehungen zwischen Großgruppen von Organismen. Die Neurophylogenie steht für eine Verknüpfung von neurobiologischen Fragestellungen mit evolutiven Aspekten.

Serotonin Ein biogenes Amin, das als Gewebshormon und Neurotransmitter in zahlreichen Lebewesen nachgewiesen werden konnte und u. a. im Nervensystem, Herz-Kreislauf-System und im Blut vorkommt.

Synapsine Spezielle Proteine des präsynaptischen Bereichs von Nervenzellen, welche die Neurotransmittervesikel an Komponenten des Zytoskeletts (Zellskelett) verankern können.

Vibratom Gerät zur Anfertigung von Gewebeschnitten. Hierbei wird eine Rasierklinge in wässrigem Medium (PBS) durch das Präparat geführt. Dabei vibriert die Klinge, wodurch sich eine saubere Schnittfläche ergibt, außerdem werden Scherkräfte durch geringe Stauchung des Präparates minimiert.

Danksagungen

Ein herzlicher Dank gilt Prof. Thomas M. Iliffe (Texas A&M University, Galveston, USA) und seinem Team für die Beschaffung der Remipedia, sowie allen Mitgliedern der beteiligten Arbeitsgruppen, speziell Jakob Krieger, Dipl.-Biol. Verena Rieger und Dr. Sabine Knipp. Der Arbeitsgruppe um Prof. Stefan Richter (Universität Rostock) gebührt Dank für anregende Gespräche und Diskussionen.

Arbeit eingereicht: 06.04.2010
Arbeit angenommen: 30.06.2010

Anschriften der Verfasser:

Torben Stemme,
Prof. Dr. Stefan Koenemann
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Tierökologie und Zellbiologie
Bünteweg 17d
30559 Hannover

Prof. Dr. Gerd Bicker
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Physiologie, Abteilung Zellbiologie
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Prof. Dr. Steffen Harzsch
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Zoologisches Institut, Abteilung Cytologie und Evolutionsbiologie
Johann-Sebastian-Bach-Straße 11/12
17487 Greifswald

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Naturhistorica - Berichte der Naturhistorischen Gesellschaft Hannover

Jahr/Year: 2010

Band/Volume: 152

Autor(en)/Author(s): Stemme Torben, Bicker Gerd, Harzsch Steffen, Koenemann Stefan

Artikel/Article: Die rätselhaften Grottenkrebse der Blue Holes - Sind Remipedia primitive Crustaceen oder schwimmende Insekten? 7-28