

Zur Phylogenie der Nemertea:
Vergleichende Untersuchungen der Reproduktion
und Entwicklung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörn von Döhren
aus Berlin

November 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Hausmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Bartolomaeus

Datum der Disputation: 19.12.2008

Danksagung

Allen denjenigen, die mich bei der Forschungsarbeit zu meiner Dissertation unterstützt haben, möchte ich meinen Dank aussprechen. Dazu gehört Dr. S. Maslakova, die mir in Friday Harbor alles über die Zucht von Nemertinenlarven beigebracht hat und die anderen dort arbeitenden Leute (Jeannie and Aimee, among others), wie auch die „Nemertinologen“ auf der ganzen Welt, die mich sehr motiviert und inspiriert haben.

Dazu danke ich den Kollegen aus dem Diplomandenzimmer, Janina Lehrke, Dominik Kieselbach, Fabian Kilpert und Sabine Hoffmann, Patrick Beckers wie auch allen anderen, denen zu danken mir die Zeit fehlt, für ein tolles Arbeitsklima und dass sie mich die letzte Zeit ausgehalten haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Björn Quast und Dr. Markus Koch, für mehr als nur seelische Unterstützung. Ich bin ihnen sehr verpflichtet.

Abschließend möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Klaus Hausmann danken für den recht spontanen Entschluss, mich als Gastforscher zu „adoptieren“, sowie Herrn Prof. Dr. Thomas Bartolomaeus, dass er mich auch von seiner neuen Arbeitsstelle aus tatkräftig in der Forschung unterstützt hat.

Die aufgelisteten Manuskripte/Publicationen sind im Zuge der Dissertation entstanden. Anteile an der Erstellung sind vermerkt.

Manuskript 1 Beckers P, J von Döhren & T Bartolomaeus (zur Publikation angenommen)
Reproduction in *Lineus viridis* (Heteronemertea) indicates pheromone mediated mating behaviour. Marine Biology

Anteile an der Arbeit: P. Beckers 50% (Experimente, Entwurf)
J. von Döhren 45% (Histologie, Freilanddaten, Manuskript)
T. Bartolomaeus 5% (Idee, Bearbeitungshinweise)

Manuskript 2 Döhren, J von & T Bartolomaeus (2006) Ultrastructure of sperm and male reproductive system in *Lineus viridis* (Heteronemertea, Nemertea). Zoomorphology 125: 175-185

Anteile an der Arbeit: J. von Döhren 80% (part. Ultrastruktur, Histologie, Manuskript)
T. Bartolomaeus 20% (part. Ultrastruktur, Entwurf)

Manuskript 3 Döhren, J von (im "review"-Verfahren) Fate of the larval epidermis in the intracapsular larva of *Lineus viridis* (Heteronemertea, Nemertea). Invertebrate Biology

Anteile an der Arbeit: J. von Döhren 100%

Manuskript 4 Döhren, J von & T Bartolomaeus (2007) Ultrastructure and development of the rhabdomic eyes in *Lineus viridis* (Heteronemertea, Nemertea). Zoology 110: 430-438

Anteile an der Arbeit: J. von Döhren 75% (part. Ultrastruktur, Manuskript)
T. Bartolomaeus 25% (Entwurf, part. Ultrastruktur)

Manuskript 5 Döhren, J von, P Beckers, R Vogeler & T Bartolomaeus (eingereicht)
Comparative sperm ultrastructure in Nemertea. Journal of Morphology

Anteile an der Arbeit: J. von Döhren 50% (part. Ultrastruktur, Analyse, Manuskript)
P. Beckers 20% (part. Ultrastruktur)
R. Vogeler 15% (part. Ultrastruktur)
T. Bartolomaeus 15% (Entwurf, part. Ultrastruktur)

Manuskript 6 Maslakova S & J von Döhren (zur Publikation angenommen) Larval development with transitory epidermis in *Paranemertes peregrina* Coe, 1901 and other hoplonemertean (Phylum Nemertea). Biological Bulletin

Anteile an der Arbeit: S. Maslakova 80% (part. cLSM, Histologie, Manuskript)
J. von Döhren 20% (part. cLSM, Ultrastruktur)

Manuskript 7 Bartolomaeus T, S Maslakova & Döhren, J von (eingereicht) Head kidneys in the planuliform larvae of *Procephalothrix filiformis* and *Carinoma mutabilis* (Nemertea).

Canadian Journal of Zoology

Anteile an der Arbeit: T. Bartolomaeus 50% (draft, part. Ultrastruktur)
J. von Döhren 40% (part. Ultrastruktur, Manuskript)
S. Maslakova 10% (Zucht, Manuskript Korrektur)

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie der Nemertea	1
1.2	Systematik der Nemertea	2
1.3	Phylogenetische Stellung der Nemertea und Arbeitshypothesen.....	4
1.4	Aufgaben und Ziele der Arbeit.....	5
2	Material und Methoden	7
2.1	Untersuchte Arten	7
2.2	Zucht und Hälterung.....	7
2.3	Fixierungen.....	8
2.4	Konfokale Laserscan-Mikroskopie (cLSM).....	9
2.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	10
2.6	Aufbau der Dissertation	10
3	Veröffentlichte oder zur Publikation eingereichte Ergebnisse	13
3.1	Die Reproduktion von <i>Lineus viridis</i> (Heteronemertea) weist auf pheromon- vermitteltes Paarungsverhalten hin	13
3.2	Ultrastruktur der Spermien und männlichen Gonaden von <i>Lineus viridis</i> (Heteronemertea).....	18
3.3	Das Schicksal der larvalen Epidermis der intrakapsulären Larve von <i>Lineus viridis</i> (Heteronemertea, Nemertea)	24
3.4	Ultrastruktur und Entwicklung der rhabdomerischen Augen von <i>Lineus viridis</i> (Heteronemertea, Nemertea)	30
3.5	Vergleichende Ultrastruktur der Spermien von Nemertinen.....	34
3.6	Larvalentwicklung mit transitorischer Epidermis von <i>Paranemertes peregrina</i> und anderen Hoplonemertinen (Nemertea)	39
3.7	Kopfnieren der planuliformen Larven von <i>Procephalothrix filiformis</i> und <i>Carinoma</i> <i>mutabilis</i> (Nemertea).....	45

4	Unveröffentlichte Ergebnisse	49
4.1	Entwicklung der Muskulatur	49
4.1.1	<i>Procephalothrix oestrymnicus</i> Junoy & Gibson, 1991 („Palaeonemertea“).....	49
4.1.2	<i>Lineus viridis</i> (Müller, 1774) (Heteronemertea)	53
4.1.3	<i>Paranemertes peregrina</i> Coe, 1901 (Hoploneurtea)	56
4.1.4	<i>Carinoma mutabilis</i> Griffin, 1898 („Palaeonemertea“)	58
4.1.5	Bewertung der Befunde.....	60
4.2	Ultrastruktur der Augen	63
4.2.1	<i>Carinoma mutabilis</i> Griffin, 1898 („Palaeonemertea“)	63
4.2.2	<i>Procephalothrix oestrymnicus</i> Junoy & Gibson, 1991 („Palaeonemertea“).....	65
4.2.3	<i>Paranemertes peregrina</i> Coe, 1901 (Hoploneurtea).....	68
4.2.4	Bewertung der Befunde.....	70
5	Diskussion	75
5.1	<i>Lineus viridis</i> (Heteronemertea).....	75
5.2	Vergleichende Spermienultrastruktur – Bedeutung für die Nemertinen-Phylogenie ...	76
5.3	Merkmale der larvalen Organisation.....	77
5.3.1	Metamorphose.....	77
5.3.2	Planuliforme Larve.....	78
5.3.3	Muskeldifferenzierung	79
5.3.4	Augen	79
5.3.5	Protonephridiale Kopfnieren	80
5.4	Phylogenetische Stellung der Nemertea.....	80
5.4.1	Nemertea als Schwestergruppe der Plathelminthes	81
5.4.2	Nemertea: eine Teilgruppe der Trochozoa oder deren Schwestergruppe?.....	82
6	Zusammenfassung.....	85
7	Summary	86
8	Literaturverzeichnis.....	87

Anhang

Manuskript 1 Beckers P, J von Döhren & T Bartolomaeus (zur Publikation angenommen) Reproduction in *Lineus viridis* (Heteronemertea) indicates pheromone mediated mating behaviour. Marine Biology

Manuskript 2 Döhren, J von & T Bartolomaeus (2006) Ultrastructure of sperm and male reproductive system in *Lineus viridis* (Heteronemertea, Nemertea). Zoomorphology 125: 175-185

Manuskript 3 Döhren, J von (im "review"-Verfahren) Fate of the larval epidermis in the intracapsular larva of *Lineus viridis* (Heteronemertea, Nemertea). Invertebrate Biology

Manuskript 4 Döhren, J von & T Bartolomaeus (2007) Ultrastructure and development of the rhabdomic eyes in *Lineus viridis* (Heteronemertea, Nemertea) Zoology 110: 430-438

Manuskript 5 Döhren, J von, P Beckers, R Vogeler & T Bartolomaeus (eingereicht) Comparative sperm ultrastructure in Nemertea. Journal of Morphology

Manuskript 6 Maslakova S & J von Döhren (zur Publikation angenommen) Larval development with transitory epidermis in *Paranemertes peregrina* Coe, 1901 and other hoplonemerteans (Phylum Nemertea). Biological Bulletin

Manuskript 7 Bartolomaeus T, S Maslakova & Döhren, J von (eingereicht) Head kidneys in the planuliform larvae of *Procephalothrix filiformis* and *Carinoma mutabilis* (Nemertea). Canadian Journal of Zoology

Aus urheberschutzrechtlichen Gründen sind die Manuskripte/Publicationen **nicht** in der elektronischen Veröffentlichung der Dissertationsschrift enthalten. Sie sind aus den entsprechenden Fachzeitschriften zu entnehmen.

1 Einleitung

Nemertea sind ein Taxon nachtaktiver räuberischer Organismen, dem etwa 1000 Arten angehören (Gibson 1995). Die meisten dieser Tiere sind getrennt geschlechtlich und bewohnen marine Habitate. Dort haben sie alle Bereiche besiedelt, vom Sandlückensystem bis ins Pelagial; die meisten Arten sind benthisch. Wenigen, fast ausschließlich nur einer Teilgruppe, den Hoplonemertea, angehörenden Arten ist die Immigration in limnische und terrestrische Habitate gelungen, die überwiegend in den Tropen und Subtropen gelegen sind. Das Größenspektrum dieser wurmförmigen, unsegmentierten Organismen reicht von wenigen Millimetern bei Sandlückenbewohnern bis zu 30 m Länge bei *Lineus longissimus* (Gunnerus, 1770). Der überwiegende Teil der Tiere entwickelt sich über verschiedene Larvenformen, von denen das Pilidium aufgrund ihrer sogenannten katastrophalen Metamorphose (Cantell 1966) die bekannteste ist. Es gibt aber auch intrakapsuläre Larven bei den Arten *Lineus viridis* (Müller, 1774) und *Lineus ruber* (Müller, 1774), die sich innerhalb einer Eimembran entwickeln. Die meisten Hoplo- und „Palaeonemertea“ entwickeln sich über eine planuliforme (auch: planuloide) Larve, die sich durch eine vorgeblich sehr einfache, kompakt organisierte Form auszeichnet.

1.1 Anatomie der Nemertea

Einen fundierten Überblick über die Anatomie der Nemertea geben Gibson (1972) und Friedrich (1979). Der Körperbau ist verhältnismäßig einfach. Die Adulttiere weisen einen durchgehenden Darmkanal auf, der von einem Hautmuskelschlauch mit unterschiedlich orientiertem Faserverlauf umgeben ist. Eine Ring- und eine Längsmuskelschicht, wie für das Grundmuster der Bilateria postuliert, ist immer vorhanden. Die Anzahl und Orientierung zusätzlicher Muskelschichten stellt ein wichtiges taxonomisches Merkmal dar und ist in den unterschiedlichen Großgruppen verschieden. Ebenfalls von taxonomischer Bedeutung ist die Lage der lateralen Neuropile relativ zu den Muskelschichten. Während die meisten „Palaeonemertea“ insgesamt bis zu drei Muskelschichten aufweisen und die Lateralnervenstränge außerhalb des Hautmuskelschlauches verlaufen, ist in Cephalothriciden, Hoplonemertinen und Bdellonemertinen ein nur zweischichtiger Hautmuskelschlauch ausgebildet. Die lateralen Neuropile liegen bei diesen Gruppen innerhalb der inneren Längsmuskelschicht (Cephalothricidae) oder sogar unterhalb des Hautmuskelschlauches

(Hoploneurinen, Bdelloneurinen). Bei Heteroneurinen sind drei Muskelschichten ausgebildet, wobei die äußere aus Muskeln mit longitudinal verlaufenden Muskelfasern besteht. In dieser Gruppe liegen die Lateralnervenstränge zwischen der äußeren und der mittleren, zirkulär verlaufenden Muskelschicht. Frontal ist ein Cerebralganglion ausgebildet, welches nicht den Schlund, sondern die Rüsselinserion hinter dem Rhynchoporus umfasst. Unterhalb des Hautmuskelschlauchs befindet sich ein endothelial ausgekleidetes Blutgefäßsystem. Es verläuft in zwei Hauptgefäßen an den Körperseiten entlang und ist frontal und caudal zu einem Ring verbunden. Je nach Art sind zusätzliche Gefäße ausgebildet. Der Gefäßwand liegen Protonephridien auf, oder sie durchdringen sie und nehmen Kontakt mit dem Gefäßlumen auf, so dass sie vom „Blut“ der Tiere umspült werden. Entlang des Mitteldarms liegen, zuweilen abwechselnd mit Mitteldarmdivertikeln serielle Gonadensäckchen mit meist einfach strukturierten Ausgängen. Dorsal des Darms befindet sich ein Rüsselsystem, das zum Beutefang genutzt wird. Im Rhynchocoel, einem flüssigkeitserfüllten, endothelialisierten, blind endenden Schlauch, dessen Wand mit Muskulatur ausgestattet ist, liegt der Rüssel. Morphologisch handelt es sich bei ihm um eine schlauchförmige Einstülpung des frontalen Körperpols, der muskulös ist und an seinem caudalen Ende mit einem Retraktormuskel im Rhynchocoel verankert ist. Er kann mittels Erhöhung des Rhynchocoeldrucks handschuhfingerartig ausgestülpt werden, um Beutetiere zu erlegen. Während er bei den „Anopla“ (Heteroneuritea und „Palaeoneuritea“ sowie Bdelloneuritea und einigen Hoploneuritea einheitlich gebaut ist, weist er bei den meisten Hoploneurinen der Länge nach eine Dreiteilung auf, mit einem Stilet auf einer muskulösen Basis in der Mitte. In der Nähe des Stilettes liegen laterale Taschen, die mehrere Reservestilette beinhalten können. Eine weitere Besonderheit der Anopla (Hoploneuritea & Bdelloneuritea) ist die Fusion von Mund und Rüsselporus, die zu einer Struktur führt, die als Rhynchodaeum (auch Rhynchostomodaeum) bezeichnet wird. Bei den Bdelloneuritea mündet der Rüssel in den fassförmigen Vorderdarm.

1.2 Systematik der Nemertea

Die traditionelle Klassifikation des Taxons (Coe 1943, Iwata 1960) stützt sich zur Einteilung der Großgruppen (Klassen- und Ordnungsniveau) auf die bereits erwähnten Merkmale des Hautmuskelschlauches, der lateralen Neuropile und der Rüsselbewaffnung. Nach Coe (1943) werden sie in zwei Klassen eingeteilt: Anopla, die die Ordnungen Palaeoneuritea und

Heteronemertea enthält und sich durch separate Öffnungen von Mund und Rüssel auszeichnet, und Enopla, bei denen es nur eine terminale Öffnung für Mund und Rüssel gibt. Letztere enthalten die Ordnungen Hoplonemertea und Bdellonemertea, die nur durch die Gattung Malacobdella repräsentiert werden. Obwohl eine dichotome Verzweigung vorgebend ist dies kein phylogenetisches System.

Aufgrund neuerer Studien mit molekularen Daten über ein breites *taxon sampling* hinweg lassen sich zwei Monophyla innerhalb der Nemertea zweifelsfrei identifizieren, die Hoplonemertea und die Heteronemertea (Sundberg et al. 2001, Thollesson & Norenburg 2003) (Abb. 1.1). Diese beinhalten den Großteil der Arten des Taxons, sind aber in ihrer inneren Topologie nicht aufgelöst. Thollesson & Norenburg (2003) stellen in ihrer Arbeit die Bdellonemertea in die Hoplonemertea, so dass die Namen Enopla und Hoplonemertea danach synonym zu verwenden sind. Die Verwandtschaftsverhältnisse der Teilgruppen der „Palaeonemertea“, die Tubulanidae, Carinomidae, Cephalothricidae und Hubrechtellidae (auch Hubrechtidae), die in der traditionellen Klassifikation Familienrang einnehmen, stellen sich in beiden Arbeiten unterschiedlich dar, die Autoren sind sich aber einig, dass es sich um eine paraphyletische Gruppierung basal abzweigender Taxa handelt (Abb. 1.1).

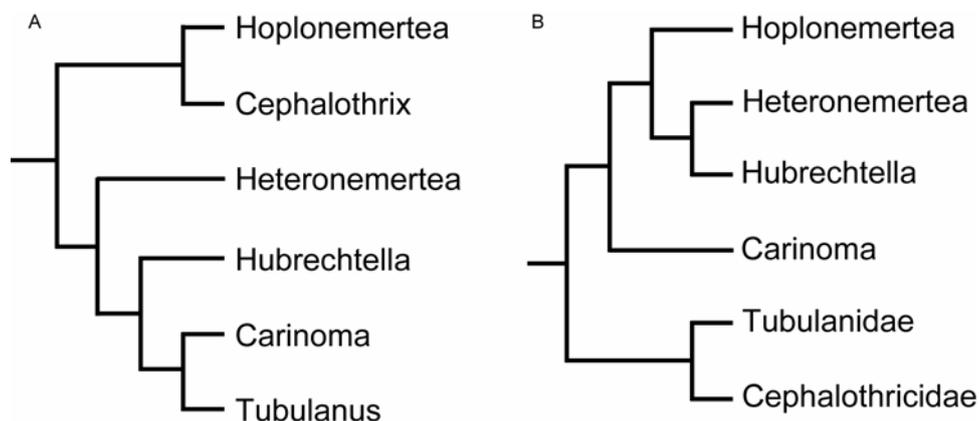


Abbildung 1.1: Phylogenie der Nemertea nach molekularen Daten. **A.** Verwandtschaftsbeziehungen nach Sundberg et al. 2001. **B.** Verwandtschaftsbeziehungen nach Thollesson & Norenburg 2003. (verändert aus Sundberg et al. 2001, Thollesson & Norenburg 2003)

1.3 Phylogenetische Stellung der Nemertea und Arbeitshypothesen

Die oben detailliert beschriebenen Merkmale, insbesondere der dorsal gelegene Rüsselapparat, die besondere Struktur des anterioren Nervensystems und das endothelialisierte laterale Blutgefäßsystem, weisen die Nemertea in jedem beliebigen Außengruppenvergleich als Monophylum aus. Da ihre Embryonalentwicklung eine typische Spiralfurchung aufweist, sind sie eindeutig den Spiralia zuzurechnen. Welche der Taxa innerhalb der Spiralia ihre nächsten Verwandten darstellt, ist nicht gesichert. Zurzeit werden drei Verwandtschaftshypothesen kontrovers diskutiert. Wesentliches Anliegen der Arbeit ist der Versuch, diese Hypothesen zu prüfen.

(1) Nemertea und Plathelminthes sind Schwestergruppen: Diese Annahme stützt sich auf die weitgehend acoelomate Körperorganisation der Nemertea sowie das Auftreten eines Pilidiums in der Entwicklung. Diese Merkmale werden aufgrund der Trochea-Theorie (Nielsen 1985) als gemeinsame Merkmale der Nemertea und Plathelminthes aufgefasst. Dabei ist kritisch anzumerken, dass das Fehlen von Chitin und die acoelomate Organisation der Körpergewebe als ursprüngliche Merkmale innerhalb der Bilateria gelten und daher als Merkmale zur Begründung eines Schwestergruppenverhältnisses ungeeignet sind (Bartolomaeus 1993, Ax 1996, Jenner 2004). Die larvalen Merkmale sind nur dann anwendbar, wenn davon ausgegangen wird, dass die Larven der Polycladen und das Pilidium der Heteronemertea homolog sind. Dies ist aufgrund der existierenden Informationen zum System der Plathelminthes sowie auch der Nemertea zu bezweifeln (Diskussion in Jenner 2004). Ein Hautmuskelschlauch, der neben äußerer Ring- und innerer Längsmuskulatur auch eine Schicht mit diagonal verlaufender Muskulatur aufweist (Hooge 2001), und die Bildung der ersten pigmentierten Augen als cerebrale Photorezeptoren, die unabhängig von der Epidermis entstehen (Morris et al 2004, Cardona et al 2005), gelten als zweifelsfrei apomorphe Merkmalskomplexe der Plathelminthes. Ein Schwestergruppenverhältnis zu den Nemertinen lässt erwarten, dass sie vergleichbare Merkmale aufweisen.

(2) Nemertea als Schwestergruppe der Trochozoa: Diese Hypothese wird mit einem durchgehenden Darmkanal und einem biphasischen Lebenszyklus mit planktischer Larve und einem benthischen Adultus begründet. Diese Merkmale stellen, bezogen auf das hypothetische Grundmuster der Bilateria, Neuerwerbungen der Trochozoa dar (Bartolomaeus 1993, Ax 1996). Es ist jedoch auch hier zu bemerken, dass sich die Polarität der Merkmale

auf vorgeordnete Verwandtschaftshypothesen stützt (Jenner 2004), nach denen ein sackförmiger Darm, eine direkte Entwicklung und monociliäre Epidermiszellen zum Grundmuster der Spiralia gehören. Damit ist die Annahme einer konvergenten Evolution des durchgehenden Darms in der Stammlinie der Radialia zwingend (Ax 1996). Der für die Palaeonemertinen-Art *Carinoma tremaphoros* Thompson, 1900 nachgewiesene spurenhafte Prototroch wäre dieser Annahme nach ein Vorläufer des Prototrochs der Trochozoa. Im Gegensatz zu den ersten pigmentierten Augen der Plathelminthen bilden sich diejenigen der Mollusken und Anneliden als epidermale Derivate, und die Muskulatur der Larve der Trochozoa besitzt keine diagonale Fasern. Ist dies bei den Larven der Nemertea zu beobachten, wäre dieser Hypothese der Vorzug zu geben. Ein weiterer Merkmalskomplex, der in diesem Zusammenhang zu untersuchen ist, betrifft die larvalen Protonephridien. Diese sind in den Trochozoen als Kopfnieren mit spezifischem Aufbau und Position im Körper ausgebildet. Werden diese Merkmale in larvalen Protonephridien der Nemertea entdeckt, unterstützt das ein Schwestergruppenverhältnis der Nemertea zur Gruppe der Trochozoa.

(3) Nemertea sind Schwestergruppe der Anneliden: Neben der Gonocoeltheorie (Goodrich 1945), die mittlerweile als widerlegt gelten kann (Bartolomaeus 1999), stützt sich diese Hypothese auf die ähnliche Position und Ultrastruktur der Wandung von Coelomräumen der Annelida und Blutgefäßen der Nemertea, die von manchen Autoren daher als homolog betrachtet werden (Ruppert & Carle 1983; Turbeville & Ruppert 1985; Turbeville 1986, 2002). Mit Ausnahme der Gonaden gibt es jedoch bisher keinen Hinweis auf repetitive Organe bei Nemertinen (vgl. Bartolomaeus 1988), so dass die Hypothese umfangreiche Merkmalstransformationen erfordert. Die Bewertung der Homologie der Coelomräume der Annelida und des Blutgefäßsystems der Nemertea stellt die einzige Möglichkeit dar, die Stellung der Nemertea zu dieser Teilgruppe der Trochozoa zu klären.

1.4 Aufgaben und Ziele der Arbeit

Der Grund für die bislang ungeklärte Stellung der Nemertea im System der Metazoa liegt zum einen darin, dass viele Details in der Morphologie und Ultrastruktur von Arten der basal abzweigenden, als Palaeonemertinen klassifizierten Gruppen nicht hinreichend untersucht sind, zum anderen aber auch darin, dass die Verwandtschaftsbeziehungen an der Basis der Nemertea nicht befriedigend aufgelöst sind. Da alle grundmusterbasierten Ansätze zur

Aufdeckung der Stellung der Nemertea (Ax 1996, Nielsen 2001) aber gerade den Merkmalen dieser Gruppen besondere Aufmerksamkeit zuwenden müssen, tut sich hier eine eklatante Informationslücke auf. Aber auch die taxon-/spezies-basierten Ansätze mit molekularen oder kladistischen Methoden tun sich mit der Auswahl relevanter Taxa schwer, wenn unklar ist, ob die ausgewählten Arten basal abzweigende Gruppen repräsentieren oder nicht. Insofern hatte diese Arbeit zunächst einmal zum Ziel, durch die Untersuchung unterschiedlicher Organsysteme insbesondere bei Arten der palaeonemertinen Taxa, eine bessere Informationsdichte zur Ultrastruktur und Entwicklung ausgewählter Organsysteme zu erzielen. Auf dieser Grundlage sollten zwei Aufgaben angegangen werden: (1) Die erhobenen Daten sollten die Auflösung innerhalb der Nemertinen verbessern oder zumindest die vorhandenen molekularen Nemertinen-Phylogenien durch morphologische Daten besser stützen, und (2) die Stellung der Nemertea innerhalb der Spiralia sollte besser begründet werden.

Die Vorgehensweise war daher die folgende. Den formulierten Erwartungen entsprechend wurden die Ultrastruktur der ersten pigmentierten Augen und der larvalen Protonephridien sowie die Myogenese als zu untersuchende Merkmalskomplexe gewählt. Für die Innengruppe wurden mit *Lineus viridis* eine Heteronemertea-Art und mit *Paranemertes peregrina* eine Hoplonemertinen-Art zu Vergleichszwecken gewählt. Mit *Carinoma mutabilis*, *Procephalothrix ostrymnicus* und *P. filiformis* wurden zwei Vertreter basal abzweigender Taxa untersucht. Im Laufe der Bearbeitung zeigte sich, dass Spermiendaten eine hinreichend große Variabilität homologer Substrukturen zur Bewertung der Innengruppenverhältnisse der Nemertea aufweisen, so dass hier mit einem breiten Ansatz vergleichend Daten erhoben wurden. Zudem wurden für die bearbeitete einheimische Art *Lineus viridis* signifikante Wissenslücken hinsichtlich ihrer Biologie deutlich, die es ebenfalls zu schließen galt.

Der Aufbau der Arbeit beginnt daher mit *Lineus viridis*, beschreibt Details zur Reproduktion und zur Ultrastruktur der Gameten gefolgt von Befunden zur Entwicklung und Genese der nach den Erwartungen ausgewählten Organsysteme. Von hier aus vergleicht sie Spermien einer großen Anzahl von Arten mit der Zielsetzung eine Auflösung innerhalb der Nemertea zu erzielen gefolgt von dem Vergleich der Untersuchungsergebnisse an *L. viridis* mit entsprechenden Untersuchungen oben erwähnter Arten anderer Nemertineilgruppen. Die für die vorliegende Dissertation zugrunde gelegten Publikationen und Manuskripte sind jeweils zusammengefasst und um Originaldaten zu den Augen und der Myogenese erweitert.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchte Arten

Es wurden 5 Nemertinen-Arten untersucht, von denen 3, *Carinoma mutabilis* Griffin, 1898, *Procephalothrix filiformis* (Johnston, 1828) und *Procephalothrix oestrymnicus* Junoy & Gibson, 1991, zu den „Palaeonemertea“ gehören. *Lineus viridis* (Müller, 1774) ist ein Vertreter der Heteronemertea und *Paranemertes peregrina* Coe, 1901 der Hoplonemertea. Geschlechtsreife Adulttiere von *C. mutabilis* und *P. peregrina* wurden Ende Januar, Anfang Februar 2007 bei Niedrigwasser in den Sandflächen von False Bay, San Juan Island, WA, USA gesammelt. Während *P. peregrina* im oberen Eulitoral von der Oberfläche abgesammelt werden kann, musste nach *C. mutabilis* im unteren Eulitoral gegraben werden. Geschlechtsreife Individuen von *L. viridis* wurden bei nächtlichem Niedrigwasser im März und April der Jahre 2006 und 2008 im oberen bis mittleren Eulitoral von der Oberfläche des Mischwatts vor dem Lister Haken auf Sylt gesammelt. Im gleichen Zeitraum sind in diesem Gebiet unter flachen Steinen Knäule geschlechtsreifer Individuen von *P. filiformis* zu finden. Geschlechtsreife Tiere der Art *P. oestrymnicus* wurden im April 2006 und Mai 2007 am Strand von Pointe la Jument nahe Concarneau in Frankreich gefunden. Sie befinden sich dort in Aggregationen aus mehreren Männchen und Weibchen unter mittelgroßen Steinen im mittleren Eulittoral auf grobem Sand.

2.2 Zucht und Hälterung

Die Zucht und Hälterung von Larven von *Paranemertes peregrina* ist in Maslakova & Döhren (angenommen, siehe Anhang, Manuskript 6) beschrieben.

Bei *Carinoma mutabilis* und *Procephalothrix oestrymnicus* wurden die Eier künstlich fertilisiert. Nachdem reife Eizellen aus den Weibchen präpariert und in einer mit gefiltertem Seewasser gefüllten Glasschale kompetent gemacht wurden, erfolgte die Befruchtung mittels einer Spermien suspension. Vom 2. Tag nach der Befruchtung an wurden die sich entwickelnden Larven in großen Volumina (*C. mutabilis* in ca. 4l, *P. oestrymnicus* in ca. 1l) gefilterten Seewassers unter leichter Bewegung des Wassers bei 10-11° C gehältert. Der Wasserwechsel erfolgte bei *P. oestrymnicus* täglich und bei *C. mutabilis* jeden 3.Tag. Da

nicht bekannt ist, wovon sich die Larven dieser Arten ernähren, blieben Fütterungsversuche weitgehend erfolglos.

Bei den Untersuchungen an *L. viridis* wurden Larven aus natürlichen Eiablagen im Labor verwendet (Döhren & Bartolomaeus 2007, siehe Anhang, Manuskript 4). Eigallerten wurden in mit gefiltertem Seewasser gefüllten Petrischalen aufbewahrt. Alle drei Tage wurden Wasserwechsel durchgeführt. Da sich die Larven von einem Dottervorrat ernähren, musste in der ersten Entwicklungsperiode nicht gefüttert werden. Es zeigt sich aber auch hier, dass eine weitere Hälterung aufgrund der schwierigen Nahrungsversorgung problematisch ist. Die Tiere fressen Eier von *Platynereis dumerilii* Andoïune & Milne Edwards, 1833, die jedoch nicht kontinuierlich zur Verfügung standen. Daher war eine genaue Analyse der späteren Individualentwicklung nicht möglich.

2.3 Fixierungen

Für die Markierung mit an Fluoreszenzfarbstoff konjugiertem Phalloidin/Phallacidin wurden Entwicklungsstadien in Paraformaldehyd fixiert. Die Larven von *P. peregrina* und *C. mutabilis* wurden entsprechend den Angaben von Maslakova & Döhren (angenommen, siehe Anhang, Manuskript 6) fixiert. Entwicklungsstadien von *Lineus viridis* wurden anhand eines Protokolls fixiert, das von Döhren (im „review“-Verfahren, siehe Anhang, Manuskript 3) beschrieben wird. Larven von *Procephalothrix oestrymnicus* wurden täglich vom 1. bis zum 9. Tag nach der Befruchtung fixiert. Vor der Fixierung wurden sie in 7% w/v $MgCl_2$ -Lösung, 1:1 verdünnt in Leitungswasser relaxiert, damit sich die Muskulatur beim Fixieren nicht kontrahierte. Die Fixierung mit 4% v/v Paraformaldehyd in gefiltertem Seewasser, das frisch aus einer 16%igen Stammlösung (Electron Microscopy Sciences) hergestellt wurde, dauerte 30 Minuten und erfolgte bei Raumtemperatur. Die Fixierung wurde gestoppt, indem dreimal je 10 Minuten mit salinem Phosphatpuffer (0,05M Phosphat, 0,3M NaCl; pH 7,2), mit 0,05% w/v NaN_3 versetzt, gespült wurde. In diesem Puffer konnten die Tiere auch bei Bedarf bei 4°C gelagert werden.

Die Fixierung für ultrastrukturelle Untersuchungen erfolgte bei allen Tieren in 1,25% v/v Glutaraldehyd in salinem Phosphatpuffer (0,05M Phosphat, 0,3M NaCl) auf die gleiche Weise, Einzelheiten sind bereits veröffentlichten oder eingereichten Studien zu entnehmen (Döhren im „review“-Verfahren, siehe Anhang, Manuskript 3; Döhren & Bartolomaeus 2007,

siehe Anhang Manuskript 4; Döhren et al. eingereicht, siehe Anhang, Manuskript 5; Maslakova & Döhren angenommen, siehe Anhang, Manuskript 6).

2.4 Konfokale Laserscan-Mikroskopie (cLSM)

Zur Markierung von fibrillärem Aktin wurden die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Alkaloide Phalloidin und Phalloidin eingesetzt. Die Analyse der Muskulatur erfolgte als whole-mounts (Ganz-Tier-Präparate) im konfokalen Laserscan-Mikroskop (cLSM) (LEICA TSP TCS SPE).

Die präparatorischen Einzelheiten der Aktinmarkierung der Entwicklungsstadien von *P. peregrina* sind in Maslakova & Döhren (angenommen, siehe Anhang, Manuskript 6) näher ausgeführt. Das Protokoll zur Färbung der Larvalstadien von *C. mutabilis* entsprach dem für *P. peregrina*. Für die Entwicklungsstadien von *L. viridis* wurde das Protokoll modifiziert. Die Einzelheiten der Präparation sind Döhren (im „review“-Verfahren, siehe Anhang, Manuskript 3) zu entnehmen.

Fixierte und gewaschene Larven von *P. oestrymnicus* wurden zur Permeabilisierung der Zellmembranen dreimal für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Phosphatpuffer (0,01 M), mit 1% Triton X-100 (Sigma) (PBT) verbracht. Im gleichen Puffer wurden sie mit Phalloidin/Alexa568 (Molecular Probes, Invitrogen) in einer Konzentration von 1unit/200µl über Nacht bei 4° C markiert. Zur Erhöhung der Transparenz und besseren Sichtbarkeit innerer Strukturen erfolgte eine Klärung der gefärbten Präparate in Murray-Clear (angenommen, siehe Anhang, Manuskript 6) oder in reinem Glycerin, in dass das Präparat über eine aufsteigende Reihe aus 30%igem Glycerin und 60%igem Glycerin, je in destilliertem Wasser, geführt wurde. Das Ergebnis ist gleich. Eine Liste der untersuchten Stadien ist in Tabelle x zusammengefasst. Die Präparate wurden im cLSM unter Verwendung der 532nm Laserlinie gescannt die gewonnenen Bilderstapel mit der Software ImageJ 1.38w (National Institutes of Health, USA, freeware) bearbeitet (vgl. Döhren im „review“-Verfahren, siehe Anhang, Manuskript 3).

2.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die in Glutaraldehyd fixierten Entwicklungsstadien wurden alle entsprechend des selben Protokolls für die Vorbereitung von Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert (Döhren & Bartolomaeus 2006, 2007; Döhren im „review“-Verfahren, Manuskript 3; Maslakova & Döhren angenommen, siehe Anhang, Manuskript 6).

Reines Araldit diente dabei als Einbettungsmedium für *L. viridis* und *P. filiformis*, wohingegen die Einbettung von *C. mutabilis*, *P. peregrina* und *P. oestrymnicus* in EMBED 812 (Epon-Araldit Gemisch, Science Services) erfolgte. Eine Liste der untersuchten Stadien ist in Tabelle 1 aufgeführt. Serien von silber-interferenzfarbenen Schnitten wurden mit Diamant-Messern (DIATOME) am Ultracut S (LEICA) hergestellt, auf mit Formvar beschichteten Einloch-Objektträgern (single slot grids) auffangen, automatisch mit Uranyl- und Bleicitrat kontrastiert und im Philips EM 120 C untersucht und auf digital auswertbare Photoplaten (DITABIS) aufgenommen. Nach dem Einlesen der Negative wurden die Bilder in 8 bit-Dateien verwandelt (SYS) und in den Grauwerten angepasst. Übersichtszeichnungen wurden mit der Software Adobe Illustrator CS3 (Adobe Systems Inc.) erstellt.

Tab. 2.1: Aufstellung der Arten, Entwicklungsstadien und Organsysteme, die unter als Originaldaten beschrieben werden (vgl. 4. Ergebnisse)

Art	Methode	Alter der untersuchten Stadien	untersuchte Organsysteme
<i>Carinoma mutabilis</i>	cLSM	5 Tage	Muskulatur
	TEM	8 Tage,	Augen
<i>Lineus viridis</i>	cLSM	6, 9, 12, 15, 18, 28 Tage	Muskulatur
<i>Paranemertes peregrina</i>	cLSM	4, 5, 8, 10 Tage	Muskulatur
	TEM	10 Tage,	Augen
<i>Procephalothrix oestrymnicus</i>	cLSM	1 – 9 Tage	Muskulatur
	TEM	5 Tage	Augen

2.6 Aufbau der Dissertation

Der folgende Text beinhaltet neben Originalergebnissen auch Befunde aus eingereichten Manuskripten sowie bereits veröffentlichten Arbeiten. Zu diesen werden im laufenden Text, unter einem eigenen Abschnitt nach diesem Kapitel kurze Zusammenfassungen geliefert. Tabelle 2.2 führt die betreffenden Manuskripte mit Nennung der Autoren und ihrem Status im Publikationsverlauf der Übersicht halber auf. Ergänzend werden Untersuchungsmethodik,

Gegenstand der Untersuchung und die untersuchten Arten in der Tabelle stichpunktartig genannt. Die nicht veröffentlichten Originaldaten werden nach den Zusammenfassungen der Manuskripte und Publikationen dargelegt, gefolgt von einem Abschnitt, der die direkten Schlussfolgerungen dieser Befunde beinhaltet. Abschließend werden die gesamten, im Zuge der Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnisse diskutiert und die in der Einleitung aufgeworfenen Fragen beantwortet. Die bereits veröffentlichten oder eingereichten Originalmanuskripte sind, mit Angabe der Arbeitsanteile der Autoren, der Arbeit angehängt.

Tabelle 2.2: Liste der publizierten, eingereichten und zur Publikation angenommenen Manuskripte, Originale siehe Anhang.

Publikation / Manuskript	Autor(en) / Status	Untersuchungsmethodik	Gegenstand der Untersuchung	untersuchte Arten
Reproduction in <i>Lineus viridis</i> (Heteronemertea) – Mating behaviour indicates pheromone mediation	Beckers, Döhren, Bartolomaeus (angenommen zur Publikation)	Histologie, Verhaltensexperiment, Freilanduntersuchung	Entwicklung der Gonaden im Jahreslauf, Partnerfindungsverhalten	<i>Lineus viridis</i>
Ultrastructure of sperm and reproductive system in <i>Lineus viridis</i> (Heteronemertea, Nemertea)	Döhren, Bartolomaeus (2006)	Transmissionselektronenmikroskopie, Histologie	Spermienultrastruktur, Ultrastruktur der Testes	<i>Lineus viridis</i>
The fate of the larval epidermis in the intracapsular larva of <i>Lineus viridis</i> (Heteronemertea, Nemertea)	Döhren (im „review“-Verfahren)	Fluoreszenzmarkierung / cLSM, Transmissions-, Rasterelektronenmikroskopie	Ultrastruktur der larvalen und definitiven Epidermis, Metamorphose	<i>Lineus viridis</i>
Ultrastructure and development of the rhabdomic eyes in <i>Lineus viridis</i> (Heteronemertea, Nemertea)	Döhren, Bartolomaeus (2007)	Histologie, Transmissions-elektronenmikroskopie	Entwicklung der juvenilen Augen, Ultrastruktur der Augen	<i>Lineus viridis</i>
Comparative sperm ultrastructure in Nemertea	Döhren, Beckers, Vogler, Bartolomaeus (eingereicht)	Transmissions-, Rasterelektronenmikroskopie	Spermienultrastruktur, Vergleich mit publizierten Daten, Merkmalsmatrix	12 Arten, dazu Literaturdaten von 8 weiteren
Larval development with transitory epidermis in <i>Paranemertes peregrina</i> Coe, 1901 and other hoplonemerteans (Phylum Nemertea)	Maslakova, Döhren (angenommen zur Publikation)	Fluoreszenzmarkierung / cLSM, Transmissions-, Rasterelektronenmikroskopie	allgemeine Larvalentwicklung von <i>P. peregrina</i> , vergleichende Entwicklung der larvalen Epidermis	<i>Paranemertes peregrina</i> , <i>Antarctonemertes (Tetrastemma) phyllospadicola</i> , <i>Oerstedia dorsalis</i>
Head kidneys in the planuliform larvae of <i>Procephalothrix filiformis</i> and <i>Carinoma mutabilis</i> (Nemertea)	Bartolomaeus, Maslakova, Döhren (eingereicht)	Transmissionselektronenmikroskopie	vergleichende Ultrastruktur der larvalen Protonephridien	<i>Carinoma mutabilis</i> , <i>Procephalothrix filiformis</i>

3 Veröffentlichte oder zur Publikation eingereichte Ergebnisse

3.1 Die Reproduktion von *Lineus viridis* (Heteronemertea) weist auf pheromonvermitteltes Paarungsverhalten hin

Beckers P, J von Döhren & T Bartolomaeus (angenommen) Reproduction in *Lineus viridis* (Heteronemertea) indicates pheromone mediated mating behaviour.
Marine Biology

Lineus viridis (Müller, 1774) ist eine Heteronemertinen-Art, die einen deutlichen Geschlechtsdimorphismus aufweist. Die Weibchen sind deutlich größer als die Männchen. Die Art ist mehrjährig, wird aber erst im dritten Lebensjahr fortpflanzungsfähig (Gontcharoff 1960). Als geschlechtsreife Tiere besitzen beide Geschlechter serielle Gonaden, die beidseitig des Körpers zwischen den Mitteldarmtaschen liegen. Hinsichtlich der Entwicklung ihres Gonadenstatus im Jahreslauf wird im Folgenden zwischen Fortpflanzungszeit und Paarungszeit unterschieden werden. Zu Beginn der Fortpflanzungszeit, die bei *L. viridis* in der Nordsee vom späten November bis in den frühen April andauert, sind in den Männchen kleine, unauffällige Hoden zu erkennen, die im Laufe der nächsten Monate heranreifen. Im Februar sind neben den nun deutlich größeren Hoden auch Gonodukte und Gonoporen vorhanden. Bei geschlechtsreifen Weibchen sind das ganze Jahr über Gonaden und Gonoporen nachweisbar. Fertile Tiere lassen sich, abgesehen von ihrer unterschiedlichen Körpergröße, auch durch die Position ihrer Gonoporen unterscheiden. Bei den Weibchen liegen die Gonoporen dorso-lateral, während sie bei den Männchen ventro-lateral positioniert sind. Die Paarungszeit bezeichnet die Periode, in der weibliche Tiere mit männlichen Tieren assoziiert sind. Sie beginnt im Dezember und dauert bis zur Paarung im frühen April an. Dabei halten sich die Männchen auf dem Körper eines Weibchens auf und versuchen, wenn sie gestört werden, den Kontakt zum Körper des Weibchens aufrechtzuerhalten. Vor der Paarung sind die Hoden prall gefüllt mit Spermien, die Ovarien enthalten 15-30 reife Oozyten (Abb. 3.1.1C). Zum Vorder- und Hinterende des Weibchens nimmt die Anzahl der Eier pro Eierstock ab, so dass in den terminalen Bereichen des Körpers Eierstöcke mit nur einem einzigen Ei zu beobachten sind. Zu Beginn der Paarung sind einzelne Weibchen mit mehreren Männchen assoziiert. Bis zu 5 Männchen wurden auf einem Weibchen gefunden, durchschnittlich sind es 2. Das Weibchen gibt eine Schleimmanschette ab, die seinen eigenen Körper im Bereich der Gonoporen sowie die Körper der Männchen umhüllt. Nach kurzer Zeit

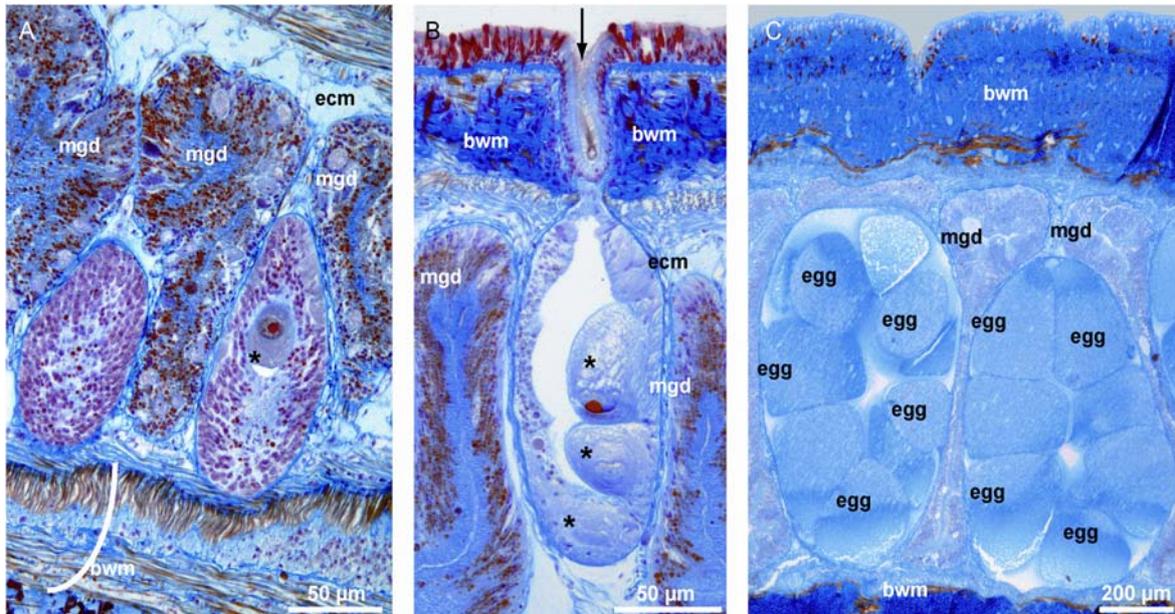


Abbildung 3.1.1: Weibliche Gonade von *Lineus viridis* (Heteronemertea) aus dem „Odde-Watt“, List/Sylt. Oogenese. 5 µm Schnitte, Azanfärbung. A. Gonadenstatus im April 2005; Tiere wurden 3 Wochen nach der Fortpflanzung fixiert. Reservematerial wird in einigen Eiern akkumuliert (*Sternchen*). **B.** Gonadenstatus Ende Juli 2005. Oozyten haben an Größe zugenommen (*Sternchen*). Der Gonodukt ist durch eine Gewebebarriere zwischen Gonade und Gonoporus verschlossen (*Pfeil*). **C.** Gonadenstatus im Februar 2006. Mehr als zehn große Oozyten liegen dicht gepackt in der Gonade (Zellkerne nicht in Schnittebene). *bwm* – Körperwandmuskelschichten, *ecm* – extrazelluläre Matrix, *mgd* – Mitteldarmtasche. (aus Beckers et al., angenommen zur Publikation, siehe Anhang, Manuskript 1)

des Umherwanderns auf dem Weibchen verlassen die Männchen die Schleimmanschette. Es zeigt sich, dass sie ihren Gonadeninhalt nicht vollständig geleert haben, sondern einige gefüllte Hoden beibehalten, die sie in weiteren Paarungsvorgängen entleeren können. Das Weibchen gibt, kurz nachdem die Männchen die Schleimmanschette verlassen haben, die dotterreichen, 300 µm großen Eier ab. Jede Gonade wird vollständig in einem birnenförmigen Eikölbchen eingeschlossen und in eine Gallerte entleert, die in die Schleimmanschette sezerniert wird. Nachfolgend verlässt das Weibchen das am Untergrund anhaftende Gelege, in dem sich die Nachkommen entwickeln (vgl. Bartolomaeus 1984).

Nach der Paarungszeit degenerieren die Gonaden der Männchen rasch und lassen sich erst wieder zu Beginn der nächsten Fortpflanzungsperiode nachweisen. Aufgrund der langen Produktionszeit der dotterreichen, großen Eier beginnt bei den Weibchen bereits 4-6 Wochen nach dem Ablachen die Oogenese für die nächste Fortpflanzungssaison (Abb. 3.1.1C). Die Sylter Population wurde in den Jahre 2005 und 2006 ganzjährig in zweimonatigen Intervallen beprobt und stichprobenhaft vermessen. Die erste Sammlung nach der Paarung wurde im Mai und eine zweite im Juli vorgenommen. Dabei wurden die Tiere während des nächtlichen Niedrigwassers von den Mischwattflächen abgesammelt, auf denen sie umher kriechen. Bei

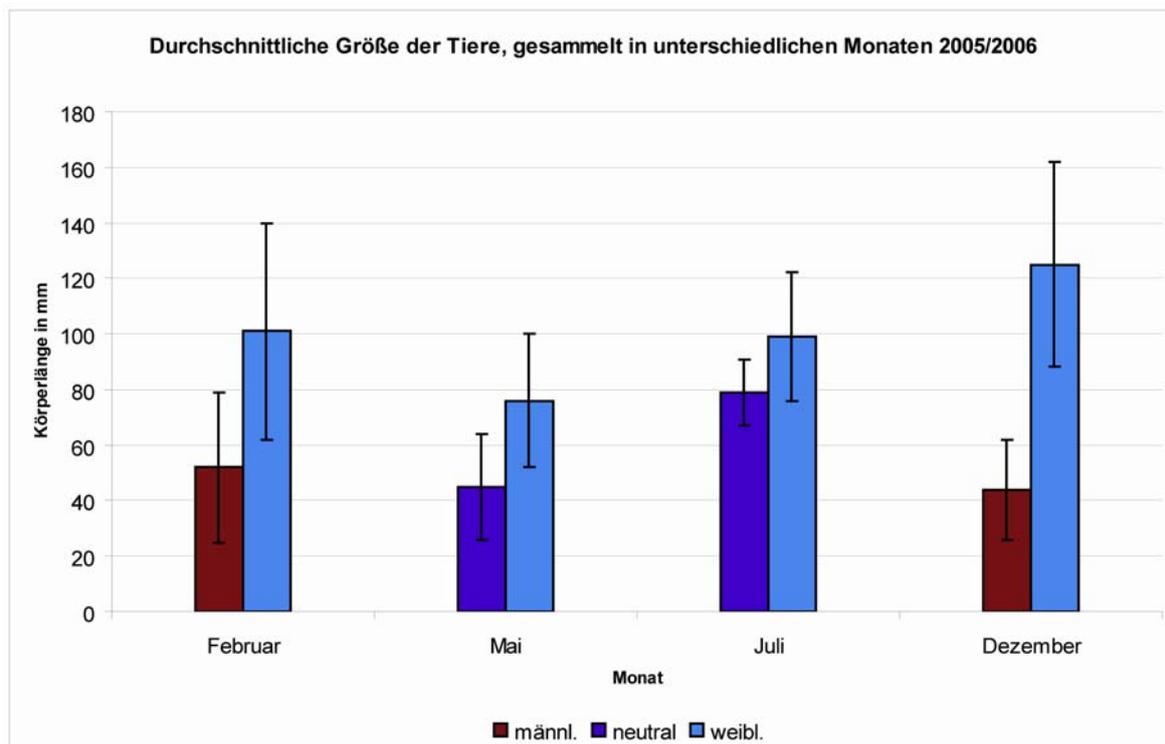


Abbildung 3.1.2: Körperlänge nach Geschlecht von *Lineus viridis* (Heteronemertea) aus dem „Odde-Watt“, List/Sylt im Jahreslauf. Dargestellt sind die Monate, in denen ausreichend Tiere gefunden wurden. Die Weibchen sind das ganze Jahr über an ihren Gonoporen zu erkennen, männliche Tiere wurden nur während der Fortpflanzungszeit zweifelsfrei identifiziert. In den Sommermonaten finden sich kleinere Tiere, die keine Gonaden oder Gonoporen aufweisen (neutral, nicht-fertil). (verändert nach Beckers et al., angenommen zur Publikation, siehe Anhang, Manuskript 1)

den Sammlungen im frühen Frühjahr (Februar) wurden die Tiere bei Niedrigwasser unter Steinen gefunden; eine Suche von sich frei auf den Sandflächen bewegendes Tieren fand nicht statt. In der Zeit von Mai bis November sind im Feld nur solitäre Tiere zu finden, im Dezember nahezu ausschließlich mit Männchen assoziierte Weibchen. Die durch ihre Gonoporen und in Oogenese befindlichen Ovarien eindeutig zu identifizierenden Weibchen nehmen in dieser Zeit deutlich an Größe zu. Sie wachsen von einer Länge von 76 ± 24 mm ($n = 23$) Anfang Mai, sechs Wochen nach der Eiablage, über eine Länge von 99 ± 23 mm ($n = 36$) im späten Juli bis zu einer Länge von 125 ± 37 mm ($n = 13$) im Dezember kurz vor der Gonadenreife heran (Abb. 3.1.2). Währenddessen bilden sich kontinuierlich Eizellen aus Gonadenwandzellen heran, die an Größe zunehmen (Abb. 3.1.1A-C). Ein durchgehender Gonodukt ist nicht ausgebildet zwischen den Gonaden und Gonoporen ist stattdessen eine Gewebsbrücke ausgebildet, die erst mit der vollständigen Gonadenreife abgebaut wird (Abb. 3.1.1B). Die anderen Tiere, die im Jahreslauf gefunden werden, zeigen weder Hinweise auf generatives Gewebe oder Gametenproduktion, noch auf Gonoporen. Obwohl auch die Tiere dieses neutralen Typus im Jahreslauf von 45 ± 19 mm Länge ($n = 29$) im Mai auf 79 ± 12 mm Länge ($n = 35$) Ende Juli anwachsen, bleiben sie im Mittel kleiner als die gefundenen

Weibchen ($p < 0,05$; $n = 136$; t-Test nach Student) (Abb. 3.1.2). Im Dezember werden die ersten mit Weibchen assoziierte Männchen gefunden. Sie sind mit 44 ± 18 mm ($n = 9$) im Mittel deutlich kleiner als die während des Sommers gefundenen neutralen Tiere (Abb. 3.1.2). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei letzteren um ein Konglomerat aus Männchen, die im Sommer noch keine sichtbaren Gonaden ausgebildet haben, und subadulten, infertilen Weibchen handelt. Diese infertilen Weibchen wurden im Winter nicht gefunden, da zu dieser Zeit nur unter Steinen gesucht wurde, unter denen sich ausschließlich geschlechtsreife Tiere beider Geschlechter aufhielten, die dort zu aggregieren beginnen. Der Sprung in den Größenklassen infertiler und männlicher Tiere zwischen Juli und Dezember lässt sich dadurch erklären, dass Weibchen, die zum ersten Mal in ihrem Leben Gonaden ausbilden, Oozyten erst spät im Jahr und in geringerer Größe und Anzahl produzieren. Während diese im Mai und Juli als neutrale Tiere angesprochen werden, werden sie bei Sammlungen im Dezember als Weibchen identifiziert. Diese Annahme wird durch zwei Beobachtungen aus dem Februar, der Zeit der Paarung und Eiablage, unterstützt. Während die Körperlänge der Männchen im Gegensatz zu Messungen aus dem Dezember auf 52 ± 27 mm ($n = 85$) angestiegen ist, ist diejenige der Weibchen auf 101 ± 39 mm ($n = 38$), also um etwa 20% des vorherigen Wertes, gesunken (Abb. 3.1.2). Die erhöhte Streuung des Mittelwertes weist auf größere Längenunterschiede der gemessenen Weibchen hin, da nun auch kleinere, fertile Weibchen gefunden werden. Diese kleineren Weibchen weisen wegen ihrer geringeren Körperlänge weniger Gonaden auf und produzieren auch weit weniger Eizellen pro Gonade.

Aufgrund des Paarungsverhaltens mit einer aufwendigen Pseudokopulation stellte sich die Frage, ob sich die einzelnen Partner zufällig in ihrem Habitat über den Weg laufen, oder ob es Partnerfindungsmechanismen gibt. Die Fähigkeit, einen Geschlechtspartner aufzuspüren, ist hierbei besonders für die konkurrierenden Männchen als selektiver Vorteil anzunehmen. Da in diesem Habitat chemische Kommunikation die wahrscheinlichste Art der Informationsübertragung darstellt, wurde untersucht, ob Männchen auf die Schleimspuren von geschlechtsreifen Weibchen mit Spurfolge reagieren und ob sich auch in der Wassersäule ein von den Weibchen abgegebenes Pheromon befindet, auf das die Männchen positiv reagieren. Es zeigt sich in einem aquatischen Zwei-Wege-Olfaktometer mit durchlaufendem Wasserstrom eine signifikante Attraktion der Männchen durch gravide Weibchen ($p < 0,05$; $n = 43$; χ^2 -Test), dabei zeigten die Männchen Explorationsverhalten, indem sie den Kopf anhoben und abwechselnd zu beiden Seiten wiegten, wie um einen Konzentrationsgradienten mit den Sinnesorganen ihrer Kopfspalten zu erspüren. Weibchen, die bereits abgelaicht

hatten, waren nicht attraktiv, wohingegen sich auch andere Männchen als attraktiv erwiesen, wenngleich in geringerem Ausmaß als gravide Weibchen. Es ist anzunehmen, dass Männchen auch auf den Spuren anderer Männchen zu einem paarungsbereiten Weibchen finden, oder das weibliche Aggregationspheromon in Spuren auch von Männchen abgegeben wird. Die Schleimspur eines graviden Weibchens löst bei Männchen Spurfolgeverhalten aus, sobald es mit dem Kopf in Kontakt mit der Schleimspur kommt. Die Anwesenheit eines Botenstoffes bei der Partnerfindung von *L. viridis* ist hochwahrscheinlich, zu dessen Natur bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

3.2 Ultrastruktur der Spermien und männlichen Gonaden von *Lineus viridis* (Heteronemertea)

Döhren, J von & T Bartolomaeus (2006) Ultrastructure of sperm and male reproductive system in *Lineusviridis* (Heteronemertea, Nemertea). Zoomorphology 125: 175-185

Auf Sylt ist *Lineus viridis* (Müller, 1774) zwischen Februar und Mai geschlechtsreif. Bei Männchen dieser Heteronemertine sind die vollständig mit reifen Spermien gefüllten Gonaden unter Durchlicht sichtbar, wenn die Tiere unter einem Objektträger leicht gequetscht werden. Die seriellen Gonaden sind beiderseits entlang des Mitteldarms angeordnet, wo sie abwechselnd mit Mitteldarmdivertikeln liegen. Jeder Hoden hat einen eigenen Gonodukt, der durch einen Gonoporus mit der Außenwelt in Verbindung steht. Die Gonoporen zeigen sich als auffällige Einsenkungen der ventrolateralen Epidermis.

Der Gonodukt erstreckt sich bei geschlechtsreifen Männchen vom ventrolateral gelegenen Gonoporus über 100-120 µm Länge ins Innere. Er passiert dabei die Schichten des Hautmuskelschlauchs und tritt kurz dahinter mit der Gonade in Verbindung. An seiner schmalsten Stelle, auf Höhe des Hautmuskelschlauchs, weist er eine Breite von 15 µm auf. Der Gonodukt ist über seine gesamte Länge mit multiciliär bewimperten Zellen ausgekleidet, die über apikale Adhaerenzonen miteinander verbunden sind und deren basale Pole auf einer extrazellulären Matrix sitzen (Abb. 3.2.1A). Sie bilden so ein einschichtiges Epithel, das sich in die Epidermis fortsetzt. Im Gegensatz zu dieser besteht es aber nur aus einem einzigen Zelltyp; Drüsenzellen, wie sie in der Epidermis vorkommen, fehlen. Die Epithelzellen sind hohe ineinandergreifende Zellen, deren apikaler Zellpol von einer Vielzahl von Cilien besetzt ist. Diese besitzen ein reguläres $9 \times 2 + 2$ Axonem welches von einem Basalkörper entspringt. Der Basalkörper weist neben einem Basalfüßchen und einer Basalplatte zwei unterschiedlich lange Cilienwurzeln auf. Die längere erstreckt sich senkrecht zur Zelloberfläche ins Innere der Zelle, während die kürzere parallel zur apikalen Zellmembran verläuft.

Die Basalstrukturen der Cilien weisen keine Verbindung untereinander auf. Der verhältnismäßig große Zellkern der auskleidenden Zellen liegt in der basalen Hälfte der Zelle und enthält vor allem diffuses Euchromatin. Mitochondrien finden sich um ihn herum angeordnet, aber vor allem im oberen Teil der Zelle zwischen und kurz unterhalb der ciliären Basalstrukturen. Hier befinden sich auch zahlreiche Vorratsvesikel. Nach basal enthalten die Zellen ein homogenes Cytoplasma, welches sich durch die Abwesenheit von auffälligen Zellorganellen oder -einschlüssen auszeichnet.

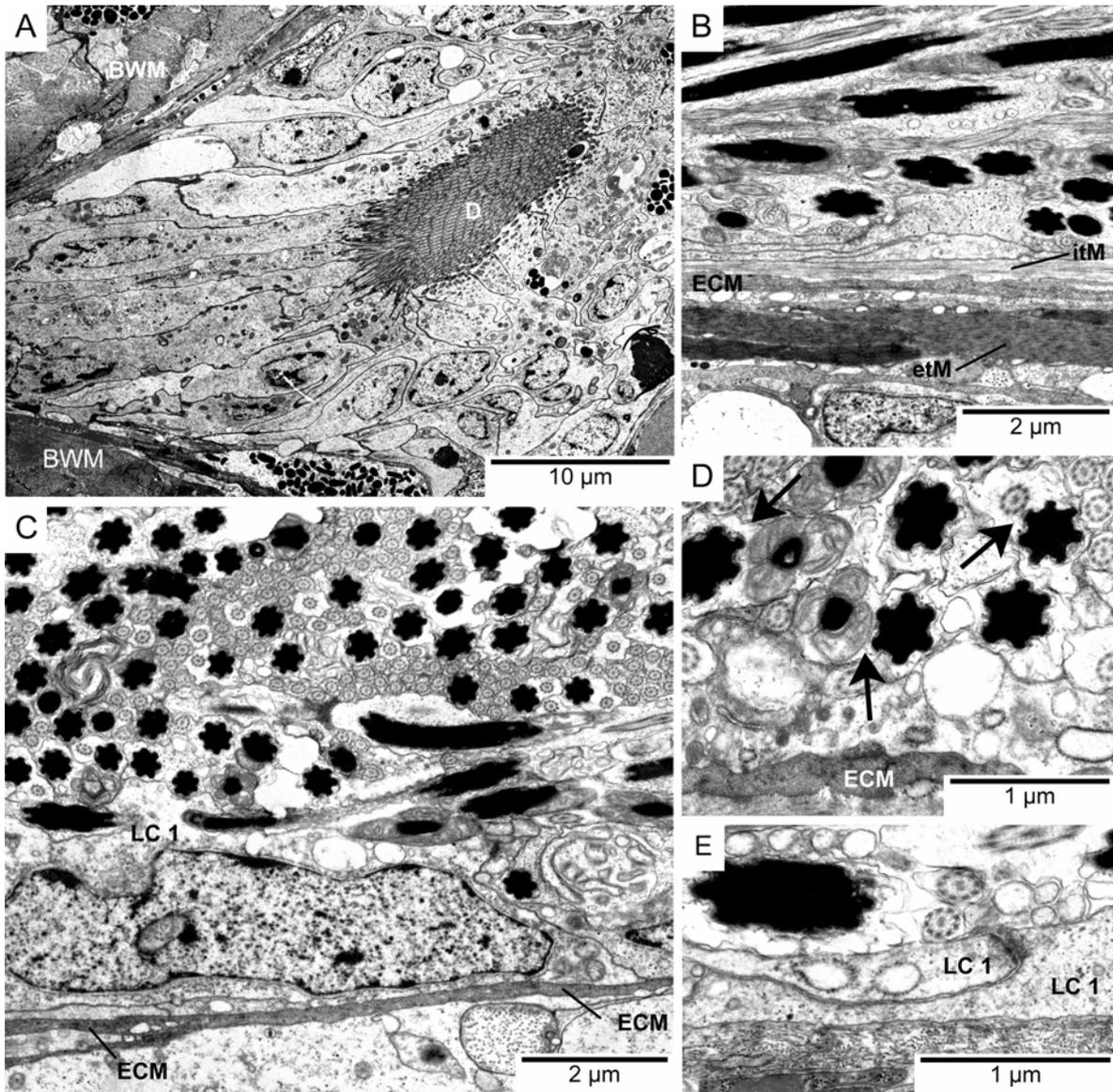


Abbildung 3.2.1: Spermiodukt und Hoden von *Lineus viridis* (Heteronemerte). Transmissionselektronenmikroskopie. **A.** Ein bewimperter Gonodukt passiert die Körperwandmuskulatur und führt ins Freie, seine Auskleidung besteht aus nur einem Typ multiciliär bewimperter Zellen, die denen der Epidermis entsprechen. **B.** Im reifen Hoden ist das auskleidende Epithel von einer dünnen Muskelschicht unterlagert. **C.** Im Hoden ist kein sichtbarer Gradient hinsichtlich der Differenzierung der Spermien sichtbar. **D.** Einige Spermien liegen aufgerollt in einer Zellmembran (markiert durch *Pfeile*). **E.** Die auskleidenden Zellen des Hodens sind durch Adhaerenzonen miteinander verbunden. *BWM* – Körperwandmuskulatur, *D* – Spermiodukt, *ECM* – extrazelluläre Matrix, *etM* – extratestikuläre Muskulatur, *itM* – intratestikuläre Muskulatur, *LC 1* – auskleidende Zelle des Typ1. (aus Döhren & Bartolomaeus 2006, siehe Anhang, Manuskript 2)

Die Hoden von *L. viridis* liegen unterhalb der Schichten des Hautmuskelschlauchs in unmittelbarer Nähe zu den lateralen Taschen des Mitteldarms. Jeder Hoden ist von einer extrazellulären Matrix umgeben, die in diejenige des Gonoduktes übergeht und mit der perimuskulären und periintestinalen Matrix ein Kontinuum bildet (Abb. 3.2.1B, C, D). Außerhalb dieser Matrix umgibt ein feines Muskelgitter aus längs und quer verlaufenden Muskelfaserzellen die Gonade (Abb. 3.2.1B). Auch oberhalb der basalen Matrix des Hodens zwischen den ausklei-

denden Zellen wurden Muskelfasern nachgewiesen. Diese sind jedoch weniger zahlreich und in einem geringeren Ordnungsgrad ausgebildet. Ob diese Fasern in Epithelmuskelzellen enthalten sind, konnte nicht geklärt werden (Abb. 3.2.1B).

Neben den Muskelzellen ist die Auskleidung des Hodens aus vier verschiedenen Zelltypen aufgebaut. Die ersten zwei Zelltypen weisen eine stark gefaltete Oberfläche auf, die mit der Zellmembran der umgebenden Zellen verzahnt ist. Beide Zelltypen enthalten außer einigen Mitochondrien nur wenige Zellorganellen und sind apikal mit Adhaerenzonen ausgestattet. Sie unterscheiden sich durch die Ultrastruktur des Zellkerns und des Cytoplasmas. Während der Zellkern des ersten Typs auskleidender Zellen wenig, großteils membrangebundenes Heterochromatin enthält und sein Cytoplasma sich elektronenhell darstellt und mit fibrillären Cytoskelettelementen sowie Gruppen von elektronendunklen Vesikeln angefüllt ist, enthält der Zellkern des zweiten Typs große Mengen an Heterochromatin und sein Cytoplasma ist elektronendunkler, aber insgesamt homogener, gestaltet. Im Gegensatz zum zweiten Zelltyp zeigen sich im ersten Mikrovilli, die sich in Richtung des Hodenlumens erstrecken (Abb. 3.2.1E).

Der dritte an der Auskleidung der Gonadenwand beteiligte Zelltyp weist neben einer Verbindung mit anderen Zellen über Adhaerenzonen eine regelmäßige, kompakte Form auf. Bei diesem Zelltyp ist keine Verbindung zur basalen extrazellulären Matrix nachweisbar, und der eiförmige Zellkern enthält wenig Heterochromatin. Bei einigen Zellen dieses Typs konnte beobachtet werden, dass die Kernmembran aufgelöst ist; es ist jedoch keinerlei meiotische Aktivität, zum Beispiel in Form von Ausbildung synaptonemaler Komplexe, erkennbar. Es handelt sich hier vermutlich um generative Zellen, die keine Spermiogenese vollziehen. Beim vierten Zelltyp handelt es sich klar um einen phagozytotischen. Das sehr elektronendunkle Zellplasma ist angefüllt mit zahlreichen Lysosomen und weiteren Vesikeln. Basal steht die Zellmembran dieser Zellen in Verbindung mit der unterliegenden extrazellulären Matrix und verästelt sich stark nach apikal, so dass ihre Ausläufer weit zwischen die der anderen auskleidenden Zellen greifen.

Das Lumen des Hodens ist nahezu lückenlos mit eng gepackten, reifen Spermatozoen gefüllt, lediglich in den Randbereichen sind Zellen mit U-förmigen, stark kondensierten Zellkernen, ungeordneten Mitochondrien und intrazellulären Axonemata zu finden (Abb. 3.2.1C, D, E). Ob es sich hierbei um Spermiogenesestadien oder missgebildete Spermien handelt, lässt sich nicht entscheiden. Die Spermatozoen von *L. viridis* haben eine Gesamtlänge von 70 µm, dabei werden etwas 50 µm vom Flagellum eingenommen (Abb. 3.2.2A, G). Der Kopf, der der

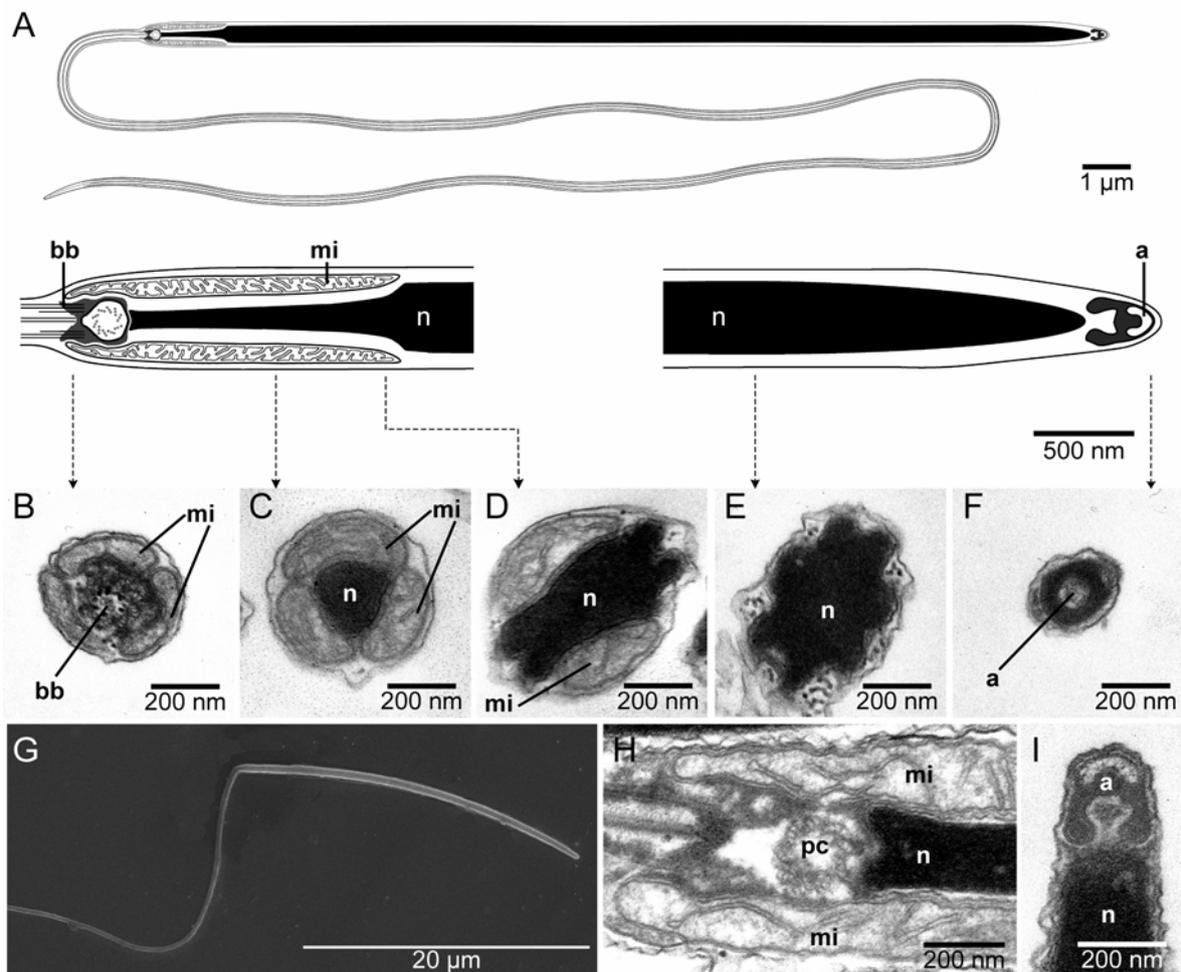


Abbildung 3.2.2: Spermium von *Lineus viridis* (Heteronemertea). A. Rekonstruktion. B-F, H, I. Transmissionselektronenmikroskopie. G. Rasterelektronenmikroskopie. A. Zellkern ist stark verlängert, so dass der Kopf etwa ein Drittel der Gesamtlänge ausmacht. Das Akrosom sitzt apikal, Mitochondrien sind verlängert und Kopf und Mittelstück verschmolzen. B-F. Querschnitte auf verschiedenen Höhen der Zelle (wie in A angegeben). 3 Mitochondrien umgeben den Basalkörper des Schwanzfadens. Sie erstrecken sich nach vorne und umgeben den Zellkern, der weiter apikal bis zu 7 laterale Leisten aufweist. G. Von außen ist keine Grenzlinie zwischen Spermienkopf und Mittelstück sichtbar. H. Das Mittelstück, das die Mitochondrien enthält, ist verlängert, so dass die Mitochondrien den Zellkern umgeben. I. Der apikale Zellpol mit dem Akrosom. a – Akrosom, ax – Axonem, bb – Basalkörper, mi – Mitochondrium, n – Zellkern, pc – proximales Centriol. (aus Döhren & Bartolomaeus 2006, siehe Anhang, Manuskript 2)

Definition nach das akrosomale Vesikel und den Zellkern beinhaltet ist in diesem Fall mit dem Mittelstück verschmolzen, das die mitochondriale Masse enthält. Dabei ist das Kopf-Mittelstück auf 24 µm verlängert und dabei nur etwa 500 nm breit (Abb. 3.2.2G). Das apikal lokalisierte akrosomale Vesikel weist, mit einer Länge von circa 250 nm und einer Durchmesser von 200 nm, fast kompakte Ausmaße auf. Es hat die Form eines sich nach apikal verjüngenden Kegels mit abgerundeter Spitze. Basal ist eine deutliche Invagination zu erkennen, die subakrosomales Material enthält.

Der subakrosomale Bereich ist von einem ringförmigen Ausläufer des akrosomalen Vesikels umgeben, der sich nach posterior zu einer akrosomalen Ringkomponente verdickt. Etwas weiter anterior weist das Akrosom im Inneren ein schalenförmiges, elektronenhelles Komparti-

ment auf, das nicht von einer eigenen Membran umgeben ist (Abb. 3.2.2I). Der sich posterior anschließende Nucleus zeichnet sich durch vollständig kondensiertes, elektronendicht kontrastiertes Kernmaterial aus. Er erstreckt sich, stark verlängert, über die gesamte Länge der Zelle und wird in seinem posterioren Zehntel von den drei, jeweils 2,8 µm langen Mitochondrien flankiert (Abb. 3.2.2A, H). An dieser Stelle verjüngt sich sein Durchmesser und nimmt einen dreiseitigen Querschnitt an. Vor den Mitochondrien zeigt der Kern im Querschnitt sechs laterale Leisten, deren Zahl im Verlauf des Kerns nach posterior auf acht ansteigt, um mit dem Beginn der Mitochondrien zu verschwinden (Abb. 3.2.2C, D, E). Die Mitochondrien erstrecken sich über die Länge des Kerns hinaus nach posterior, so dass sie das proximale Centriol vollständig und das distale teilweise umfassen (Abb. 3.2.2B, H). Das proximale Centriol sitzt in der Nähe einer posterioren Invagination des verjüngten Kernstabs und wird lateral von den Mitochondrien umstanden. Nach posterior schließt sich das distale Centriol an, welchen den Basalkörper des Flagellums repräsentiert. Die Centriole stehen in einem rechten Winkel zueinander in einer Linie mit der Längsachse der Spermienzelle. Das proximale Centriol und proximale Teile des distalen Centriols sind von einer nicht-membranösen, diffusen, elektronendichten Struktur umgeben (Abb. 3.2.2H). Der Schwanzfaden weist ein reguläres $9 \times 2 + 2$ Axomen auf; eine Basalplatte fehlt.

Einige Tage nach der Befruchtung zeigen die Hoden von *L. viridis* eine veränderte Struktur. Die noch vorhandenen Gonodukte weiten sich zu einem birnenförmigen Hohlraum, der von dicht bewimperten Zellen ausgekleidet wird, die in ihrer Ultrastruktur denen des Gonoduktes eines gefüllten Hodens entsprechen. Auch zwischen ihnen sind apikale Adhaerenzzonen ausgebildet. Diesen auskleidenden Zellen fehlt jedoch jede Spur von Mikrovilli, dafür ist eine 550 nm starke Glykokalyx ausgebildet, die der Oberfläche des Hohlraums aufliegt. Spermatozoa wurden nicht entdeckt.

Zwischen den bewimperten Zellen befinden sich flaschenförmige, unbewimperte Zellen, die basal auf der den Hoden umgebenden extrazellulären Matrix siedeln und apikal miteinander verbunden sind. Diese Zellen umstehen in Gruppen kleine Bereiche, in die sie eine Vielzahl von Mikrovilli entsenden. Diese Bereiche öffnen sich apikal in den Hohlraum der Gonade. Alle Zellen sind untereinander und mit den umliegenden bewimperten Zellen durch apikale Adhaerenzzonen verbunden. Im Gegensatz zu den bewimperten Zellen besitzen die unbewimperten Zellen jedoch weniger Mitochondrien, die um den wesentlich kleineren Zellkern, vor allem aber in der apikalen Region der Zellen, unterhalb der Mikrovilli angeordnet sind. Zuweilen sind auch intrazelluläre Axonemata in diesen Zellen nachzuweisen.

Der Zellkern ist nicht in allen unbewimperten Zellen auf gleicher Höhe positioniert, und je näher der Zellkern zum Zellapex liegt, desto stärker scheint sein Chromatin kondensiert zu sein. In einigen dieser Zellen ist die Kernmembran aufgelöst, und es treten Metaphasechromosomen auf. Trotz dieser mitotischen Aktivität zeigen sich auf der Seite der Gonade, die dem Darm benachbart ist, deutliche Zeichen für eine Degeneration dieses Organs, die durch große, phagozytotische Zellen vermittelt wird. Vom Abbau sind allerdings nur die multiciliär bewimperten Zellen betroffen, die mitotisch aktiven Zellen werden nicht abgebaut. Spätere histologische Befunde von Männchen, die ihre Spermien nicht vollständig abgegeben haben, zeigen eine deutliche Verkleinerung der Gonade, gefolgt von deren völligem Verschwinden bei allen männlichen Tieren im Frühsommer, wenige Wochen nach der Reproduktionszeit.

3.3 Das Schicksal der larvalen Epidermis der intrakapsulären Larve von

Lineus viridis (Heteronemertea, Nemertea)

Döhren, J von (im "review"-Verfahren) Fate of the larval epidermis in the intracapsular larva of *Lineus viridis* (Heteronemertea, Nemertea). Invertebrate Biology

Die Heteronemertinen-Art *Lineus viridis* (Müller, 1774) zeichnet sich durch eine intrakapsuläre Entwicklung mit einem speziellen Larvenstadium, der Desorlarve, aus, die in einer gallertigen Eischnur mit mehreren hundert Eiern abläuft. Da diese Art eine innere Befruchtung mit vorheriger Pseudokopulation vollzieht (Gontcharoff 1951; Bartolomaeus 1984), ist der Zeitpunkt der Befruchtung nicht festzustellen. Als Referenzzeitpunkt für weitere Angaben wird daher der Zeitpunkt der Eiablage gesetzt. Die Entwicklung ist temperaturabhängig und dauert drei bis fünf Wochen. Da sie asynchron innerhalb eines Geleges abläuft, ist der Entwicklungsstand der einzelnen Individuen selbst bei konstanter Temperatur deutlich verschieden. Bei einer Außentemperatur von 17 °C beträgt die Entwicklungsdauer im Schnitt 26 Tage, gerechnet von der Ablage der Eier bis zu dem Zeitpunkt, an dem der Großteil der Jungtiere die Eigallerte verlassen hat. Bei einer Temperatur unter 5° C sind keine nennenswerten Entwicklungsvorgänge zu beobachten.

Die Furchung läuft bei *L. viridis* als äquale Spiralfurchung ab; die vier Quadranten weisen die gleiche Größe auf. Die erste äquatoriale Teilung führt zu einem 8-Zell-Stadium, bei dem die vier Mikromeren die gleiche Größe haben wie die Makromeren, so dass eine Polarität des Keimes nur anhand des Polkörperchens am apikalen Keimpol zu erkennen ist (Abb. 3.3.1A). Die Gastrulation beginnt am dritten Tag nach der Eiablage und wird am fünften Tag beendet. Es bildet sich ein runder, scheibenförmig abgeflachter Embryo. Da die Entwicklung der inneren Organe bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben wurde (z. B. Nusbaum & Oxner 1913; Schmidt 1964), wird an dieser Stelle das Augenmerk vor allem auf die Körperwand gelegt. Die Nennung anderer Organe soll vor allem als Orientierungshilfe dienen. Am siebten Tag nach der Eiablage beginnt sich die Larve zu strecken, so dass sie am 12. Tag einen rhomboiden Körperumriss erhält; dorso-ventral bleibt eine offensichtliche Abflachung bestehen. Die Larve hat eine Körperlänge von etwa 500 µm und ist an der breitesten Stelle, auf der Höhe des larvalen Mundes, 300 µm breit. Der Mund ist sichelförmig mit nach caudal gerichteten Mundwinkeln, und es ist ein sackförmiger Darm ohne

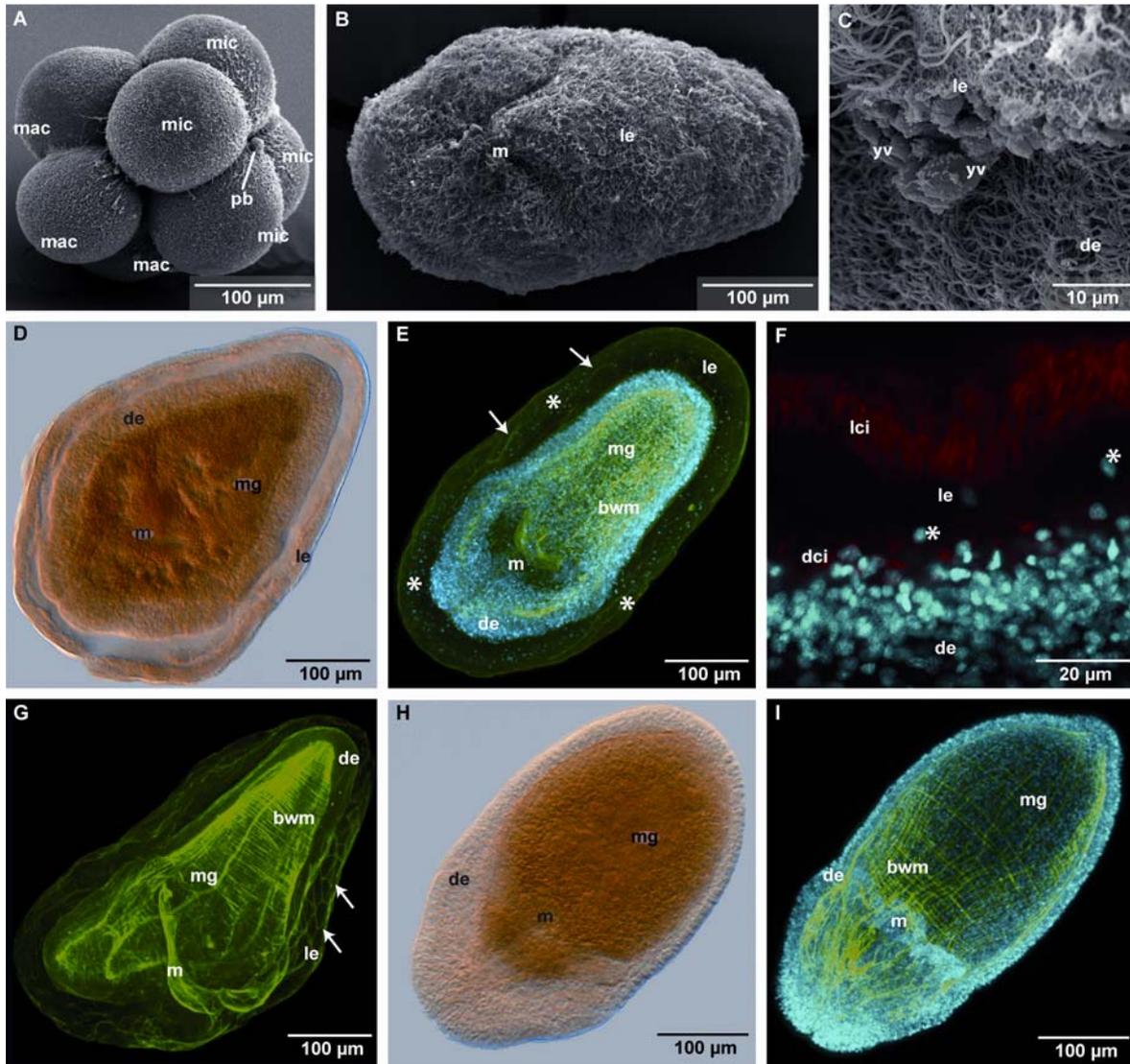


Abbildung 3.3.1: Entwicklung von *Lineus viridis* (Totalpräparate nach Entfernen der Eihäute). **A - C.** Rasterelektronenmikroskopie. **E - G, I.** Konfokale Laserscanmikroskopie. Projektionen. **D, H.** Differentialinterferenzkontrast nach OsO_4 -Behandlung (Präparate leicht gedrückt). **A.** 8-Zellstadium, alle Blastomeren haben die gleiche Größe. **B.** Desor-Larve (12 Tage alt) mit charakteristischer rhomboider Form, sichelförmiger Mund auf der Ventralseite sichtbar. **C.** Desor-Larve (14 Tage alt), kurz vor der Metamorphose, larvale Epidermis ist teilweise gebrochen, um die Cilien der definitiven Epidermis sichtbar zu machen. **D.** Desor-Larve (14 Tage), kurz vor der Metamorphose. Larvale Epidermis ist fast vollständig vom sich im Inneren entwickelnden Jungtier abgelöst. **E.** Desor-Larve (12 Tage). **F.** Desor-Larve (14 Tage), kurz vor der Metamorphose. Epidermis und entwickelnden Cilien der definitiven Epidermis. **G.** Beginnende Metamorphose der Desor-Larve (14. bis 15. Entwicklungstag) die larvale Epidermis ist im Begriff vom Jungtier in ihrem Inneren verschluckt zu werden. **H, I.** Jungtier (15 Tage alt). **H.** Mitteldarm ist mit dotterreichem Material gefüllt. **I.** Mitteldarm ist wegen der verschluckten larvalen Epidermis aufgewölbt. *bwm* – Körperwandmuskulatur, *dci* – Cilien der definitiven Epidermis, *de* – definitive Epidermis, *lci* – Cilien der larvalen Epidermis, *le* – larvale Epidermis, *m* – Mund, *mac* – Makromeren, *mic* – 1. Mikromerenquartett, *mg* – Mitteldarm, *yv* – Dottervesikel; Färbungen: *cyan* – Zellkerne, *grün* – Aktin, *rot* – Tubulin (Pfeile markieren Adhärenzonen larvaler Epidermiszellen, Sternchen Zellkerne larvaler Epidermiszellen). (aus Döhren im „review“-Verfahren, siehe Anhang, Manuskript 3)

Afteröffnung ausgebildet (Abb. 3.3.1B). Das einschichtige Darmepithel besteht aus multiciliär bewimperten Zellen, die mit zahlreichen Dottervesikeln gefüllt sind (Abb. 3.3.2A, D). Die Körperoberfläche ist einheitlich bewimpert, es sind keine verlängerten Cilienschöpfe

ausgebildet. Die larvale Epidermis ist 10-20 μm mächtig und besteht aus einem einschichtigen Epithel, das zwei Zelltypen enthält. Bei einem Zelltyp, dem der weitaus überwiegende Teil der Zellen dieses Gewebes angehört, handelt es sich um große, flache, multiciliär bewimperte Zellen, die durch apikale, aber auch basale Adhaerenzzonen untereinander verbunden sind. An der Zelloberfläche sind, neben zahlreichen Cilien, kurze Mikrovilli ausgebildet, die keinem regelmäßigen Muster folgen. Die Cilien sind mit einem $9 \times 2 + 2$ Axonem ausgestattet. Dieses entspringt an einem Basalkörper, der neben einem kleinen keulenförmigen Fortsatz in der Höhe des Basalfüßchens zwei verschieden lange Cilienwurzeln aufweist. Die längere verläuft parallel zur Zelloberfläche, wohingegen sich die kürzere senkrecht ins Zellinnere erstreckt. Außer zahlreichen großen, elektronendunkel kontrastierten Dottervesikeln weist das Cytoplasma nur wenige weitere Organelle auf. Einige Mitochondrien sind vor allem im apikalen Bereich der Zelle zu finden. Sie sind zwischen den Basalstrukturen der Cilien lokalisiert und werden von Vesikeln verschiedener Größe, jedoch ungeklärter Funktion, umgeben (Abb. 3.3.2B). Jede Zelle weist einen einzelnen, großen Zellkern auf, dessen Karyoplasma vor allem von homogener euchromatischer Struktur ist. Es ist nur wenig Heterochromatin zu erkennen, aber ein prominenter Nucleolus (Abb. 3.3.2C, D). Der zweite Zelltyp, der in der larvalen Epidermis zu finden ist, ist apolar und unbewimpert. Diese flachen Zellen erstrecken sich basal der bewimperten Zellen, sind aber nicht als durchgehende Schicht ausgeprägt. Ihr Cytoplasma ist dicht mit Mikrotubuli angefüllt, so dass die Vermutung nahe liegt, dass es sich um Nervenzellen handelt (Abb. 3.3.2C). Die Zellschicht enthält keine Muskel- oder Drüsenzellen. Sie wird auch nicht von einer basalen extrazellulären Matrix unterlagert; stattdessen befindet sich unter ihr ein mit Flüssigkeit gefüllter Hohlraum, die sogenannte Amnionhöhle (Friedrich 1979).

Die Amnionhöhle wird basal von einer zweiten einschichtigen Epithelschicht unterlagert, die sich aus schmalen, flaschen- oder pilzförmigen, multiciliär bewimperten Zellen und aus Drüsenzellen zusammensetzt, die untereinander durch apikale Adhaerenzzonen verbunden sind (Abb. 3.3.1C, D; Abb. 3.3.2A, C). Es handelt sich hierbei um die definitive Epidermis von *L. viridis*. Der Durchmesser ihrer bewimperten Zellen ist kleiner als derjenige der Zellen der distal gelegenen larvalen Epidermis, sie zeigen aber einen dichteren Cilienbesatz (Abb. 3.3.1C, F; Abb. 3.3.2D). Die Cilien, die sich nach apikal in den Hohlraum zwischen larvaler und definitiver Epidermis erstrecken, enthalten ein Axonem, das ein reguläres $9 \times 2 + 2$ Mikrotubulimuster aufweist. Der Basalkörper ist mit einem normal ausgebildeten Basalfüßchen ausgestattet und weist zwei an ihm befestigte unterschiedlich lange

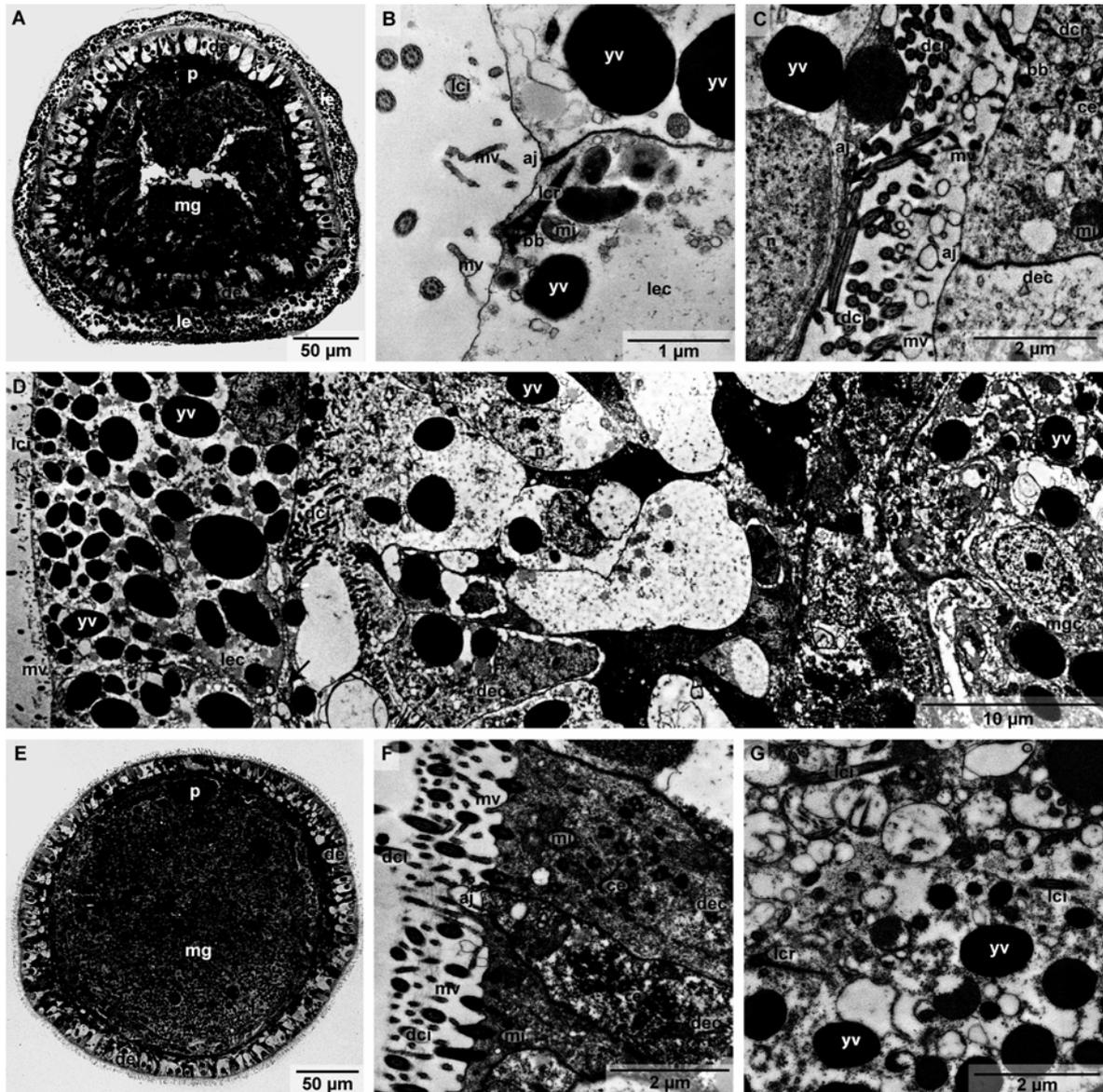


Abbildung 3.3.2: Entwicklung von *Lineus viridis*. A, E: Semidünnschnitte, gefärbt mit 1% Toluidinblau. B - D, F, G: Transmissionselektronenmikroskopie. A. Desor-Larve vor Metamorphose. Querschnitt caudal der Mundregion. Larvale Epidermis distal der definitiven Epidermis, Darm mit erkennbarem Lumen. B. Apikale Region der larvalen Epidermis mit Cilien, apikalen Mikrovilli, Adhaerenzonen und sehr vielen Dottervesikeln. C. Definitive Epidermis in einer prämetamorphen Larve. Cytoplasma der definitiven Epidermis ohne Dottervesikel; Zellen der larvalen Epidermis sind über basale Adhaerenzonen verbunden. Pfeile markieren Nervenzellfortsätze in der larvalen Epidermis. D. Prämetamorphes Entwicklungsstadium; distale wird die larvale Epidermis von der definitiven unterlagert. Die Zellen der verschiedenen Gewebe sind unterschiedlich groß und unterscheiden sich in der Verteilung der Dottervesikel. Pfeile markieren Nervenzellfortsätze in der larvalen Epidermis. E. Postmetamorphes Jungtier. Querschnitt caudal der Mundregion. Definitive Epidermis; der Darm ist mit geschluckter, larvaler Epidermis gefüllt. F. Apikale Region der definitiven Epidermis mit dichter Bewimperung, Mikrovilli und apikale Adhaerenzonen. Zahlreiche Centriole weisen auf Ciliogenese hin. G. Jungtier nach der Metamorphose. Mitteldarm mit Resten der larvalen Epidermis; Cilien, Dottervesikel sind noch erkennbar. aj – Adhaerenzzone, bb – Basalkörper, ce – Centriole (Ciliogenesestadium), dci – Cilien der definitiven Epidermis, dcr – Cilienwurzel in der definitiven Epidermis, de – definitive Epidermis, dec – Zelle der definitiven Epidermis, lci – Cilien der larvalen Epidermis, lcr – Cilienwurzel in der larvalen Epidermis, le – larvale Epidermis, lec – larvale Epidermiszelle, mg – Mitteldarm, mgc – Mitteldarmzellen, mi – Mitochondrium, mv, Mikrovillus, n – Zellkern, p – Rüsselanlage, yv – Dottervesikel.

Cilienwurzeln auf. In diesen Zellen weist die längere Cilienwurzel senkrecht ins Innere der Zelle, während die kürzere der beiden parallel zur apikalen Zellmembran verläuft. Apikale

Mikrovilli sind in einer ähnlichen Form ausgebildet, wie sie die larvale Epidermis aufweist. Das Cytoplasma der bewimperten Zellen zeigt sich elektronendichter als das der entsprechenden Zellen der larvalen Epidermis. Es enthält neben zahlreichen Vesikeln unterschiedlicher Größe eine Vielzahl von Centriolen, die auf andauernde Ciliogenese hinweisen (Abb. 3.3.2C). Die Mitochondrien sind zahlreicher in diesen Zellen, wobei sie sich vor allem um die ciliären Basalstrukturen und um den basal liegenden Zellkern verteilen. Elektronendunkel gefärbte, lipidhaltige Dottervesikel sind in den Zellen zwar vorhanden, aber in deutlich geringerer Anzahl als in den bewimperten Zellen der larvalen Epidermis (Abb. 3.3.2D). Einige dieser Zellen zeigen deutliche Anzeichen mitotischer Aktivität. In diesen Regionen ist die Oberfläche des Epithels nach innen eingefaltet, vermutlich um dem Platzbedarf des entstehenden Gewebes Rechnung zu tragen. Zwischen den bewimperten Zellen befinden sich in diesem Epithel Drüsenzellen verschiedensten Inhalts, aber keinerlei Nervenzellfortsätze. Alle beschriebenen Zellen sitzen einer basalen extrazellulären Matrix auf.

Am 13. Tag der Entwicklung ist die oben beschriebene larvale Epidermis nahezu vollständig von dem sich entwickelnden Jungtier abgelöst, die Amnionhöhle ist nun durchgängig. Einzig über das Epithel des Vorderdarms besteht noch eine Verbindung des Jungtieres mit der larvalen Hülle (Abb. 3.3.1D). Im Jungtier ist unter der Epidermis bereits die Anlage des Hautmuskelschlauchs mit äußeren zirkulären und inneren längs verlaufenden Muskelsträngen zu beobachten (Abb. 3.3.1E, G). Am 15. Tag zeigt sich ein vollständig verändertes Bild. Durch den nun prall gefüllten Darm hat sich die Gestalt des Tieres von der beschriebenen rhomboiden Form in eine oval bis tropfenförmige gewandelt, wobei die breiteste Stelle nun auf der Höhe des Mitteldarms lokalisiert ist (Abb. 3.3.1H). Die Epidermis zeigt sich als einschichtiges Epithel, das aus schmalen, multiciliär bewimperten sowie darin eingestreuten aciliären Drüsenzellen besteht (Abb. 3.3.2E; F). Die Zellkerne stehen dichter, wie in mit Sytox gefärbten Präparaten gut sichtbar, und auch in transmissionselektronenmikroskopischen Bildern sind die kleineren Dimensionen der Zellen zu erkennen (Abb. 3.3.1I; Abb. 3.3.2F). Die ultrastrukturelle Untersuchung enthüllt, dass diese Zellschicht alle Charakteristika der oben beschriebenen, definitiven Epidermis aufweist. Es finden in ihr nach wie vor Mitosen und Ciliogenese statt (Abb. 3.3.2F). Proximal dieser Schicht befindet sich die basale extrazelluläre Matrix sowie daran anschließendes mesodermales Gewebe mit Zellen unterschiedlicher Gestalt, unter anderem auch Muskelzellen. Der Mund wird durch eine Gewebsbrücke verschlossen, so dass in der Epidermis nur ein flaches Grübchen erkennbar ist.

Der Darminhalt besteht aus Zelltrümmern, in denen sich große elektronendunkle Lipidvesikel, Adhaerenzonen und einige Cilien befinden (Abb. 3.3.2G). Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass es sich hierbei um die larvale Epidermis handelt, die, analog zur als katastrophal bezeichneten Metamorphose der *Pilidium*larve (siehe Cantell 1969), verschluckt wurde. Die Metamorphose läuft beim größten Teil der Entwicklungsstadien bei einer Zuchttemperatur von 17 °C am 14. Tag ab. In der folgenden Entwicklung gewinnt die Larve durch Streckung an Körperlänge, wird dabei jedoch auch schmaler. Am 19. Tag wird die Eikapsel verlassen und die Jungtiere beginnen in den äußeren Schichten der Eigallerte herumzukriechen. Am 26. Tag nach der Eiablage sind die Jungtiere etwa 1000 µm lang, und fast alle haben die Eigallerte verlassen. In ihrem Darm befinden sich noch Reste der larvalen Epidermis. Eine Afteröffnung ist bei Phalloidin/Sytox-Grün markierten Tieren nicht sichtbar (mit ultrastrukturellen Methoden nicht überprüft).

3.4 Ultrastruktur und Entwicklung der rhabdomerischen Augen von *Lineus viridis* (Heteronemertea, Nemertea)

Döhren, J von & T Bartolomaeus (2007) Ultrastructure and development of the rhabdomeric eyes in *Lineus viridis* (Heteronemertea, Nemertea) Zoology 110: 430-438

Frisch geschlüpfte Larven der Art *Lineus viridis* (Müller, 1774) besitzen ein Paar Ocellen, die sich am anterioren Körperpol, dorso-lateral der Kopfschlitz befinden. Während die Tiere wachsen erhöht sich die Anzahl der Augen kontinuierlich bis auf 12 Paare. Am Aufbau des Auges sind drei Zelltypen beteiligt, Pigmentzellen, Cornea-Zellen und Rezeptorzellen. Die Pigmentzellen bilden basal einen halbkugelförmigen Augenbecher, der die Rezeptorzellen nach unten hin abschirmt. Die Cornea-Zellen stellen die apikale Bedeckung der Augenhöhle dar. Zwischen diesen genannten Zellschichten befinden sich die rhabdomerischen Fortsätze der Rezeptorzellen, die über dendritische Verbindungen mit den Perikaryen verbunden sind, die außerhalb des Pigmentbeckers liegen. Alle drei am Aufbau des Auges beteiligten Zelltypen sind über Adhaerenzonen miteinander verbunden; septierte Verbindungen konnten nicht nachgewiesen werden. Augen bei verschiedenen Entwicklungsstadien unterscheiden sich lediglich in der Anzahl der an ihrem Aufbau beteiligten Zellen. Im Auge des frisch geschlüpfen Jungtieres wird der Pigmentbecher von etwa 10 Zellen gebildet. Aufgrund der starken, fingerartigen Auffaltung der Zellmembran ist die genaue Zahl nicht klar festzustellen. Diese Auffaltungen geben dem Auge eine unregelmäßige äußere Form. Der auffälligste Bestandteil der Zellen sind etwa 200 nm große Vesikel, deren Inhalt verschieden elektronendicht ist. Sie sind im zentralen Bereich der Zellschicht verteilt und stellen Pigmentvesikel dar. In dieser Region finden sich darüber hinaus praktisch keine anderen Organellen. Die Zellkerne der pigmentierten Zellen liegen am Rand des Augenbeckers und sind von wenigen Mitochondrien sowie typischen Organellen eukaryotischer Zellen umgeben, nämlich Golgi-Apparat, endoplasmatischem Reticulum, Ribosomen und kleineren Vesikeln mit verschiedenem Inhalt. In den Zellen sind keine Diplosomen oder Cilien auszumachen. Nach außen hin wird der Augenbecher nur von unzusammenhängenden Flecken extrazellulärer Matrix umgeben, und es passieren ihn Muskelzellen, die nicht durch extrazelluläre Matrix von den Pigmentzellen separiert sind. In diesem Entwicklungsstadium bedecken 3-5 Cornea-Zellen die Augenhöhle in Richtung des einfallenden Lichts. Es handelt sich hierbei um flache Zellen, die die rhabdomerischen Fortsätze der Rezeptorzellen vollständig ummanteln und so basal auch zwischen diesen und den Pigmentzellen zu liegen

kommen. Die Zellkerne dieses Zelltyps sind ovoid und immer zum einfallenden Licht hin ausgerichtet. In jeder Zelle findet sich in der Nähe des Nucleus ein kurzes, rudimentäres Cilium mit einem $9 \times 2 + 0$ Axonem das sich in die Augenhöhle erstreckt. Der Basalkörper dieses Ciliums ist mit einem unauffälligen Basalfüßchen und einer kurzen Cilienwurzel ausgestattet. Ein akzessorisches Centriol befindet sich rechtwinklig neben dem Basalkörper angeordnet. Zusätzlich ist in der Nähe der Basalstrukturen dieses Ciliums immer ein Golgi-Stapel zu finden. Neben diesem Cilium ist die Zellmembran auffällig glatt, es gibt keine Mikrovilli. Das Auge weist 10 Rezeptorzellen auf. Ihre Perikaryen liegen außerhalb des Augenbeckers und weisen zwei feine neuritische Fortsätze auf; der eine zieht ins zentrale Nervensystem, der andere verläuft in Richtung des Augenbeckers. Dabei passieren die dendritischen Ausläufer einzeln oder in Gruppen die Pigmentzellschicht und füllen, indem sie sich stark vergrößern, die Augenhöhle mit rhabdomerischen Strukturen vollständig aus. In dem untersuchten Jungtier sind vier der dendritischen Ausläufer derart vergrößert, dass sie zwei Drittel des in der Augenhöhle vorhandenen Raumes für sich beanspruchen. Die rhabdomerischen Bereiche der Zellausläufer zeichnen sich durch eine in lange Mikrovilli aufgefaltete Zellmembran aus. Ihr Cytoplasma ist angefüllt mit kleinen Vesikeln unterschiedlichen Inhalts, Mitochondrien oder andere Organelle sind nicht zu entdecken. Jeder Fortsatz weist ein einzelnes Cilium auf, das in einer tiefen Einsenkung der Zellmembran inseriert, die der Eintrittsstelle der Dendriten in die Augenhöhle mehr oder weniger direkt gegenüberliegt. Das Cilium weist ein rudimentäres Axonem mit einem $9 \times 2 + 1$ Mikrotubulimuster auf, dessen zentraler Tubulinzylinder an der Basalplatte des Basalkörpers verankert ist. Es ist kein Basalfüßchen oder akzessorisches Centriol nachweisbar, wohl aber eine lange Cilienwurzel, die senkrecht ins Innere der Zelle weist. Die restlichen 6 rezeptorischen Ausläufer der sensorischen Neurone, die das restliche Drittel der Augenhöhle besetzen, enthalten die gleichen Strukturen, sind aber weniger weit entwickelt. Die Zellausläufer sind schmaler, beherbergen weniger Vesikel im Cytoplasma und haben kürzere Mikrovilli. Das Cilium, das in diesen Zellen genauso aufgebaut ist wie in den größeren Fortsätzen, ist in diesen Zellen weniger weit eingesenkt. Die Neuriten der letztgenannten Zellen treten im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen nicht im Bündel, sondern einzeln durch die Pigmentzellschicht des Augenbeckers hindurch (zur Übersicht siehe Abb. 3.4.1B).

In einem älteren Jungtier konnte die Augenanlage des zweiten Augenpaars untersucht werden, die von außen, da unpigmentiert, nicht sichtbar ist. Die Augenhöhle wird von fünf undifferenzierten, kubischen Zellen gebildet, die untereinander und mit den von ihnen

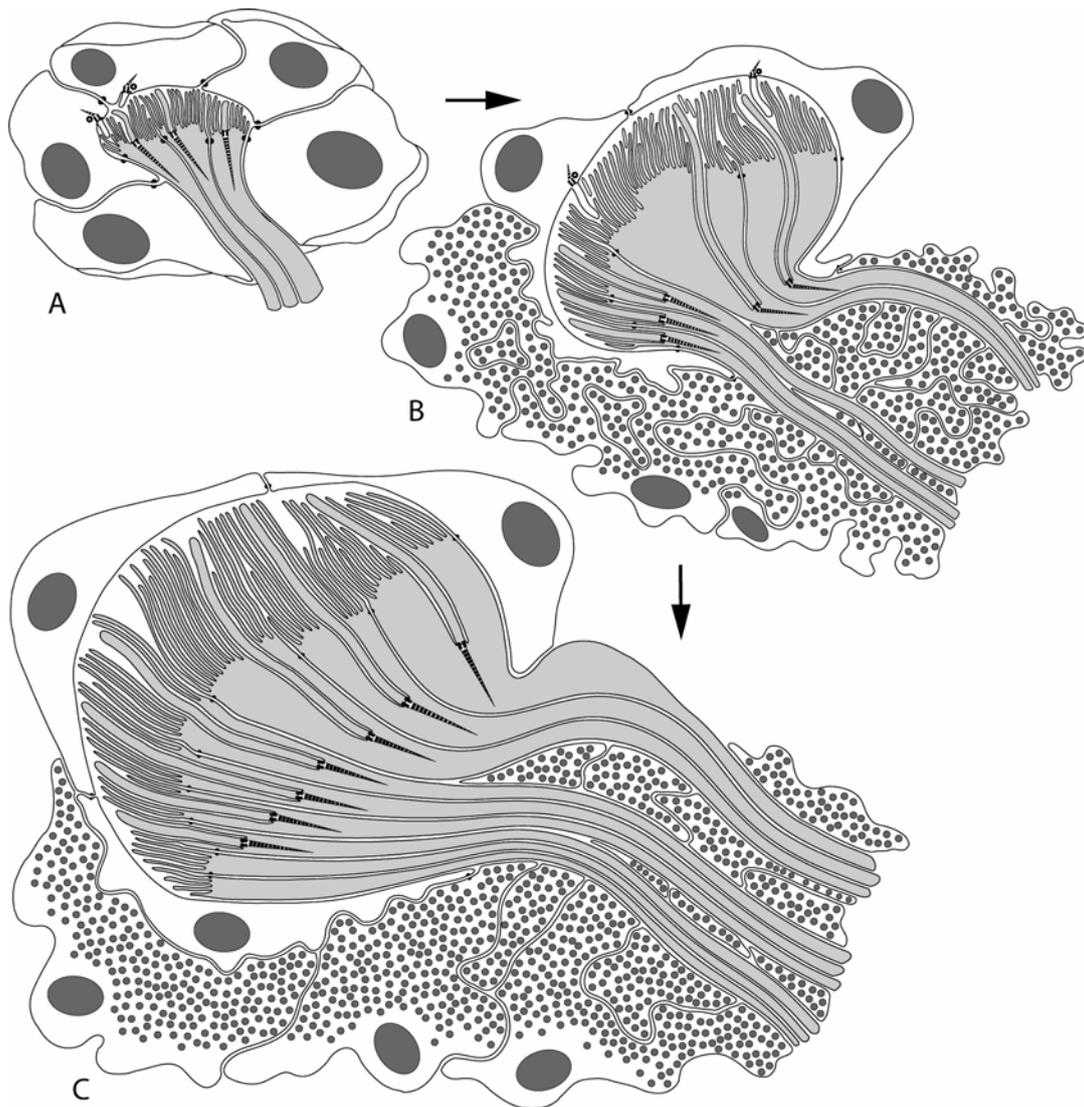


Abbildung 3.4.1: Augenentwicklung von *Lineus viridis* (Heteronemertea). Rekonstruktion. **A.** Augenanlage. **B.** Erstes Paar Augen bei 13 Tage alten Jungtieren. **C.** Adultauge, Perikaryen der Rezeptorzellen sind nicht gezeigt. – Rezeptorzellen in hellgrau, Pigmentvesikel und Zellkerne der Cornea- und Pigmentzellen in dunkelgrau. (aus Döhren & Bartolomaeus 2007; siehe Anhang, Manuskript 4)

umgebenen Rezeptorzellausläufern über Adhärenzzonen verbunden sind. Die Zellen weisen neben einem elektronenhellen Cytoplasma mit wenigen Organellen und einem peripher liegenden eiförmigen Zellkern ein Cilium mit einem $9 \times 2 + 0$ Axonem auf, das in die Augenhöhle weist. Es handelt sich um sich differenzierende Cornea-Zellen, die hier die gesamte Augenhöhle bilden. In der Augenhöhle sind die dendritischen Ausläufer von 3 Neuronen nachzuweisen. Sie weisen in diesem Stadium weniger Mikrovilli auf der Zellmembran und weniger Vesikel im Cytoplasma auf. Ein Cilium, das ein Axonem mit einem $9 \times 2 + 1$ Mikrotubulimuster, einen Basalkörper mit Basalplatte und einer senkrechten Cilienwurzel aufweist, ist vorhanden, jedoch weniger stark in die Zelle eingesenkt. Es werden in der Anlage keine Zellen gefunden, die Pigmentvesikel enthalten (zur Übersicht siehe Abb.

3.4.1A). Im Zuge der Entwicklung bildet sich basal die Pigmentzellschicht aus, und die Anzahl der dendritischen Ausläufer erhöht sich, indem diese in die Augenhöhle hineinwachsen. Dabei steigt die Zahl von drei in der unpigmentierten Augenanlage über 14 im älteren Jungtier auf über 30 in den Augen erwachsener Tiere an. Damit einhergehend quillt die Region, die die rhabdomerischen Ausläufer der Rezeptorzellen enthält, über den pigmentierten Teil des Augenbeckers hinaus und die benachbarten Cornea-Zellen flachen sich stark ab. Ihr Cytoplasma erscheint dadurch elektronendichter (zur Übersicht, siehe Abb. 3.4.1C)

Bei adulten Tieren sind die 12 Augenpaare in je einer Reihe dichtstehend des Rostrums dorsal der Kopfschlitze angeordnet, wobei jedes Auge in eine andere Richtung orientiert ist. Zusätzlich zeigt sich, dass der Entwicklungsstand der Augen nicht einem antero-posteriorem Gradienten folgt, woraus zu schließen ist, dass sich die Augen nicht kontinuierlich von vorn nach hinten ausbilden, sondern auch zwischen zwei ausgebildeten Augen ein neues Auge angelegt werden kann. Die Pigmentschicht ist bei den Augen der adulten Tiere vergleichsweise mächtiger als bei den untersuchten Juvenilstadien, da sie aus deutlich mehr Zellen besteht. Die Zellkerne dieser Zellen stellen sich elektronenheller dar, weisen aber einen deutlich ausgebildeten Nucleolus auf. Der Zellkern der Cornea-Zellen im erwachsenen Auge ist unregelmäßig geformt und enthält deutliche Mengen an peripherem Heterochromatin. Im Inneren des Rezeptorbereichs, zwischen den Mikrovilli der rhabdomerischen Ausläufer der Rezeptorzellen, befindet sich ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, dessen Funktion unklar ist.

L. viridis hat subepidermal gelegene Augen, die im Laufe der Ontogenese nicht aus der Epidermis in die Tiefe sinken oder in irgendeinem Zusammenhang mit der Epidermis stehen. Auf der Basis der Untersuchung der Augenentwicklung bei *L. viridis* wird deutlich, dass die Rezeptoren aus dem Nervensystem auswachsen und in den Augenbecher eintreten. Damit werden eine Vergrößerung jedes einzelnen Auges und eine Erhöhung der Rezeptordichte im Augenbecher durch die Addition von sensorischen Dendriten erreicht, die nach dem Einwachsen ihre Oberfläche durch Ausbildung von Mikrovilli vergrößern. Die Pigmentzellen und die Cornea-Zellen sind ebenfalls subepidermalen Ursprungs. Es wird für die Augen anderer Nemertinen zu prüfen sein, welche Merkmale des hier beschriebenen Auges plesiomorph sind.

3.5 Vergleichende Ultrastruktur der Spermien von Nemertinen

Döhren, J von, P Beckers, R Vogeler & T Bartolomaeus (eingereicht) Comparative sperm ultrastructure in Nemertea. Journal of Morphology.

Die Ultrastruktur der Spermatozoen ist bisher nur von wenigen Nemertinen-Arten bekannt. Aufgrund von vielversprechenden Resultaten in anderen Gruppen (u.a Bivalvia: Giribet & Wheeler 2004) werden die Spermien verschiedener Nemertinen-Species vergleichend auf ihre Verwendbarkeit für kladistische Analysen untersucht. Dazu wurden die Spermatozoen von *Carinoma mutabilis*, Griffin 1998, *Procephalothrix filiformis* (Johnston, 1828), *Procephalothrix oestrymnicus* Junoy & Gibson, 1991 und *Tubulanus (Carinella) linearis* (McIntosh, 1873-1874), die zu den „Palaeonemertea“ gehören, von *Rhampogordius lacteus*, Rathke 1843, *Rhampogordius pseudolacteus* (Gontcharoff, 1951) und *Rhampogordius sanguineus* (Rathke, 1799) als Vertreter der Heteronemertea sowie von *Amphiporus imparispinosus* Griffin 1898 und *Paranemertes peregrina* Coe, 1901 aus der Gruppe der Hoplonemertea ultrastrukturell bearbeitet. Ergänzend analysiert wurden eine Palaeonemertine, *Tubulanus polymorphus* Renier, 1804, und zwei Hoplonemertinen *Emplectonema gracile* (Johnston, 1837) und *Zygonemertes virescens* (Verill, 1879). Die Spermien aller untersuchten Arten besitzen ein Akrosom, einen Zellkern ein oder mehrere Mitochondrien, ein Paar Centriole und ein einzelnes Flagellum, das terminal vom distalen Centriol ausgeht. Das Axomen des Schwanzfadens weist in allen Arten eine reguläre $9 \times 2 + 2$ Anordnung der Mikrotubuli auf. Obwohl zum Teil von vorgeblich nahe verwandten Arten mit scheinbar ähnlichen Fortpflanzungsstrategien stammend, zeigen die Spermien der untersuchten Arten eine bemerkenswerte Diversität in ihrer Ultrastruktur. Während die Spermienköpfe bei über der Hälfte der Arten relativ kompakt gebaut sind und eine Länge von 5 μm nicht überschreiten, sind sie bei 5 Arten in unterschiedlicher Weise verlängert. *P. filiformis* und *Z. virescens* zeigen einen nur wenig verlängerten Spermienkopf, bei *A. imparispinosus*, *E. gracile* und *P. peregrina* ist er deutlich verlängert und weist einen deutlich geringeren Durchmesser auf. Bis auf die erstgenannte Art sind die übrigen Species Vertreter der Hoplonemertea. Bei zwei der Arten mit deutlich verlängertem und verschmälertem Spermienkopf, nämlich *A. imparispinosus* und *E. gracile*, ist zusätzlich noch das Mittelstück, das die Mitochondrien enthält, mit dem eigentlichen Spermienkopf verschmolzen, so dass äußerlich nur ein Kopf-Mittelstück-Komplex zu erkennen ist. *P. peregrina* und *E. gracile* besitzen Spermien, bei denen sich Leisten in verschiedener Anzahl (bei *P. peregrina* 4, bei *E.*

gracile 5) spiralg der Länge nach um die Zelle winden. Der spiralisierte Bereich liegt zwischen zwischen Akrosom und anteriorem Ende der Mitochondrien-Region.

Das Akrosom besteht bei den meisten Arten aus einem nahezu konischen akrosomalen Vesikel, bei dem Länge und maximaler Durchmesser in etwa gleich sind. Eine ungewöhnliche Form weisen Spermatozoen von *P. filiformis* auf, denn ihr akrosomales Vesikel ist ringförmig und hat einen durchgehenden zentralen Porus. Bei den Vertretern der Heteronemerteia, den *Ramphogordius* Arten, ist dieses Vesikel kompakt konisch und von einem deutlichen subakrosomalen Kompartiment unterlagert, welches von einer ringförmigen posterioren Verdickung des akrosomalen Vesikels umringt wird, dem akrosomalen Ringkomponenten. Die Grundform des konischen akrosomalen Vesikels findet sich auch bei der Mehrzahl der hoplonemertinen Arten, die untersucht wurden. Hier ist der Konus in unterschiedlichem Grad verlängert und posterior stark invaginiert, so dass sich in dieser Einsenkung ein stark verlängerter subakrosomaler Bereich zeigt. Eine Ausnahme stellt *Z. virescens* dar, dessen Akrosom kugelförmig ist und leicht schräg versetzt anterior des Zellkerns liegt. Weitere Arten mit einem nach lateral versetzten akrosomalen Vesikel sind *C. mutabilis*, dessen Vesikel discoidal ist, *P. oestrymnicus* mit einem flach-konischen akrosomalen Vesikel und *P. filiformis*, dessen ungewöhnliche Form weiter oben bereits beschrieben wurde.

Der Inhalt des Zellkerns ist in den reifen Spermatozoen aller untersuchten Arten nahezu vollständig zu einer homogenen, elektronendunklen Masse kondensiert. Seine äußere Form ist in den verschiedenen Arten jedoch deutlich unterschiedlich. Die Spermien der meisten untersuchten Arten weisen die Form eines Kegelstumpfes auf, der sich nach apikal verjüngt. Das gilt insbesondere für die *Ramphogordius* Arten und *T. polymorphus*. Der Zellkern der zur gleichen Gattung gehörenden Art *T. linearis*, sowie der zwei weiterer Palaeonemerteia, *P. oestrymnicus* und *C. mutabilis*, ist nahezu kugelförmig. Stark verlängerte Nuclei zeigen die Spermien der Hoplonemertinen-Arten *A. imparispinosus*, *E. gracile* und *P. peregrina*, bei denen zusätzlich noch laterale, longitudinal verlaufende Leisten auftreten (bei *A. imparispinosus* und *P. peregrina* 4, bei *E. gracile* 5), die bei den beiden letztgenannten Arten spiralg um den Kern herumlaufen. Bei den Vertretern der Hoplonemerteia besitzt der Kern eine anteriore Invagination, die bei *Z. virescens* eine solche Tiefe erreicht, dass das apikal davor liegende akrosomale Vesikel teilweise darin eingesenkt ist. Zugleich ist diese Art die einzige, dessen Spermienkern keine posteriore, teilweise das proximale Centriol umfassende Einsenkung aufweist.

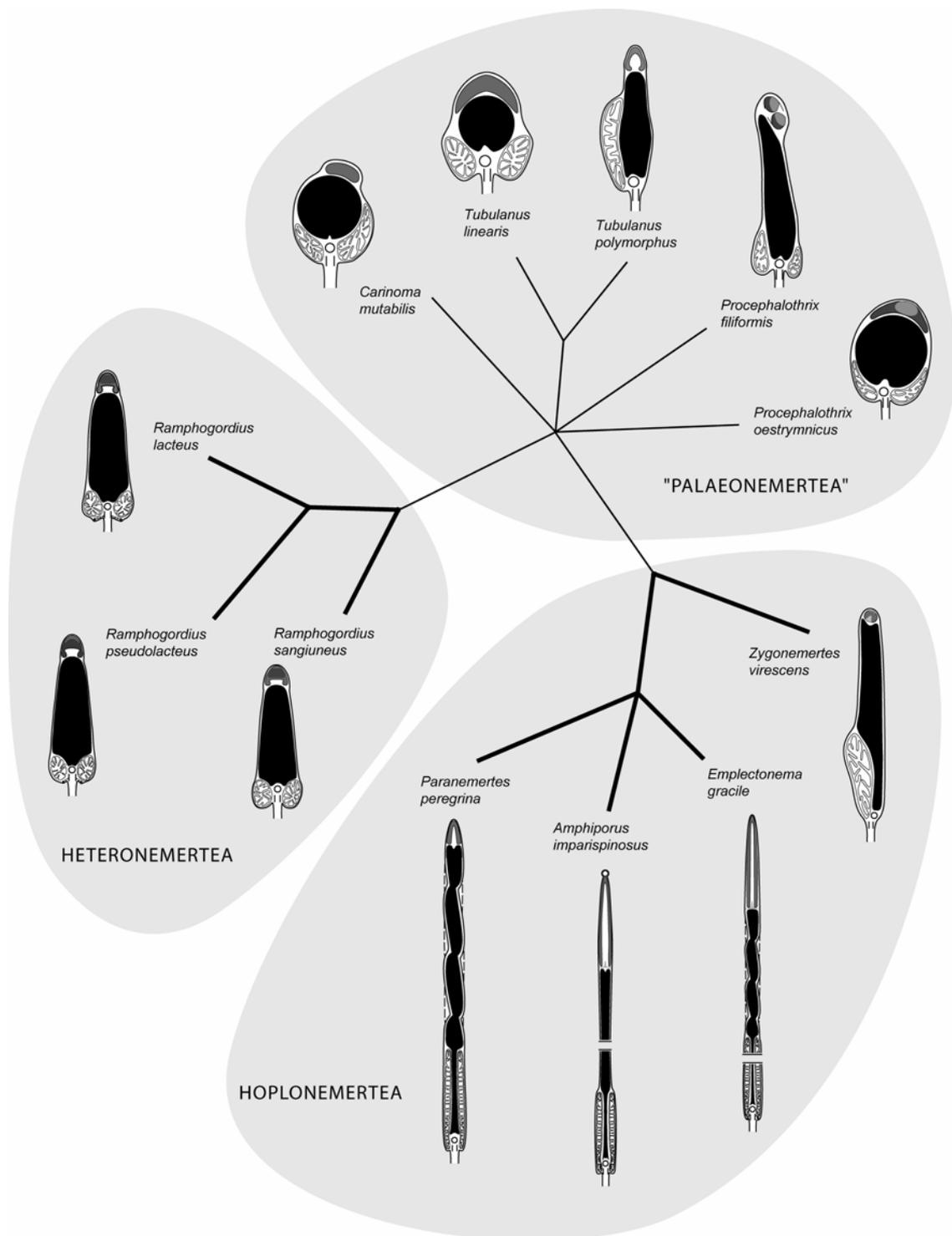


Abbildung 3.5.1: Verteilungsmuster der Spermienmerkmale der untersuchten Nemertinenarten, basierend auf existierenden phylogenetischen Analysen (Sundberg et al. 2001, Sundberg & Strand 2007, Thollesson & Norenburg 2003). Verzweigungen, die von Spermienmerkmalen gestützt werden, sind mit fetten Linien gekennzeichnet, Knoten die von Spermienmerkmalen nicht unterstützt werden, sind kollabiert gezeigt. (aus Döhren et al., eingereicht, siehe Anhang, Manuskript 5)

Mitochondrien finden sich in Spermien aller Arten im posterioren Teil der Zelle, sie weisen jedoch unterschiedliche Anzahl und Formen auf. Die drei Heteronemertinen-Arten besitzen konstant 5 annähernd kugelförmige Mitochondrien, die in einem Ring um den posterioren

Teil des Zellkerns sowie um die Centriolarkörper des Schwanzfadens angeordnet sind. Bei den übrigen Arten wurde nur ein Mitochondrium nachgewiesen. Dieses ist bei *T. polymorphus* und *Z. virescens* länglich und liegt dem Nucleus seitlich an. Das Mitochondrium in den Spermatozoen der übrigen Arten bildet einen Ring um die Centriole und zieht unterschiedlich weit nach anterior am Zellkern entlang. Dieser mitochondriale Kragen ist nur in Spermien der Arten *T. linearis* und *A. imparispinosus* durchgängig; bei den anderen Arten mit einem kragenförmigen Mitochondrium stoßen zwar die Außenmembranen des Mitochondriums aneinander, sind aber nicht fusioniert, so dass ein diskontinuierlicher Ring entsteht. Bei den Hoplonemertinen *A. imparispinosus*, *E. gracile* und *P. peregrina* ist der mitochondriale Kragen stark nach anterior verlängert und umschließt somit den posterioren Teil des Zellkerns. In dieser Region verjüngt sich der Zellkern zu einem dünnen Kernstab und büßt bei allen drei Arten auch die lateralen Leisten ein, die weiter nach anterior seinen Querschnitt bestimmt haben. Bei *P. filiformis* und *C. mutabilis* erstreckt sich der Mitochondrienring an den Seiten des Zellkerns auf unterschiedliche Höhen; die mitochondriale Masse ist ungleichmäßig verteilt.

Die Centriolarkörper des Flagellums sind bei allen untersuchten Arten rechtwinklig zueinander angeordnet und werden nach lateral von der Mitochondrienmasse und nach anterior von der Kernmembran umstanden. Während es beim überwiegenden Teil der Arten coaxial mit dem distalen Centriols in der Längsachse der Spermienzelle liegt, ist bei Spermien von *P. oestymnicus*, *T. linearis*, *T. polymorphus* und *Z. virescens* das proximale Centriol leicht nach lateral verschoben und liegt so seitlich der Längsachse des Spermiums. Das "cartwheel" des distalen Centriol weist bei *R. lacteus* und *R. pseudolacteus* eine zusätzliche Struktur auf, die aus konzentrischen Ringen besteht, die untereinander mit Speichen aus fibrillärem, nicht membranumschlossenen elektronendunklem Material besteht. Diese Speichen haben ihre Verankerung am distalen Centriol. Bei *R. lacteus* sind drei konzentrische Ringe zu beobachten, bei *R. pseudolacteus* dagegen nur zwei. Eine ähnliche Struktur, die jedoch nur aus einem Ring besteht, der um das distale Centriol herumläuft, findet sich bei *A. imparispinosus*.

Die aus der vergleichenden Untersuchung der Ultrastruktur der Spermien gewonnenen Daten wurden zusammen mit Literaturdaten, die für 8 weitere Arten in ausreichender Detailliertheit vorliegen, in einer Merkmalsmatrix kodiert. Dabei wurden 20 Merkmale erfasst. Bei der Analyse der Literaturdaten zeigte sich, dass einige Beschreibungen keine hinreichende

Qualität bezüglich der erfassten Details aufwiesen, so dass sie sich einer Kodierung entzogen. Diese Matrix repräsentiert den ersten Versuch, die Merkmale der Ultrastruktur für eine kladistische Analyse zugänglich zu machen. Diese Matrix legt insofern eine Grundlage, als sich zukünftige Beschreibungen an den erfassten Merkmalskomplexen orientieren können um Vergleichbarkeit zu schaffen. Um die Bedeutung der kodierten Merkmale abschätzen zu können, wurde eine Analyse der Merkmalsverteilung für die in dieser Studie untersuchten Arten durchgeführt. Dafür wurden 5 weitere Merkmale der generellen Morphologie ergänzt. Der resultierende Baum zeigt, dass Daten zur Spermienmorphologie die Monophylie der Heteronemertea und der Hoplonemertea unterstützen; die „Palaeonemertea“ bleiben erwartungsgemäß unaufgelöst bleiben (Abb. 3.5.1).

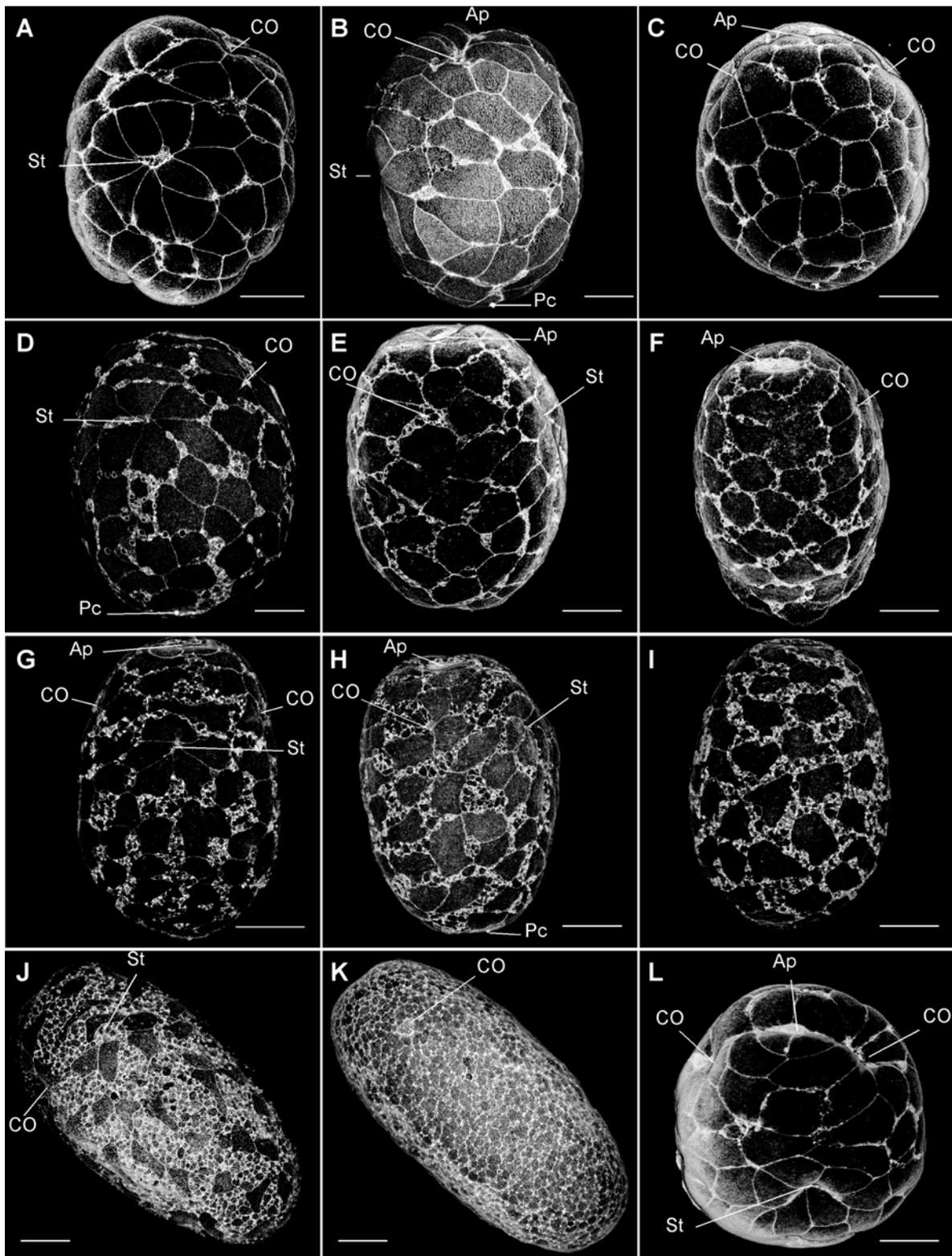
3.6 Larvalentwicklung mit transitorischer Epidermis von *Paranemertes peregrina* und anderen Hoplonemertinen (Nemertea)

Maslakova S & J von Döhren (angenommen) Larval development with transitory epidermis in *Paranemertes peregrina* Coe, 1901 and other hoplonemerteans (Phylum Nemertea). Biological Bulletin

Die Entwicklung der Larve von *Paranemertes peregrina* Coe, 1901, eines Vertreters der Hoplonemertea, wurde von der Befruchtung der Eizelle bis zum 3-Wochen alten Stadium verfolgt, das bereits einer Miniaturausgabe des Adulttieres ähnelt. Die Ergebnisse werden mit Beobachtungen zur Entwicklung von zwei weiteren Hoplonemertinen-Arten, *Antarctonemertes (Tetrastemma) phyllospadicola* (Stricker, 1985) und *Oestedia dorsalis* (Abildgaard, 1806), verglichen und vor dem Hintergrund der Evolution der Hoplonemertinen-Larve bewertet.

Die Oozyte von *P. peregrina* ist kugelförmig, hat eine rosa bis rosigbraune Farbe und misst 240 µm im Durchmesser. Sie ist umgeben von einer ca. 35 µm starken Eihülle, die ihrerseits von einer ca. 500 µm mächtigen Gallerthülle umschlossen ist. Die Zygote entwickelt sich über eine äquale Spiralfurchung zu einer planktischen, lecitotrophen Larve. Die zwei Polkörperchen sind zweieinhalb Stunden nach der Fertilisation erkennbar. Die erste Furchungsteilung erfolgt nach circa viereinhalb, die zweite fünf Stunden nach der Befruchtung. Das 8-Zellstadium ist nach sieben Stunden ausgebildet. Die Gastrulation, die vermutlich durch eine Kombination aus Ingressions- und Invaginationsvorgängen erfolgt, resultiert nach 22 Stunden in einem tiefen, schmalen Blastoporus, der sich nach weiteren 24 Stunden vollständig verschließt. Kurze Zeit später schlüpft eine eiförmige, dann 50 Stunden alte Larve aus ihrer Eihülle. Sie besitzt neben einem kurzen apikalen Wimperschopf keine auffälligen äußeren Merkmale. Im Inneren der Larve sind mit Hilfe der Markierung von fibrillärem Aktin mittels Phalloidin die ersten Anlagen verschiedener Organsysteme nachzuweisen. Apikal, auf Höhe des Wimperschopfes, ist das Apikalorgan als deutlich markierte Einsenkung erkennbar. Die Anlage des Rüssels ist als ein Zellhaufen in der apikalen Region im Inneren der Larve, anterior des verschlossenen Archenterons zu lokalisieren. Beidseitig lateral davon beginnen sich die Anlagen der Cerebralorgane von der Epidermis her einzufalten. In der folgenden Zeit verlängern sich die Cilien des apikalen Wimperschopfs, so dass dieser deutlich hervortritt. Die Einfaltung des Mundes weitet sich zum Vorderdarm, der jedoch noch keinen Kontakt mit dem Mitteldarm aufnimmt. Im Inneren

der Larve beginnen Neuro- und Myogenese, so dass sich am vierten Tag der Entwicklung in einer aktiv schwimmenden Larve folgendes Bild bietet. Die Grundelemente des Nervensystems sind aufgrund des in ihren Axonen enthaltenen Aktins identifizierbar. Sie bestehen aus einem ringförmigen Cerebralganglion um die nun stark verlängerte Rüsselanlage und einem Paar laterale Nervenstränge, die vom ventralen Teil des Cerebralgangliens ringes ventrolateral nach caudal ziehen. Auch die ersten Aktin enthaltenden Zellen erscheinen



zwischen Epidermis und Darmepithel. Es handelt sich dabei um Myogenese-Stadien. Die Cerebralorgananlagen sind weiter ins Innere verlängert, so dass sie in der Nähe des Cerebralganglions zu liegen kommen, und halten nur noch über einen kleinen Porus Kontakt mit der Außenwelt.

Bis zum fünften Entwicklungstag haben sich Anlagen fast aller Adultorgane ausgebildet. Die Fusion der Innenräume von Vorder- und Mitteldarm hat zu einem blind-endenden larvalen Darm geführt, während Nervensystem und Cerebralorgane nun sehr deutlich lateral davon hervortreten. In der Rüsselanlage sind zwei Zellschichten auszumachen, von denen sich die äußere vermutlich später zum Rhynchocoel differenzieren wird. Der Hautmuskelschlauch ist gitterartig aus zwei Schichten aufgebaut, einer äußeren Ring- und einer inneren Längsfaserschicht. Am achten Tag nach der Befruchtung hat sich eine feine diagonale Muskelschicht zwischen Ring- und Längsmuskulatur etabliert, lebende Larven kontrahieren sich. Im gestreckten Zustand ist die Larve jetzt 450 µm lang und 200 µm breit. Der sich entwickelnde Rüsselschlauch ist 75-80 µm lang und weist eine feine Muskelschicht auf. Außerdem hat sich die Rüsselinsertionsmuskulatur begonnen zu entwickeln. Die zehn Tage alte Larve beginnt dem Jungtier zu ähneln; sie verfügt jetzt über einen apikalen sowie einen etwas kürzeren caudalen Wimperschopf und hält sich bevorzugt am Boden auf. 4-6 rötlich-braune Augen sind im vorderen Bereich der Larve sichtbar, die sich paarweise an den Lateralseiten des Körpers angeordnet haben. Durch den durchscheinenden Körper sind deutlich das Cerebralganglion und die lateralen Hauptnervenstränge zu erkennen. Nach zwei Wochen ist das Tier auf eine Länge von 550 µm Länge und eine Breite von 160 µm angewachsen. Es ist noch kein durchgehender Anus ausgebildet, jedoch zeigt sich eine flache caudale Einsenkung der Epidermis. Nach drei Wochen Entwicklungszeit hat sich die Larve auf 600 µm gestreckt, sie ist dabei 150 µm breit. Der apikale Wimperschopf ist noch nicht vollständig zurückgebildet, dafür hat sich ein funktionsfähiger Rüssel mit Stilettapparat

← **Abbildung 3.6.1: Planuliforme Larven von *Paranemertes peregrina* (Hoplonemertea).** Konfokale z-Projektionen von Phallacidin-Markierungen. Dargestellt sind die Umrisse der Epidermiszellen. Deutlich wird, dass die transitorische, larvale Epidermis (große Zellen) von der definitiven Epidermis (kleine Zellen) ersetzt wird. **A-C.** 2 Tage alte, kürzlich geschlüpfte Larve – der Großteil der Oberfläche ist von wenigen (etwa 100) großen Zellen der larvalen Epidermis bedeckt. **D-F.** 4 Tage alte Larve – kleine schmale Zellen der definitiven Epidermis treten zwischen großen larvalen Zellen auf. **G-I.** 5 Tage alte Larve – Anzahl der definitiven Epidermiszellen ist erhöht, während die larvalen Epidermiszellen in ihrer Anzahl gleich geblieben sind wie in früheren Entwicklungsstadien. **J.** 8 Tage alte Larve – larvale Epidermiszellen zeigen eine unregelmäßige Form und sind fast vollständig voneinander getrennt durch zahlreiche kleine, interkalierende Zellen der definitiven Epidermis. **K.** 10 Tage altes Jungtier – Zellen der larvalen Epidermis sind verschwunden, die gesamte Epidermis besteht aus kleinen Zellen. **L.** Aufsicht auf 2 Tage alte Larve von apikal. Apikaler Körperpol zeigt auf allen Bildern nach oben (oben links in **J** & **K**). **Links:** Ventralansicht. **Mitte:** Seitenansicht. **Rechts:** Dorsalansicht, außer **L.** Maßstäbe entsprechen 50 µm. *Ap* – Apikalorgan, *St* – Mund, *CO* – Porus des Cerebralorgans, *Pc* – posteriorer Wimpercirrus. (aus Maslakova & Döhren, angenommen zur Publikation, siehe Anhang, Manuskript 6)

gebildet. Die Tiere halten sich fast ausschließlich am Boden auf und attackieren mit ihrem Rüssel bereits Nectochaeta-Larven des Polychaeten *Nereis vexillosa* Grube, 1851, von dem sich auch die Erwachsenen ernähren (Roe 1970, 1976).

Neben dem Ablauf der Entwicklung und Organogenese wurde die Entwicklung der Körperdecke im Detail untersucht. Zusätzlich zur Phalloidin-Markierung von Aktinfasern wurden die Zellen der Epidermis auch ultrastrukturell charakterisiert. Diese Befunde ergänzen Daten zur Entwicklung der Epidermis der beiden anderen untersuchten Hoplonemertea-Arten. Die Epidermis von frisch geschlüpften Larven von *P. peregrina* besteht aus etwa 100 circa 50 µm breiten Zellen. Diese großen Zellen haben großteils eine unregelmäßige Form; es lassen sich aber einige Zellgruppen identifizieren und in späteren Stadien verfolgen. Das larvale Apikalorgan, welches ein deutliches Phalloidinsignal trägt, ist von 4 großen Zellen umstellt, die nach den Symmetrieachsen (medio-lateral und dorso-ventral) der Larve ausgerichtet sind. Eine weitere Zellgruppe besteht aus 9-10 großen Zellen, die eine Rosette um den ventro-median gelegenen larvalen Mund bilden. Im vier Tage alten Larvenstadium ist die Anzahl der großen Zellen gleich geblieben, jedoch zeigen sich kleinere interkalierende Zellen zwischen diesen großen. Der Mund hat sich verschmälert, daher sind nun nur noch 5-6 Zellen der ursprünglichen Rosette mit der Mundöffnung in Verbindung. Im weiteren Verlauf der Entwicklung bis zum achten Entwicklungstag nimmt die Zahl der kleinen Zellen zu, während an der Körperoberfläche Größe und prozentualer Anteil der großen Zellen abnehmen. Die Epidermis von zehn Tage alten Larven weist keine Spur von großen Zellen auf, der gesamte Körper ist von kleinen Zellen bedeckt (zur Übersicht siehe Abb3.6.1A-L).

Die ultrastrukturelle Untersuchung zeigt, dass die großen, multiciliär bewimperten Zellen mit zahlreichen, elektronendunklen Dottervesikeln gefüllt sind. Sie weisen einen mit 7-10 µm Durchmesser relativ großen Zellkern mit einem deutlichen Nucleolus von 1-2 µm Durchmesser auf. Der Kern enthält sonst wenig heterochromatisches Material, scheint also mitotisch inaktiv zu sein (Abb. 3.6.2A). In späteren Entwicklungsstadien zeigen sich in den Zellen dieses Typs deutliche Anzeichen der Degradation. So weisen sie Anhäufungen von Membranstapeln sowie unregelmäßig geformte Vakuolen auf (Abb. 3.6.2C). Die kleineren Zellen, die um die großen Zellen auftreten und diese später ersetzen, sind als zwei verschiedene Typen zu klassifizieren, multiciliär bewimperte Epidermiszellen und unbewimperte epidermale Drüsenzellen. Sie weisen apikal nur eine Breite von 2-5 µm auf (Abb. 3.6.2B). Neben einzelnen Dottervesikeln weisen die bewimperten Zellen einen Kern

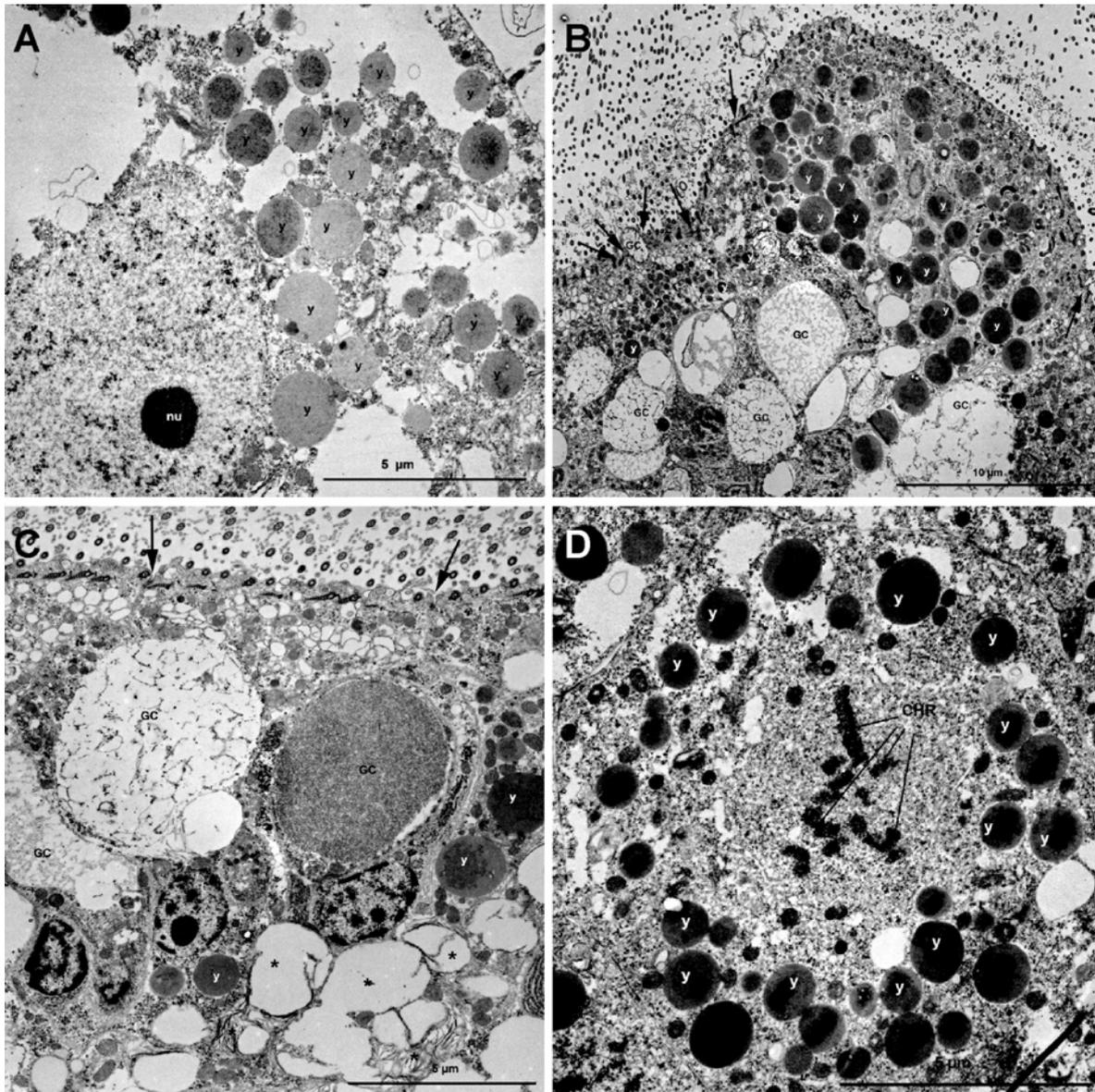


Abbildung 3.6.2: Epidermis von *Paranemertes peregrina* (Hoploneurtea). Embryo kurz vor dem Schlüpfen (A, B) und Larve (C, D). Transmissionselektronenmikroskopie A. Transitorische Epidermiszelle eines 48 Stunden alten Embryos, angefüllt mit Dottervesikeln – sie zeigt einen charakteristischen großen Zellkern mit wenig Heterochromatin und einem deutlichen Nucleolus. B. Große Zelle der transitorischen Epidermis, angefüllt mit Dottervesikeln – daneben einige deutlich kleinere Drüsenzellen der definitiven Epidermis. C. Transitorische Epidermiszelle einer 8 Tage alten Larve – deutliche Zeichen der Zelldegeneration sichtbar: Membranstapel und unregelmäßig geformte, elektronen-helle Vesikel (markiert durch Sternchen). Zellen der definitiven Epidermis weisen kleine Zellkerne auf, die viel Heterochromatin enthalten. Zellverbindungen markiert durch Pfeile. D. Zelle der definitiven Epidermis im 48 Stunden alten Embryo mit Dottervesikeln und einem Kern mit kondensierten Chromosomen. CHR – Metaphasechromosomen, GC – Drüsenzellen der definitiven Epidermis, nu – Nucleolus, y – Dottervesikel. (aus Maslakova & Döhren, angenommen zur Publikation, siehe Anhang, Manuskript 6)

von 1-2 μm Durchmesser auf, der mit großen Mengen Heterochromatin angefüllt ist. Die Vermutung, dass diese Zellen mitotisch aktiv sind, wird dadurch bestätigt, dass sich in einigen Zellen keine Kernmembran, dafür aber kondensierte Metaphasechromosomen befinden (Abb. 3.6.2D).

Entwicklungsstadien der Art *A. phyllospadicola* wurden zum Vergleich im Lichtmikroskop, im Rasterelektronenmikroskop und nach Phalloidinmarkierung im cLSM auf die Anwesenheit einer aus unterschiedlichen Zellpopulationen bestehenden Epidermis untersucht. Die erwachsenen Tiere sind 10 mm lang und besitzen 2 Paar Augen auf einem deutlich gestreckten Rostrum. Die gelb bis orangefarbenen dotterreichen Eier werden in pergamentartigen Eiballen in einer viskosen Gallerte in Gruppen zu 5-27 (durchschnittlich 14, n = 35) abgelegt. Sie sind kugelig bis eiförmig und messen etwa 310-375 µm im Durchmesser. Außen sind sie von einer dicht anliegenden, rigiden Eihülle umgeben, in denen sich die Jungtiere direkt entwickeln. Nach dem Schlupf der Jungtiere halten sich diese noch einige Wochen in der Gallerte des Eiballens auf, bevor sie das Gelege vollständig verlassen. Während der Entwicklung zeigt sich ein vertrautes Muster. Bei sich entwickelnden Embryonen sind im Dunkelfeld einige, verhältnismäßig große Zellen zu erkennen, die über die Oberfläche der Epidermis hinausragen. Mit Phalloidin markiert weisen diese Zellen einen stark markierten Randbereich auf, der auf ein festes Aktinfasernetzwerk hindeutet. Auch hier sind kleinere interkalierende Zellen zu beobachten. Im Rasterelektronenmikroskop ist erkennbar, dass die großen Zellen cilienlos, die kleinen jedoch mit kurzen Cilien ausgestattet sind. Bei der planktischen Hoplonemertinen-Art *O. dorsalis* wurde von Svetlana Maslakova eine Struktur der Epidermis beobachtet, die der von Entwicklungsstadien von *A. phyllospadicola* hinsichtlich des unregelmäßigen aufgeworfenen Charakters der Oberfläche ähnelt.

3.7 Kopfnieren der planuliformen Larven von *Procephalothrix filiformis* und *Carinoma mutabilis* (Nemertea)

T. Bartolomaeus, S. Maslakova, J. von Döhren (eingereicht) Head kidneys in the planuliform larvae of *Procephalothrix filiformis* and *Carinoma mutabilis* (Nemertea). Canadian Journal of Zoology

Während die Protonephridien erwachsener Nemertinen in einer Reihe von ultrastrukturellen Studien untersucht wurden, ist über den Aufbau dieser Organe bei Larven wenig bekannt. Um diese Lücke zu füllen, wurden die larvalen Nierenorgane von zwei Vertretern der „Palaeonemertea“, *Procephalothrix filiformis* und *Carinoma mutabilis*, ultrastrukturell untersucht. Ein Paar Protonephridien kann bereits früh in den Larven beider Arten nachgewiesen werden. Die Larve, von *P. filiformis* weist es in einem Alter von vier Tagen auf; in *C. mutabilis* ist es in der fünf Tage alten Larve bereits funktionsfähig ausgebildet. Bei beiden Arten befindet es sich an der gleichen Position im Körper kurz hinter den Augen *P. filiformis* 30 µm, 20 µm *C. mutabilis*, etwa auf Höhe des Stomodaeums und ist, mit einer Länge von ca. 35 µm in beiden Larven gleich groß.

Ähnlich der larvalen Nierenorgane anderer Spiralia setzt sich das Protonephridium der Larve von *P. filiformis* aus drei Komponenten zusammen, dem Nephroporus, dem Nephroduct und dem Terminalbereich, die teleskopartig hintereinander verschachtelt schräg zur Längsachse der Larve nach innen ziehen (Abb. 3.7.1A). Sie umgeben einen Kanal, der transzellulär vom Terminalbereich nach distal zur Körperoberfläche zieht. Der Nephroporus wird durch eine einzelne Nephroporuszelle repräsentiert, die den Kontakt mit der Außenwelt herstellt, indem sie den ausmündenden Nephroduct mit der Körperoberfläche verbindet. Sein Lumen besitzt in diesem Bereich einen Durchmesser von 1–1,5 µm. Die flaschenförmige Nephroporuszelle ist über Adhaerenzonen mit den sie umgebenden Epidermiszellen verbunden, weist jedoch im Gegensatz zu ihnen keinerlei basales intrazelluläres Aktinfasernetz auf. Im Nephroporusbereich besitzt sie zwei Cilien, die mit einem 9 x 2 + 2 Axonem ausgestattet sind. Jede der Cilien ist mit einer Cilienwurzel und einem Basalfüßchen an ihrem Basalkörper in der Zelle verankert. Die Zelloberfläche weist zahlreiche kleine Mikrovilli auf, die die Oberfläche des Kanallumens in seinem Mündungsbereich vergrößern. Neben dem Zellkern und einigen Mitochondrien enthält die Zelle ein bis zwei Lysosomen, kleine Golgi-Stapel und wenige große Dotter- und Lipidvesikel.

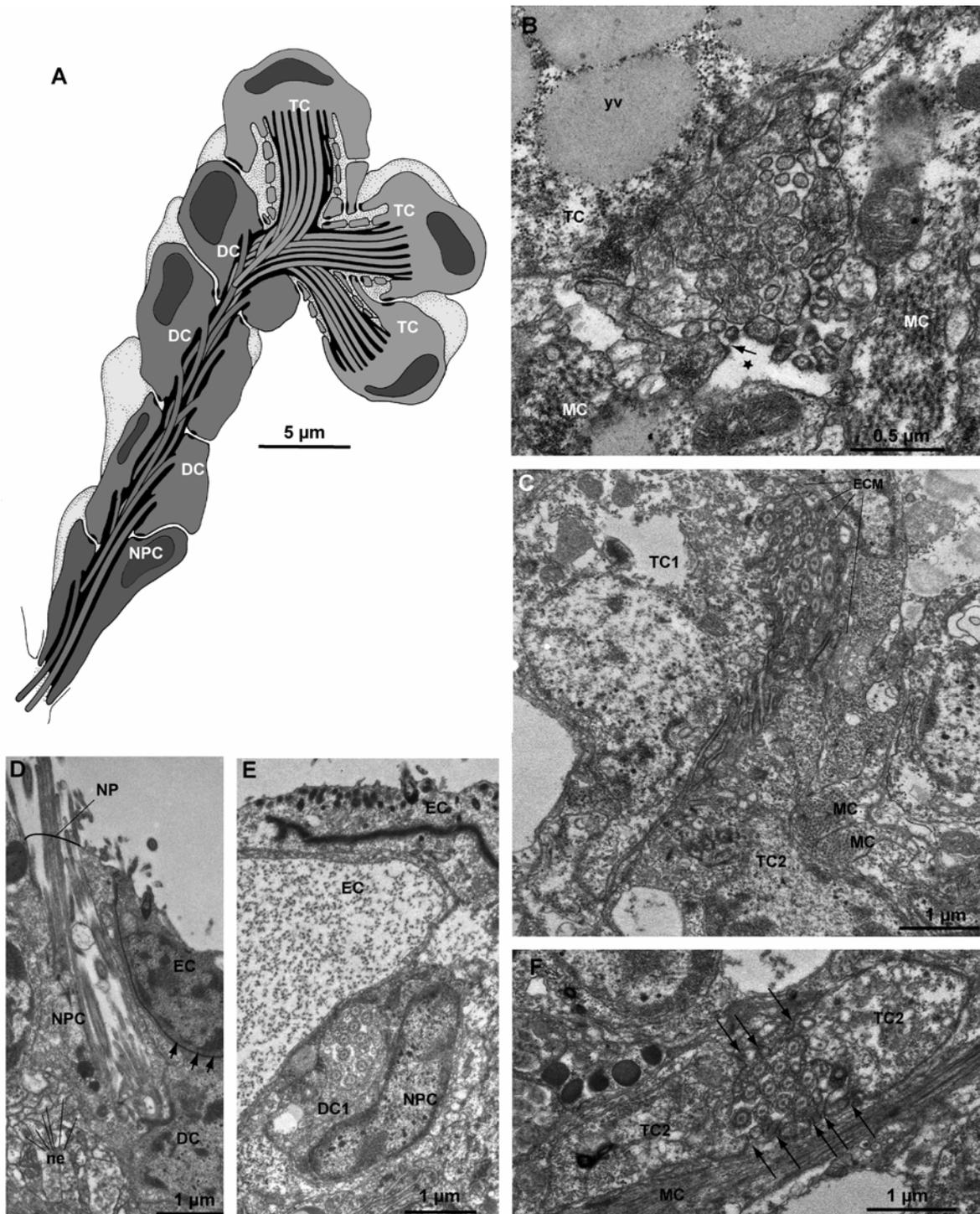


Abbildung 3.7.1: Larvale Protonephridien bei Larven von „Palaonemertinen“. A, B, D. *Procephalothrix filiformis*. B, C, E, F. *Carinoma mutabilis*. A. Rekonstruktion. B - F. Transmissionselektronenmikroskopie. A. Das Protonephridien besteht aus drei unterschiedlichen Zelltypen. B. Terminalzelle. Filterbereich mit Interzellularräumen (*Sternchen*). Pfeil weist auf Diaphragma. C. Zusammengesetzter Filter. D. Nephroporuszelle. Pfeile deuten auf interepidermales Aktinfilament-Netz. E. Nephroporuszelle und Kanalzelle liegen zwischen epidermalen Zellen. F. Zusammengesetzter Filter wird von zwei Terminalzellen gebildet. Pfeile markieren Spalten im Filter. EC – Epidermiszelle, ECM – extrazelluläre Matrix, DC – Kanalzelle, MC – Muskelzelle, ne – Neurit, NP – Nephroporus, NPC – Nephroporuszelle, TC – Terminalzelle.

Nach proximal schließt sich der Nephroporuszelle eine Flucht aus drei Nephroductzellen an, durch die der Kanal zur terminalen Filterstruktur verläuft. Die äußeren zwei Zellen sind mit

vier Cilien ausgestattet, die in ihrer Ultrastruktur denen der Nephroporuszelle entsprechen. Auch ihre Oberfläche ist in zahlreichen Mikrovilli aufgefaltet (Abb. 3.7.1E). Während die distale Nephroductzelle in ihrer Ultrastruktur der Nephroporuszelle ähnelt, weist die mittlere deutlichere Zeichen für erhöhte trans- und endozytotische Aktivität auf. In einem sehr elektronenhellen Cytoplasma befinden sich zahlreiche Lysosomen, multivesikuläre Körper und Stachelsaumvesikel verteilt. Der Zellkern hat eine stark gelappte Form und ist von zahlreichen Mitochondrien umgeben. Die sich anschließende proximale Nephroductzelle weist zwei Cilien auf und bildet nach proximal einen Kragen aus, der den Kontakt mit dem Terminalbereich herstellt. Dieser besteht bei *P. filiformis* aus drei Terminalzellen, die jeweils eine aus mehreren Cilien bestehende Wimperflamme aufweisen. Die Ultrafiltration der interstitiellen Flüssigkeit findet durch eine zusammengesetzte Filterstruktur statt, zu der alle drei Terminalzellen mit lappenartigen, miteinander verzahnten Zellausläufern beitragen. Über die Zwischenräume der Zellausläufer spannen sich Diaphragmata, die die Ultrafiltration vermitteln (Abb. 3.7.1B). Die dem Kanallumen abgewandte Seite weist kleine interzelluläre Spalten um die Terminalzellen auf, die teilweise von Matrix, teilweise von Muskelzellen begrenzt sind. Letztere sind miteinander über apikale Adhaerenzonen verbunden. Ob es sich hierbei um die muskuläre Auskleidung der Anlage des Blutgefäßsystems handelt, kann zu diesem Zeitpunkt nur vermutet werden.

Die larvalen Protonephridien von *C. mutabilis* sehr ähnlich gebaut wie die von *P. filiformis*. Es weist den gleichen teleskopartigen Aufbau von einer distalen Nephroporuszelle, zwei hintereinanderliegenden Nephroductzellen und einem transzellulär durch sie hindurch ziehenden Kanallumen auf (Abb. 3.7.1D). Wie bei *P. filiformis* ist bei *C. mutabilis* die Nephroporuszelle flaschenförmig und trägt zwei Cilien, die ein $9 \times 2 + 2$ Axonem und einen Basalkörper mit Basalfuß und einer Cilienwurzel besitzen. Zum Lumen hin, das in dieser Region 1–1,5 μm weit ist, ist ihre Oberfläche mit zahlreichen Mikrovilli vergrößert. Die Nephroductzellen weisen zwar mit 6-10 Cilien mehr Cilien als *P. filiformis* auf, belegen aber aufgrund ihrer Organell-Ausstattung mit Lysosomen, Residualkörpern und Stachelsaumvesikeln die endozytotische Aktivität dieser Zellen. Wie die Nephroductzellen der anderen untersuchten Art ist auch ihr Zellkern gelappt. Verglichen damit weist der Terminalbereich die größten Unterschiede auf. Er besteht bei *C. mutabilis* nur aus zwei Terminalzellen. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe und in ihrer Ausstattung mit Cilien. In der mit 14,8 μm Länge größeren Zelle inserieren 11 Cilien, in der kleineren, die eine Länge von 13,5 μm aufweist, nur drei. Das Diaphragma spannt sich über einen mäandrierenden Spalt, der von den

sich gegenüberliegenden Terminalzellen durch flächige, ineinander greifende Zellfortsätze gebildet wird (Abb. 3.7.1C). Die Filterstruktur ist also einfacher gebaut als bei *P. filiformis*. Auf der abluminalen Seite der Filterstruktur finden sich anders als bei den Protonephridien von *P. filiformis* keine Spalträume zwischen Muskelzellen (Abb. 3.7.1F). Hier liegt die extrazelluläre Matrix dem Terminalzellen direkt auf.

Larvale Protonephridien, die sich unmittelbar an die Augenregion der Larve anschließen, sind nach derzeitiger Information bei Hoplo- und Heteronemertea nicht vorhanden. Deren ontogenetisch erstes Paar von Protonephridien bildet sich deutlich weiter caudal in einer Region, in der auch die Protonephridien der Adulti liegen. Die hier beschriebenen Nierenorgane sind der Lage nach den Kopfnieren der Trochozoa homolog. Da die beiden untersuchten Arten zu Teilgruppen der Palaeonemertea gehören, die innerhalb der Nemertea basal abzweigen, stellt die Lage der Protonephridien, dem Sparsamkeitsprinzip entsprechend, ein plesiomorphes Merkmal dar, das bei Hetero- und Hoplonemertea verändert wurde. Diese letztgenannte Interpretation deckt sich mit Ergebnissen der molekularen Analyse von Tholleson & Norenburg (2003). Die Entdeckung von larvalen Protonephridien in der Kopfregion spricht für eine enge Verwandtschaft zwischen Nemertea und Trochozoa. Weder Lage noch Ultrastruktur ergeben indes zusätzliche Hinweise auf eine engere Verwandtschaft der Nemertea mit den Phoronida oder Brachiopoda, wie jüngst durch molekulare Daten angezeigt (Dunn et al. 2008). Die Nieren der Phoronida liegen und entstehen caudal; den Brachiopoda fehlen larvale Nieren vollständig.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

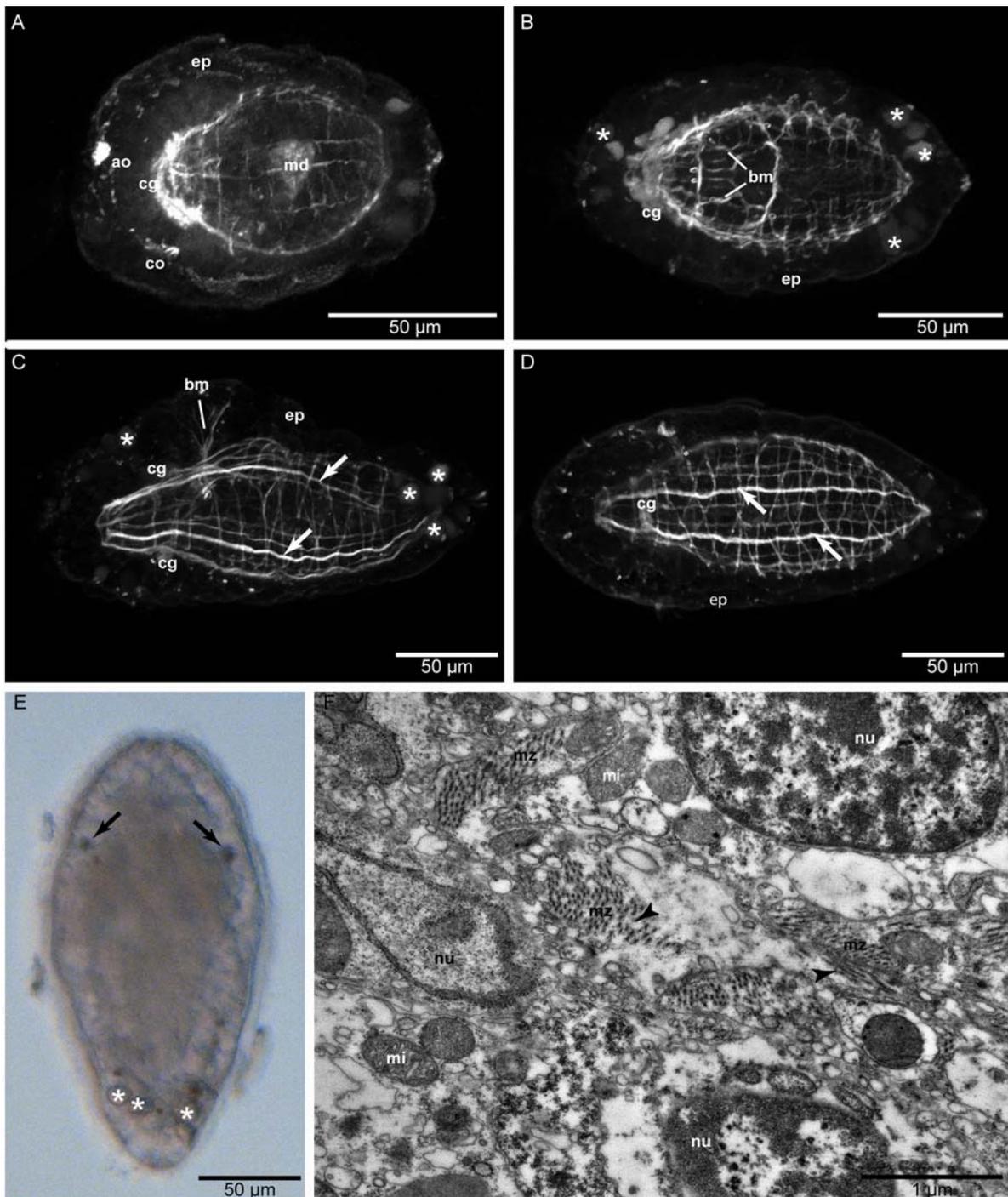
4.1. Entwicklung der Muskulatur

4.1.1 *Procephalothrix oestrymnicus* Junoy & Gibson, 1991 („Palaeonemerta“)

Die Larve von *Procephalothrix oestrymnicus* schlüpft etwa 48 Stunden nach der Befruchtung und ist bereits vollständig bewimpert. Sie ist anfangs kugelförmig, streckt sich aber im Laufe ihrer Entwicklung (Abb. 4.1.1A,B,C,D). Zu dem bereits beim Schlupf der Larve vorhandenen, aus deutlich längeren Cilien bestehenden, apikalen Wimperschopf bilden sich am vierten Tag ein caudaler Wimperschopf sowie zwei laterale Wimperbüschel, die etwa auf der Höhe der Augen lokalisiert sind. Die Larven besitzen zwei pigmentierte Augen, die in der Epidermis liegen (Abb. 4.1.1E).

Die Ausbildung des Anus wurde während der beobachteten Entwicklungszeit nicht beobachtet. Die Myogenese bei *P. oestrymnicus* beginnt zwischen 53 und 76 Stunden nach der Befruchtung. In 53 Stunden alten Larven ist kein Phalloidinsignal nachweisbar. Die 76 Stunden alten Larven beginnen sich zu strecken. Äußerlich sind das Apikalorgan, die Adhaerenzonen der Epidermiszellen und die Basis des caudalen Wimperschopfs erkennbar. In der Larve sind feine Aktinfilamente sichtbar, die sich zwischen der Epidermis und dem Darmepithel befinden. Letzteres ist durch die sich in ihm befindlichen Aktinfasern der Adhaerenzonen markiert. In diesem Stadium sind nicht mehr als 6 dieser Stränge sichtbar. Diese bisher eher diffusen Muskelfasern gehen von einer frontal vor dem Mund gelegenen, fibrilläres Aktin enthaltenden Zone aus, die in etwa auf der Höhe der Anlagen des zentralen Nervensystems liegt, und erstrecken sich über die gesamte Länge des Körpers ohne jedoch an dessen Ende zusammenzulaufen. Es ist in der gesamten Larve also ein umlaufendes Netz ausgebildet, das an seinem caudalen Ende offen ist. Zirkuläre Ringmuskelfasern sind in diesem Stadium ebenfalls zu sehen, sie sind aber insgesamt schwächer markiert als die longitudinal verlaufenden, Aktin enthaltenden Zellen. Diese Ringmuskelstränge befinden sich distal der sich bildenden Längsmuskelstränge unterhalb der Epidermis der Larve. Am deutlichsten sind sie im frontalen Bereich zu erkennen, wo sie ein orthogonales Muskelnetz mit den darunter verlaufenden Längsmuskelfasern bilden. Nach caudal wird das Signal schwächer und die Ringe scheinen auf der Ventralseite nicht vollständig geschlossen zu sein (Abb. 4.1.1A).

Bei 100 Stunden alten Larven ist eine weitere Streckung erkennbar. Die Larven besitzen zwei pigmentierte Augen, die in der Epidermis liegen. Es treten vor allem um den apikalen Wimperschopf und am caudalen Körperpol große Zellen auf, deren Inhalt autofluoresziert, so dass diese auf den Bildern als diffuse, helle Felder erscheinen. An der Position, an der die Längsmuskelstränge frontal zusammenlaufen, hat sich aus dem vorher diffus markierten Bereich der Ring des Cerebralganglions gebildet, der durch seine Aktinfasern enthaltenden Zellen ein fluoreszierendes Signal abgibt, das weniger klar umrissen ist als das der Muskelzellen. Die Muskulatur ist insofern weiter entwickelt, als das Signal aller vorhandenen



Fasern verstärkt ist, die Aktinfaserausstattung der Zellen also erhöht wurde. Nach wie vor sind die ringförmig angeordneten Muskelstränge auf der Ventralseite nur schwach ausgeprägt. Im Bereich der Mundöffnung und des Mundraums der Larve sind einige Muskeln neu entstanden. Posterior der Mundöffnung der Larve ist ein verhältnismäßig starker Ringmuskel erkennbar. Dieser folgt jedoch nicht vollständig dem Verlauf der anderen Ringmuskeln unter der epidermalen extrazellulären Matrix, sondern gabelt sich auf beiden Körperseiten nach lateral in je zwei distale und einen proximalen Ast auf. Während die vier distalen Äste dem Verlauf des Körpers folgen, ziehen die proximalen Äste auf der Innenseite des Mundraums entlang, um sich in der hinteren Vorderdarmwand zu treffen. In ihrem Verlauf gehen jeweils drei weitere Muskelstränge ab, die alle entlang der Mundhöhle zu verlaufen scheinen und nach distad mit der Körperwandmuskulatur zusammentreffen.

Das am weitesten ventral gelegene Paar Muskelstränge verläuft in seiner Orientierung parallel zum Ringmuskel, während die dorsal davon verlaufenden Paare in einem rechten Winkel nach anterior ziehen. Dadurch entsteht ein Muskelfächer aus 6 Muskelsträngen, die vermutlich der Weitung der Mundöffnung und des dahinter liegenden Mundraums dienen. Ein weiterer Muskelstrang erstreckt sich anterior der Mundöffnung. Es handelt sich hierbei um einen Ringmuskel, dessen Verlauf um den gesamten Körper jedoch nicht zu verfolgen war. Im caudalen Teil der Larve, hinter der Mundöffnung, ist zu erkennen, dass die zirkulären Muskelanlagen nicht rechtwinklig, sondern in einem Winkel von etwa 60-70°, die Längsfasern passieren. Im weiteren Verlauf der Muskelentwicklung wird vor allem die Körperwandmuskulatur verstärkt (Abb. 4.1.1B).

Bei 125 Stunden alten Larven werden dabei im Zuge der weiteren Streckung der Larve nicht nur am caudalen Körperpol weitere Muskelstränge addiert, sondern auch die vorhandenen

← **Abbildung 4.1.1: Myogenese von *Procephalothrix oestymnicus* („Palaeonemertea“).** A-D. Projektionen Phalloidin/Alexa 568 markierter Larven; frontaler Körperpol nach links orientiert. E. Lichtmikroskopie, frontaler Körperpol nach oben. F. Transmissionselektronenmikroskopie. A. 76 Stunden alt, von dorsal. Beginnende Myogenese, die ersten Längsmuskelstränge sind ausgebildet, frontal sind erste Aktinfilamente der Ringmuskulatur unterhalb des Cerebralganglions markiert (Apikalorgan, Cerebralganglion, Darmepithel und Epidermis sind wegen der in den Zellen enthaltenen Aktinfilamente ebenso markiert). B. 100 Stunden alt, von ventral. Neben der Längsmuskulatur sind auch Ringmuskeln über die gesamte Körperlänge sichtbar. Der Mundbereich weist eigene Muskelstränge auf. Frontal und caudal sind diffus leuchtende autofluoreszente Zellen erkennbar (*Sternchen*). C. 172 Stunden alt, von lateral, Mund oben. Neben vier prominenten Muskelsträngen (*Pfeile*) hat sich auch die Ringmuskulatur weiter differenziert. Erste schräg verlaufende Fasern sind sichtbar. Die Muskulatur des Mundes zieht in den Mundhügel. D. 220 Stunden alt, von dorsal. Die dorsal verlaufenden Hauptmuskelstränge sind immer noch am deutlichsten markiert. Es haben sich weitere schrägverlaufende Ringmuskelstränge differenziert. E. 172h dorsal. Die Augen der Larve sind erkennbar, am Hinterende sind deutlich lichtbrechende Zellen zu sehen, die im cLSM autofluoreszieren (*Sternchen*). F. 132 Stunden alt. Innerhalb einer Muskelzelle treten unterschiedliche Aktinfaserverläufe auf (*Pfeilspitzen*). *ao* – Apikalorgan, *bm* – Buccalmuskulatur, *cg* – Cerebralganglion, *co* – Cerebrorgananlagen, *ep* – Epidermis, *md* – Mitteldarm, *mi* – Mitochondrium, *mz* – Muskelzelle, *nu* – Zellkern.

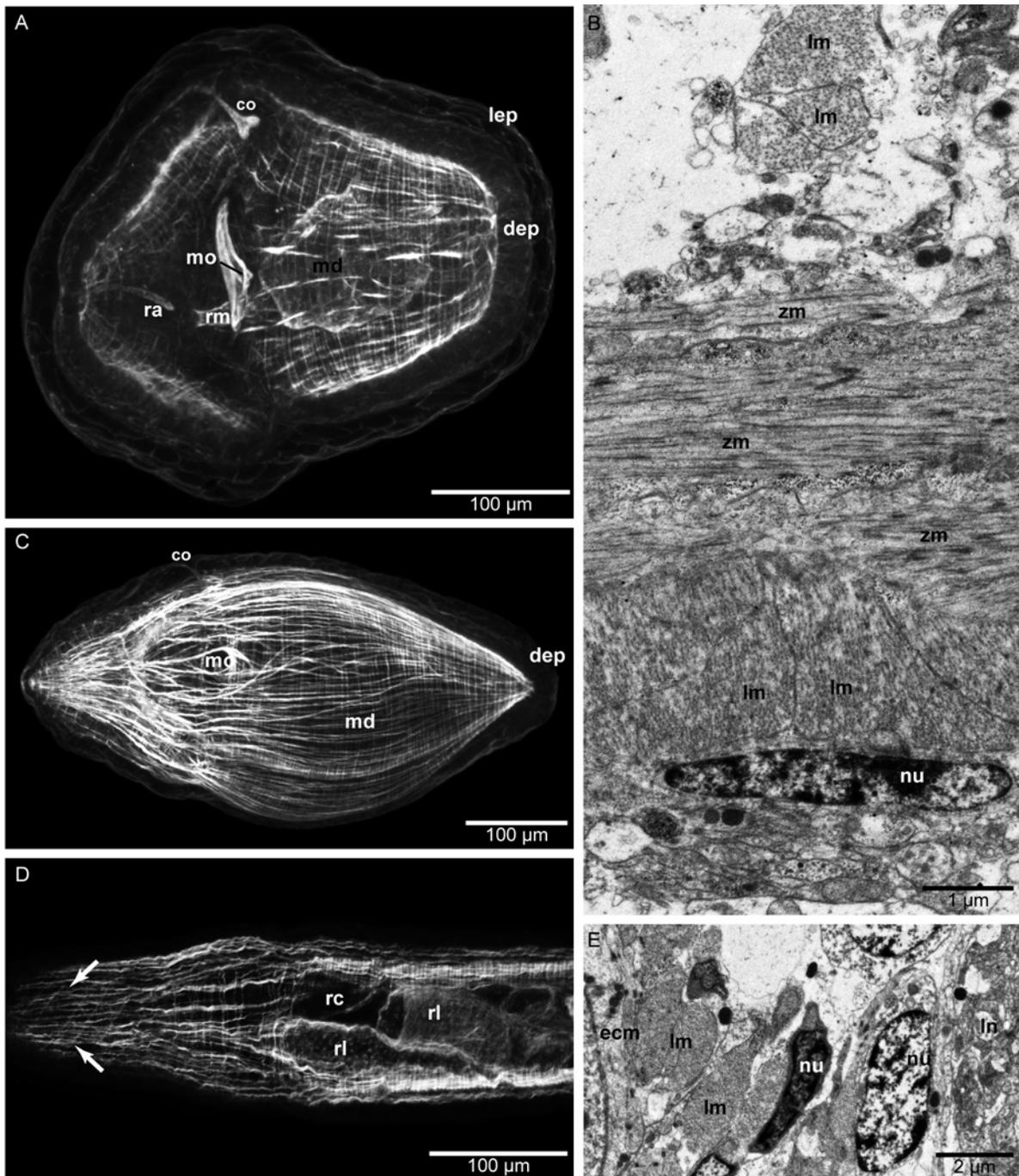
treten deutlicher hervor. Das führt dazu, dass die Neigung der zirkulär verlaufenden, postoralen Muskulatur jetzt genauer zu beobachten ist. Die ringförmigen Fasern verlaufen in einem 25° Winkel geneigt zueinander und kreuzen sich auf den Lateralseiten des Körpers. Die ultrastrukturelle Analyse dieser Muskelzellen zeigt, dass die Aktinfasern in derselben Muskelzelle in beiden Richtungen verlaufen. Im Verbund der längs verlaufenden Muskelstränge fallen vier besonders durch ihr deutliches Signal auf. Zwei verlaufen über die gesamte Körperlänge dorso-lateral, die anderen beiden ventro-lateral, beidseitig der Mundöffnung. Die dazwischen liegenden Längsmuskelstränge sind weniger stark ausgebildet. Am apikalen Körperpol ist erkennbar, dass die vier besonders deutlich markierten Längsmuskelstränge einander gegenüberliegen, ohne jedoch zu konvergieren. Im erwachsenen Tier liegt in dieser Position der Rhynchoporus. Da offensichtlich die Muskelfasern auch nach frontal ausgewachsen sind, liegt Das ringförmige Cerebralganglion nun nicht mehr apikal des Muskulatur, sondern ist leicht nach posterior verschoben, dabei umfasst es das Hautmuskelnetz von außen. Um die Mundöffnung herum bildet sich ein Mundhügel aus, in den feine Muskeln ziehen, die sich im Zuge des Wachstums des Mundhügels noch verstärken (Abb. 4.1.1C).

In älteren Stadien ist zu beobachten, dass die vorhandenen Muskeln deutlicher werden, aber abgesehen von weiteren schräg zirkulär verlaufenden Fasern, bilden sich keine weiteren Muskelsysteme aus. Im ältesten untersuchten Stadium, das 220 Stunden alt ist, bietet sich also folgendes Bild: Die Larve besitzt ein Muskelgitter aus proximal gelegenen Längsmuskelsträngen, die den larvalen Körper über dessen volle Länge durchziehen und von denen vier besonders dominant sind. Distal dazu liegt ein System aus ringförmig verlaufenden Fasern, die im präoralen Abschnitt rechtwinklig zu den Längsfasern verlaufen, im postoralen Teil der Larve jedoch in zwei Richtungen geneigt sind und damit ein System aus diagonal verlaufenden Ringen bilden, die einander und die longitudinalen Fasern in einem spitzen Winkel kreuzen. Mit diesem Muskelanteil scheint die Buccalmuskulatur assoziiert zu sein, die mit einigen Ausläufern bis in den Mundhügel zieht (Abb. 4.1.1D). Weitere Muskulatur ist zu diesem Zeitpunkt in der Larve nicht ausgebildet. Ob das beschriebene Muskelarrangement beim Übergang zum Bodenleben weiter modifiziert wird und welche Muskelemente in die Adultorganisation übernommen werden, konnte nicht beobachtet werden.

4.1.2 *Lineus viridis* (Müller, 1774) (Heteronemertea)

Wie bereits beschrieben durchläuft *Lineus viridis* in seiner Entwicklung ein intrakapsuläres Larvenstadium, das als Desorlarve bezeichnet wird (vgl. Döhren im „review“-Verfahren, siehe Anhang, Manuskript 3). Diese Larvenform ist aufgrund der als katastrophal bezeichneten Metamorphose sowie vorgeordneter phylogenetischer Überlegungen mit höchster Wahrscheinlichkeit dem pelagischen Pilidium anderer Heteronemertea homolog. Aufgrund der Entwicklung innerhalb einer Eigallerte weist sie jedoch einige Modifikationen auf. Im Gegensatz zur Pilidiumlarve fehlen der Desorlarve die anterior, posterior und lateral des Mundes gelegenen Loben, die sich darauf befindende, differentielle Ciliatur und der apikale Wimperschopf. Äußerlich hat sie eine annähernd kugelförmige Gestalt, die sich im Verlauf des Wachstums des sich im Inneren differenzierenden Jungtiers fronto-caudal streckt. Auf der ventralen Seite befindet sich der larvale Mund, der entgegen anders lautender Beschreibungen (Nusbaum & Oxner, 1913) mit dem Darm in Verbindung steht. Die Entwicklung von *L. viridis* einschließlich der Metamorphose wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (Nusbaum & Oxner 1913; Schmidt 1964; Döhren im „review“-Verfahren, siehe Anhang, Manuskript 3), daher soll hier nur detailliert auf die Myogenese eingegangen werden. Da die Entwicklung von *L. viridis* selbst innerhalb eines Geleges asynchron ist, bezeichnen die jeweiligen Angaben immer den Zeitpunkt, an dem der überwiegende Teil der Tiere das entsprechende Entwicklungsstadium erreicht hat. Im Gegensatz zum Pilidium wird in der larvalen Hülle der Desorlarve keine Muskulatur ausgebildet. Die folgende Beschreibung bezieht sich daher auf die Muskulatur des sich innerhalb der larvalen Hülle entwickelnden Juvenilorganismus. Die Myogenese beginnt erst, nachdem die Imaginalscheiben, aus denen sich die ektodermalen Organe entwickeln, vollständig verschmolzen sind, das Jungtier also nur noch über den larvalen Mund mit seiner Desorhülle verbunden ist. Dieser Vorgang ist bis zum 12. Tag nach der Eiablage vollendet, so dass sich in diesem Stadium die ersten Aktinfasern der Körperwandmuskulatur nachweisen lassen. Davor sind lediglich Aktinfaserelemente der Adhaerenzonen in der Epidermis der Larve und die epithelial organisierten Imaginalscheiben sichtbar. Als erstes sind unterhalb der dorsalen juvenilen Epidermis längs verlaufende Aktinfasern sichtbar, die bald von ersten zirkulär verlaufenden Fasern distad überlagert werden. Sie verlaufen parallel zueinander und umgreifen zu diesem Zeitpunkt den Darm, ohne jedoch auf der oralen Seite in Verbindung zu stehen. Es ist hierbei herauszustellen, dass die Muskulatur im postoralen Teil des Jungtieres deutlich stärker ausgeprägt ist.

Die Anlagen der Cerebralorgane und des Rüssels sind erkennbar, an Einfaltungen der juvenilen Epidermis, die durch den Aktinfilamentgürtel dieses Epithels vermittelt werden. Am posterioren Ende der Rüsselanlage bildet sich der Rüsselretraktormuskel, der weiter nach caudal in die Längsmuskulatur des Hautmuskelschlauchs übergeht (Abb. 4.1.2A). Im Zuge der weiteren Ontogenese bilden sich auch auf der Oralseite Längsmuskeln aus und die Ringmuskelfasern werden durchgängig. So zeigt sich am 15. Entwicklungstag eine Larve, in deren Inneren sich ein Jungtier befindet, das einen vollständig ausgebildeten, 2-schichtigen Hautmuskelschlauch aufweist. Dieser besteht aus äußeren, zirkulär verlaufenden und inneren,



longitudinal verlaufenden Muskelsträngen. Im präoralen Abschnitt des Körpers divergieren die Längsmuskeln von der späteren Rüsselinsertion aus fächerförmig entlang des Rostrums bis auf die Höhe des Mundraums. Es handelt sich jedoch hierbei nicht um eine echte diagonal verlaufende Muskulatur, da die Muskelstränge durch eine Verbreiterung des Kopfes nach posterior in diesen Verlauf gezwungen werden. Der Rüssel selbst ist noch nicht erkennbar mit Muskulatur ausgestattet und vom Rhynchocoel fehlt zu diesem Zeitpunkt auch noch jede Spur.

Die Aktin enthaltenden Bestandteile des zentralen Nervensystems bedingen, dass das Cerebralganglion eine diffuse Markierung aufweist. Es befindet sich innerhalb des Hautmuskelnetzes und umgreift dabei die Rüsselanlage. Zwischen dem 15. und dem 16. Tag nach der Eiablage vollzieht sich die Metamorphose, bei der das Jungtier seine larvale Hülle frisst und in der Eikapsel herumzukriechen beginnt (Döhren im „review“-Verfahren, siehe Anhang, Manuskript 3; vgl. auch: Gontcharoff 1951, 1960; Schmidt 1964; Nusbaum & Oxner 1913). Dabei verändert sich der Umriss des Körpers, dessen breiteste Stelle nun nicht mehr die Region der Mundöffnung, sondern der mittlere Körperabschnitt ist, der den vollen Darm enthält (Abb. 4.1.2C). Die Muskelschichten der Körperwand sind weiter verstärkt. Ab diesem Zeitpunkt ist in der Körperwand des Jungtieres eine weitere Schicht mit longitudinalem Faserverlauf zu beobachten. Diese befindet sich distal der zirkulär verlaufenden Muskelschicht und erstreckt sich über die gesamte Körperlänge (Abb. 4.1.2B). Aufgrund des Wachstums der präoralen Rostralregion scheint der Mund weiter nach caudal verschoben. In diesem Stadium ist er geschlossen; um ihn herum und im sich anschließenden Darmabschnitt ist keine Muskulatur erkennbar. Auch der Rüssel hat sich verlängert, weist jedoch noch keine markierbare Muskulatur auf.

← **Abbildung 4.1.2: Myogenese von *Lineus viridis* (Heteronemertea).** **A, C, D.** Projektionen Phalloidin/Alexa 568 markierter Entwicklungsstadien; frontaler Körperpol links. **B, E** Transmissionselektronenmikroskopie. **A.** 12 Tage alt, von dorsal, untere 70 µm nicht in Projektion aufgenommen. Die Längsmuskulatur ist insbesondere im postoralen Körperabschnitt entwickelt, die Ringfasern ziehen bis an den caudalen Pol. Der Retraktormuskel des Rüssels beginnt sich auszubilden. Cerebrorgan-Anlagen (linksseitig nicht in Projektion enthalten, s.o.), Rüsselanlage, larvaler Darm und Mundöffnung enthalten Aktinfilamente und sind daher markiert. **B.** Postmetamorphes Jungtier, Querschnitt, distal oben. Die innere Muskulatur ist als Schicht ausgebildet, die äußere Längsmuskulatur liegt noch in einzelnen voneinander separierten Strängen vor. **C.** Jungtier kurz nach Metamorphose 15-16 Tage alt, von schräg ventral. Ein deutlicher Hautmuskelschlauch aus Längs- und Ringmuskelfasern ist ausgebildet. Die Aktinfasern der definitiven Epidermiszellen sind schwach markiert. **D.** Älteres Jungtier, bereits aus Eigallerte gewandert, Projektion von 8 µm im dorsalen Körperabschnitt. Neben dem Rüssel sind auch deutlich die Muskelschichten des Hautmuskelschlauches markiert. Er besteht aus äußerer Längs-, mittlerer Ring- und innerer Längsmuskulatur. Im frontalen Bereich sind feine diagonal verlaufende Muskelstränge erkennbar (Pfeil). **E.** Älteres Jungtier (wie **D**), Querschnitt, distal links. Die lateralen Hauptnervenstränge verlaufen unterhalb der äußeren Längsmuskelschicht, die ihrerseits noch proximal der basalen extrazellulären Matrix der Epidermis verläuft. *co* – Cerebrorgananlage, *dep* – definitive Epidermis, *ecm* – extrazelluläre Matrix, *lep* – larvale Epidermis, *lm* – Längsmuskelzelle, *ln* – lateraler Nervenstrang, *md* – Mitteldarm, *mo* – Mundöffnung, *nu* – Zellkern, *ra* – Rüsselanlage, *rc* – Rhynchocoel, *rl* – Rüssel, *rm* – Retraktormuskel, *zm* – zirkuläre Muskelzelle.

Die weitere Ontogenese des Jungtiers zeichnet sich durch eine fronto-caudale Streckung aus, die sich sowohl im präoralen wie auch im postoralen Körperabschnitt vollzieht. Nach der Metamorphose beginnen die Jungtiere im Eikölbchen herumzukriechen und verlassen es wenig später. Um den 18. Tag nach der Befruchtung befindet sich der Großteil der Jungtiere nicht mehr in den Eikölbchen, sondern in der umgebenden Gallerte. Einige wenige haben auch diese schon verlassen. Zu diesem Zeitpunkt ist im vorderen Bereich die muskuläre Verankerung des Rüssels deutlich stärker ausgebildet und auch um den hinteren Teil des Rüssels sind Aktinfasern nachzuweisen. Das gesamte Organ hat sich auf etwa die halbe Körperlänge verlängert. Nach 21 Tagen haben fast alle Tiere die Gallerte verlassen. Die Entwicklung der Muskulatur ist jedoch noch nicht abgeschlossen. Etwa eine weitere Woche nach dem Verlassen der Eigallerte ist der Rüssel funktionsfähig. Es ist dessen Ringmuskulatur nachweisbar sowie der Retraktormuskel. Im Rhynchocoel sind zwei Muskelschichten zu erkennen, die innere Längsmuskulatur und die distal dazu liegenden zirkulären Muskelfasern. Vor allem in der präoralen Region der Körperwand können distad auf der äußeren Längsmuskelschicht diagonal verlaufende Muskelfasern nachgewiesen werden (Abb. 4.1.2D). Diese sind nach posterior immer schwächer ausgeprägt, es ist aber erkennbar, dass sie in beiden Richtungen schräg verlaufen und sich auf der Mittellinie des Körpers kreuzen. Zu den darunterliegenden Längsfasern sind sie in einem Winkel von etwa 60° orientiert. Die weitere Entwicklung der vorhandenen Muskelschichten sowie die Entstehung neuer Muskelemente wurde nicht weiter verfolgt. Die ultrastrukturelle Untersuchung der Körperwandmuskulatur zeigt, dass sich die lateralen Neuropile an der für Heteronemertea charakteristischen Position unterhalb der äußeren Längsmuskeln befinden (Abb. 4.1.2D)

4.1.3 *Paranemertes peregrina* Coe, 1901 (Hoploneurtea)

Eine kurze Beschreibung der Myogenese der Larve von *Paranemertes peregrina* findet sich in Maslakova & Döhren (angenommen zur Veröffentlichung, siehe Anhang, Manuskript 6). An dieser Stelle soll im Einzelnen auf die Abfolge der Bildung der Muskelschichten sowie auf ihre Orientierung zueinander eingegangen werden. Erste Zellen, die Aktinfilamente enthalten und daher als prospektive Muskelzellen ansprechbar sind, sind in der Larve am 4. Tag nach der Befruchtung zu sehen. Sie liegen zwischen der Epidermis und dem Epithel des Blastocoels, welches später zum Darm wird. Die Orientierung der Aktinfilamente scheint in diesen Zellen vorwiegend parallel zur anterioposterioren Körperachse zu verlaufen. Durch

diese Zone treten die Anlagen der Cerebralorgane als laterale etwas nach caudal ziehende Einfaltungen der Epidermis hindurch. Zusätzlich ist die Anlage des Cerebralganglions zu erkennen, das sich anterior des Darms, proximal der prospektiven Körperwandmuskelschichten befindet (Abb. 4.1.3A).

Am 5. Entwicklungstag sind bereits diskrete Muskelstränge auszumachen. Es handelt sich hierbei um ein durchgehendes Hautmuskelnetz, das aus längs verlaufenden Muskelfasern besteht. An seinen anterioren und posterioren Enden konvergieren die Fasern nicht, so dass es hier offen bleibt. Äußerlich liegen der Längsmuskelschicht zirkulär verlaufende Fasern auf, die parallel zueinander über die gesamte Länge der Längsfasern laufen und so ein orthogonales Muskelnetz bilden. Es ist zu beobachten, dass im anterioren Bereich mehr Aktinfasern ausgebildet sind als weiter nach posterior, was den Schluß nahe legt, dass hier die Bildung der Ringmuskelfasern ihren Ausgang nimmt. Ein dorso-ventraler Gradient der Stärke des Signals ist nicht zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Myogenese der zirkulären Fasern auf allen Körperseiten gleichzeitig beginnt. Der larvale Vorderdarm tritt aufgrund seines geringen Durchmessers durch die Muskelschichten hindurch, ohne sie in ihrer Ausprägung zu beeinflussen (Abb. 4.1.3B). Proximal entlang der sich verlängernden Lateralnervenstränge zieht je ein Muskel, der weiter vorne durch den Ring des Cerebralganglions tritt und sich an seinen beiden terminalen Enden mit dem Hautmuskelschlauch vereint (Abb. 4.1.3D, dokumentiert für älteres Stadium, Pfeile).

Die weitere Entwicklung ist durch eine Streckung der Larve gekennzeichnet, mit der eine Verlängerung der longitudinalen sowie eine caudale Addition von zirkulär verlaufenden Strängen einhergeht. Im 8 Tage alten Entwicklungsstadium durchbricht der larvale Vorderdarm das nun engmaschiger gewordene Muskelnetz, das im postoralen Bereich zwischen innerer Längs- und äußerer Ringmuskulatur über Kreuz verlaufende, diagonale Aktinfasern enthaltende Elemente aufweist (Abb. 4.1.3C). Im anterioren Bereich des Hautmuskelschlauchs, vor dem cerebralen Nervenring, treten proximal auf jeder Seite je zwei Muskeln aus dem Verbund aus und verlaufen etwas tiefer in dorso-ventraler Richtung. Auch zwei bis drei Längsstränge verlaufen in diesem Körperabschnitt tiefer als die Hauptmuskelschichten, treten aber auf der Höhe des Cerebralganglions wieder in den Hautmuskelschlauch ein. Die Funktion dieser Muskeln konnte nicht geklärt werden; vermutlich repräsentieren sie Komponenten der späteren Rostralmuskulatur. Den Rüssel umgebend sind deutlich dessen äußere Ring- und innere Längsmuskelschicht sowie die Anlage des Retraktormuskels zu erkennen. Letzterer ist mit der Längsmuskelschicht des Hautmuskelschlauchs verbunden (Abb. 4.1.3D). Am apikalen Körperpol der Larve sind die

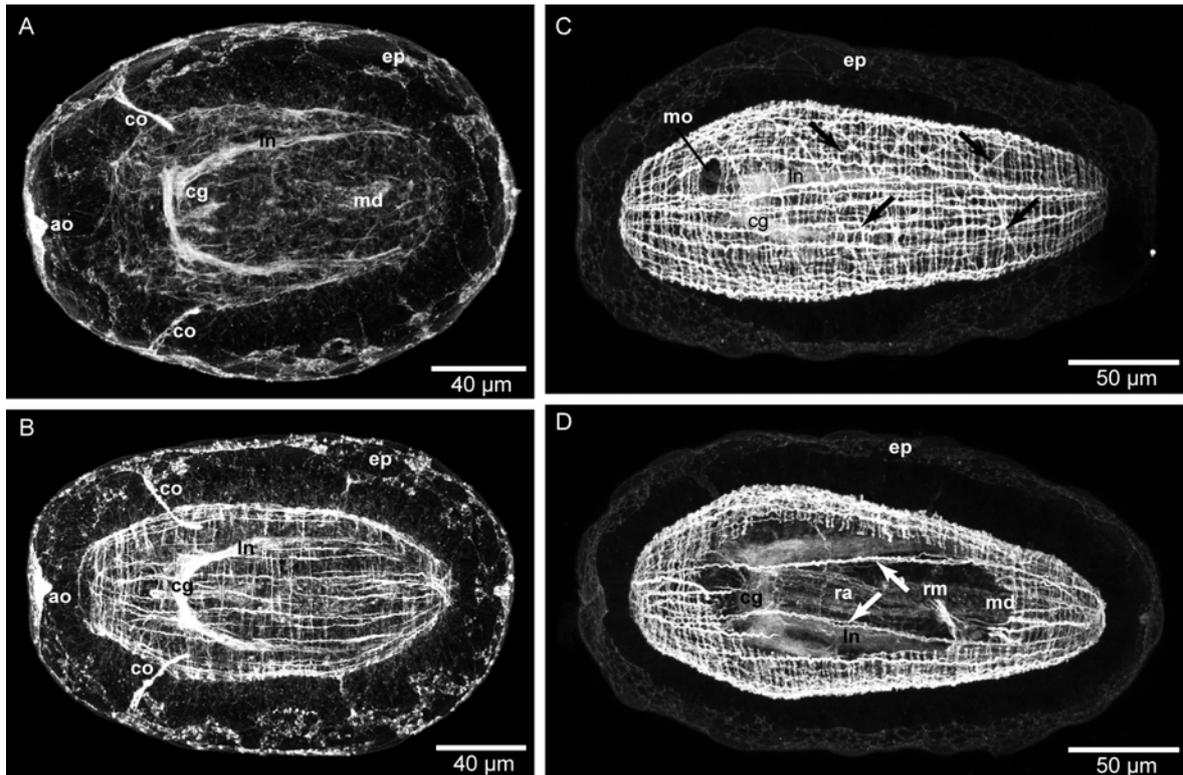


Abbildung 4.1.3: Myogenese von *Paranemertes peregrina* (Hoploneurtea). A-D. Projektionen Phalloidin/Alexa 568 markierter Larven; frontaler Körperpol nach links. A. 4 Tage alte, von dorsal. Aktinfasern sind im Bereich des späteren Hautmuskelschlauches markiert. Organe, deren Zellen Aktinfilamente enthalten sind sichtbar. B. 5 Tage alt, von dorsal. Ein deutliches Muskelnetz aus Längs- und Ringfasern ist differenziert. C. 8 Tage alt, 40 µm der ventralen Körperoberfläche projiziert. Die Muskelstränge werden vom Mund passiert. Die ersten diagonal verlaufenden Muskelstränge sind sichtbar (*schwarze Pfeile*). D. 8 Tage alt, Teilprojektion von 50 µm. Einige Muskelstränge verlaufen unterhalb der Ebene des Hautmuskelnetzes, insbesondere je ein Muskelstrang entlang der lateralen Hauptnervenstränge (*weiße Pfeile*) sind schon in 5 Tage alten Larven vorhanden). Rüsselanlage und Retraktormuskel des Rüssels beginnen sich zu differenzieren. ao – Apikalorgan, co – Cerebralorgananlage, cg – Cerebralganglion, ep – Epidermis, ln – laterale Nervenstränge, md – Mitteldarm, mo – Mundöffnung, ra – Rüsselanlage, rm – Retraktormuskel.

Insertionsmuskeln des Rüssels entwickelt. Bis zum Übergang zum Bodenleben streckt sich der Körper weiter, wobei der Hautmuskelschlauch auf die oben beschriebene Weise wächst. Die Entwicklung bis zum Adulttier wurde nicht verfolgt (vgl. Maslakova & Döhren, angenommen zur Veröffentlichung, siehe Anhang, Manuskript 6).

4.1.4 *Carinoma mutabilis* Griffin, 1898 („Palaeonemerte“)

Die larvale Muskulatur wurde für *Carinoma tremaphoros* Thompson, 1900 dokumentiert (Maslakova et al. 2004), ohne dass jedoch genauer auf die frühe Myogenese eingegangen worden ist. Da diese Art im warmen Wasser der Subtropen beheimatet ist, läuft ihre Entwicklung sehr schnell ab. *C. mutabilis* kommt vor der Pazifikküste des Nordens der Vereinigten Staaten von Amerika vor und entwickelt sich im dortigen kälteren Wasser

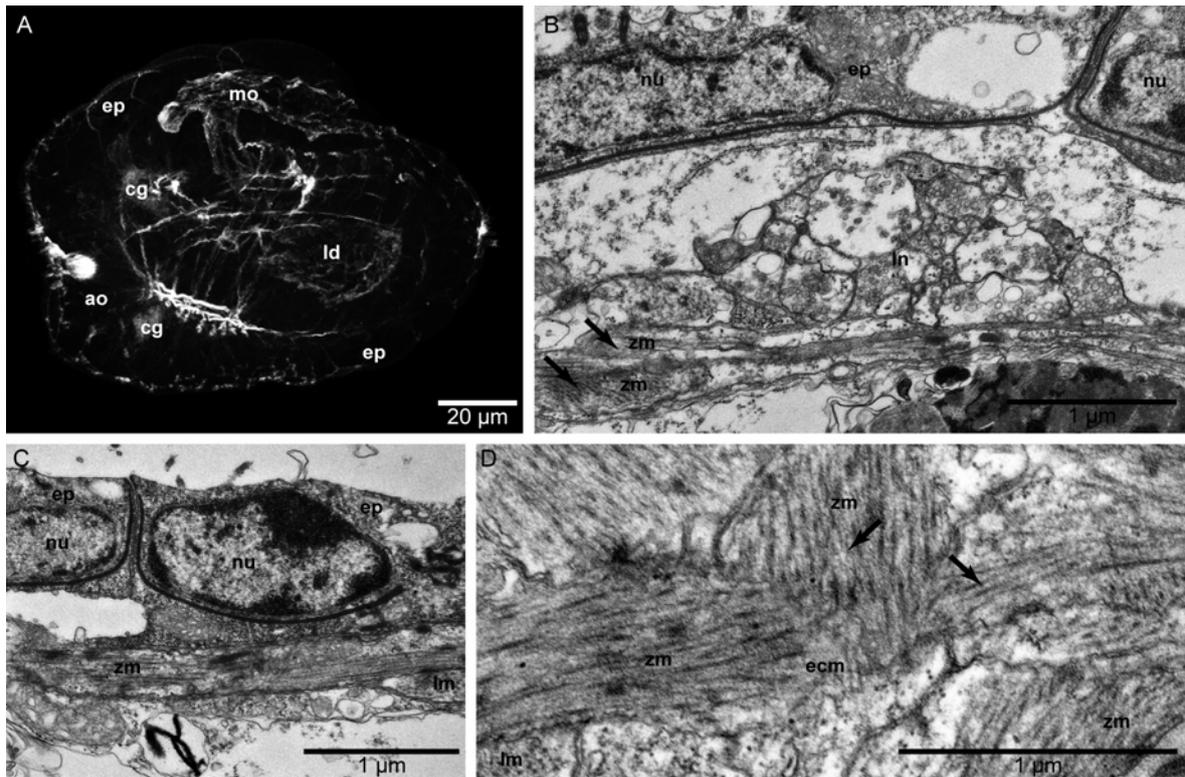


Abbildung 4.1.4: Myogenese von *Carinoma mutabilis* („Palaeonemertea“). **A.** Projektionen Phalloidin/Alexa 568 markierter Larven; frontaler Körperpol nach links. **B-D.** Transmissionselektronenmikroskopie. 7 Wochen alt, ungefüttert. **A.** 5 Tage alt; Lateralansicht, Mundöffnung nach oben. Die Längsmuskelstränge gehen der Bildung der zirkulären Muskulatur voraus. Diese zieht schräg von dorsal um den Körper nach ventral. Organanlagen, die Aktinfilamente enthalten, sind sichtbar. **B.** Die Hauptnervenstränge liegen distal der Ringmuskulatur, die sich anterior bereits in zwei schräg gegeneinander laufende Richtungen differenziert (*Pfeile*). **C.** Im hinteren Körperabschnitt verlaufen Ringmuskelzellen nur in einer Richtung. **D.** Faserverläufe in zwei unterschiedliche Richtungen sind in derselben Zelle zu beobachten. *ao* – Apikalorgan, *cg* – Cerebralganglion, *ecm* – extrazelluläre Matrix, *ep* – Epidermis, *lm* – Längsmuskelzelle, *ln* – lateraler Nervenstrang, *md* – Mitteldarm, *mo* – Mundöffnung, *nu* – Zellkern, *zm* – Ringmuskelzelle.

langsamer. Es zeigt sich, dass die Entwicklung offensichtlich sehr ähnlich zu der von *C. tremaphoros* abläuft, aber wegen der zeitlichen Streckung besser in ihren Anfängen zu beobachten ist.

Während bei *C. tremaphoros* das larvale Hautmuskeltgitter bereits nach 30 Stunden ausgebildet ist, zeigen sich bei *C. mutabilis* Stadien der Myogenese erst bei einem Alter von ca. 120 Stunden. In diesem Stadium sind etwa 12 längs verlaufende Muskelfasern zu erkennen; die vier dorsalen sind deutlich stärker ausgeprägt die übrigen acht, welche sich in zwei Gruppen zu je vier ventro-lateral beidseitig der Mundöffnung befinden. Von diesen distad gelegen existieren außerdem zirkulär verlaufende Muskelstränge, die dorsal auf der Höhe des Mundes liegen und nach ventro-caudal um den Körper laufen, so dass sie auf der Oralseite posterior des Mundes verlaufen. In diesem Stadium sind die ringförmigen Muskelfasern noch nicht durchgängig mit markierbaren Aktinfasern versehen, sondern weisen auf der Ventralseite Lücken auf (Abb. 4.1.4A).

Posterior dieser Fasern sind schwächerer Signale zu erkennen, die parallel zu den beschriebenen, diagonal verlaufenden Ringfasern liegen, jedoch weniger weit von dorsal nach ventral reichen. Die weitere Entwicklung des Muskelsystems wurde nicht mehr mit Hilfe von Phalloidinmarkierung der Aktinfasern untersucht. Die transmissionselektronenmikroskopischen Befunde an circa 8 Wochen alten, ungefütterten Larven zeigen apikal in der Larve Muskelzellen, bei denen der Faserverlauf der Aktinfasern in derselben Zelle in zwei Richtungen orientiert ist (Abb. 4.1.4D). Es kann gezeigt werden, dass das Muskelnetz im posterioren Teil der Larve aus Muskelfasern mit nur einer Orientierung pro Muskelzelle besteht, nämlich innen liegenden längs verlaufenden und außen liegenden zirkulär verlaufenden Muskelzellen (Abb. 4.1.4C). Das larvale Nervensystem ist außerhalb der Muskulatur lokalisiert (Abb. 4.1.4B).

4.1.5 Bewertung der Befunde

Es zeigt sich, dass eine ultrastrukturelle Untersuchung ergänzend zur Phalloidinmarkierung unabdingbar ist, da bei einer Markierung nur einzelne Fasern sichtbar gemacht werden. Es ist nur mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen sicherzustellen, ob es sich bei der Muskulatur um eine geschlossene Schicht oder um ein Gitter aus einzelnen Zellen handelt.

Obwohl in Einzelheiten sehr verschieden, können generelle Merkmale der Myogenese bei den untersuchten Arten festgestellt werden. Bei allen Arten werden primär nur zwei Hauptmuskelschichten in der Körperwand gebildet, die innere Längs- und die äußere Ringmuskulatur. Dabei geht die Ausbildung von längs verlaufenden Muskelsträngen der von zirkulär orientierten voraus. Im Allgemeinen ist ein Gradient in der Entwicklung der Muskulatur von vorne nach hinten erkennbar. Während die Bildung der Muskulatur bei den Vertretern der „Palaeo-“ und Heteronemertea dorsal auf der Höhe des Mundes beginnt und sich nach ventral und caudal fortsetzt, ist eine ventro-dorsale Polarität der Myogenese von *P. peregrina* (Hoploneurertea) nicht erkennbar.

Der Gradient, der von frontal nach caudal besteht, lässt sich aber auch bei dieser Art beobachten. Die Anzahl der initial gebildeten Muskelschichten ist in den untersuchten Arten sehr unterschiedlich, daher ist es nicht möglich, eine fundierte Aussage über die Reihenfolge der Bildung individueller Muskelstränge abzugeben. Im präoralen Abschnitt des Körpers ist die Anordnung der Faserverläufe der beiden Muskelemente bei allen untersuchten Arten orthogonal. Im postoralen Abschnitt von *L. viridis* und *P. peregrina* bleibt dieses orthogonale

Muster erhalten, während die Vertreter der „Palaeonemerteae“ primär von dorso-frontal nach ventro-caudal verlaufende Muskelringe zeigen. Die Entstehung einer äußeren Ringmuskulatur distal der zirkulären ist auf *L. viridis* beschränkt. Sie stellt ein seit langem in der traditionellen Klassifikation verwendetes, diagnostisches Merkmal für die Heteronemerteae dar, welche sich auch in jüngeren phylogenetischen Analysen als valides Taxon erwiesen haben (Coe 1943, Sundberg et al. 2001, Thollessen & Norenburg 2003).

Die Bildung diagonaler Muskelstränge unabhängig von Ring- und Längsmuskulatur ist zweifelsfrei nur bei Vertretern der Hoplo- und Heteronemertinen zu beobachten, allerdings entstehen diese Schichten auf völlig verschiedene Weise und an unterschiedlichen Positionen im Hautmuskelschlauch. Bei *L. viridis* (Heteronemerteae) verlaufen diagonale Fasern als äußerst gelegene Schicht, während sie bei *P. peregrina* (Hoploneuridae) zwischen äußerer Ring- und innerer Längsmuskulatur liegen. Auch ist in diesen beiden Arten bereits der Beginn der Ausbildung adulter Organe wie dem Rüssel zu beobachten. Es ist zu erwarten, dass sich hier keine drastischen Veränderungen in der weiteren Entwicklung zeigen werden. Dies wird unterstützt durch die Lage des Cerebralganglienrings, der innerhalb des Hautmuskelschlauchs lokalisiert ist, also in einer Position, die auch in den adulten Tieren dieser Arten verwirklicht ist (vgl. Gibson 1972). Während diese Tatsache bei *L. viridis*, dessen „Larve“ ja bereits die juvenile Körperorganisation darstellt, nicht verwundert, ist bei der planktischen Larve von *P. peregrina* bemerkenswert, dass sich die Larvalorganisation kontinuierlich in die des Adultus differenziert.

Inwiefern sich larvale Strukturen bei den Vertretern der „Palaeonemerteae“ im voll entwickelten Organismus erhalten, bleibt zu prüfen. Zwar nimmt das Cerebralganglion bereits früh in der Ontogenese seine ringförmige Gestalt an, jedoch liegt es bei *C. mutabilis* und *P. oestrymnicus* außerhalb des Hautmuskelschlauches, eine Position, die so nur im Adultus von *C. mutabilis* auftritt. Bei der letztgenannten Art finden sich in der Adultorganisation jedoch noch andere Muskeleinheiten, nämlich das intraepidermale Muskelfasernetzwerk und eine äußere Längsmuskelschicht, die beide auf den vorderen Körperabschnitt beschränkt sind (Gibson 1972; Turbeville & Ruppert 1983). Auch bei *Procephalothrix*-Arten ist eine weitere Muskelschicht im vorderen Körperabschnitt ausgebildet, nur handelt es sich hier um eine sich nach innen an die Längsmuskelschicht anschließende, zirkuläre Muskelschicht (siehe z. B. Gibson & Junoy 1991). Wie sich diese zusätzlichen Strukturen ausbilden und ob mit der weiteren Entwicklung eine tiefgreifende Modifikation der bestehenden Strukturen verbunden ist, bleibt zu klären. Zu diesem Zweck muss die Entwicklung dieser sich direkt entwickelnden Larvenformen (sensu Friedrich 1979) der „Palaeonemertinen“ weiter verfolgt werden.

Die Ergebnisse jüngerer kladistischer Analysen (Sundberg et al. 2001, Thollesson & Norenburg 2003, Sundberg & Strand 2007) lassen eine Bewertung der Polarität der unterschiedlichen Merkmalsausprägungen zu. In der vorliegenden Untersuchung wurden sowohl Vertreter der als stärker abgeleitet geltenden Taxa Hetero- und Hoplonemertea als auch die als basal abzweigend geltenden, aber paraphyletischen „Palaeonemertea“ studiert. Basierend auf der Topologie der Stammbäume der Nemertea (Sundberg et al. 2001, Thollesson & Norenburg 2003, Sundberg & Strand 2007) ist die Ausbildung der äußeren Längsmuskelschicht als Autapomorphie der Heteronemertea zu bewerten. Eine diagonale Muskelschicht ist zwar in beiden, Hetero- und Hoplonemertea vorhanden, diese bildet sich aber auf unterschiedliche Weise und an anderer Position, kann also nicht als homolog angesehen werden.

Ein Schwestergruppenverhältnis zwischen Hoplo- und Heteronemertea unter dem Namen Neonemertea (Thollesson & Norenburg 2003) wird von diesem Merkmal also nicht unterstützt. Nichtsdestotrotz stellt sie eine Autapomorphie für jede der beiden Gruppen einzeln dar. Obwohl die Ergebnisse der verschiedenen kladistischen Analysen sich insbesondere hinsichtlich der Stellung und Verwandtschaft der „palaeonemertinen“ Taxa innerhalb der Nemertea widersprechen (z. B. Sundberg et al 2001; Sundberg & Strand 2007; Thollesson & Norenburg 2003), ist es möglich einige ursprüngliche Merkmale der Myogenese, die in vielen Aspekten identisch abläuft, zu bestimmen: (1) Das Hautmuskelgitter ist primär zweischichtig, indem eine äußere Ringmuskulatur orthogonal einer inneren Längsmuskulatur aufgelagert wird. (2) Während zu der Anzahl der primär gebildeten Muskelstränge keine Aussage möglich ist, ist festzuhalten, dürfte eine Bildung von Muskelementen entlang eines Gradienten von frontal nach caudal und wahrscheinlich auch von dorsal nach ventral plesiomorph sein. (3) Auch die Bildung der ersten Muskelfasern auf der Höhe des Mundes könnte ein ursprüngliches Merkmal sein.

4.2 Ultrastruktur der Augen

4.2.1 *Carinoma mutabilis* Griffin, 1898 („Palaeonemerte“)

Die Larve von *Carinoma mutabilis* besitzt ein einzelnes, pigmentiertes Auge, das ventro-lateral und frontal der Mundöffnung, etwas rechtsseitig der Mittellinie lokalisiert ist. Es ist nach dem 8. Entwicklungstag ausgebildet. Die ultrastrukturelle Analyse zeigt, dass das Auge im Verbund der larvalen Epidermis liegt und aus zwei Zelltypen besteht, drei multiciliär bewimperten Pigmentzellen und drei monociliär bewimperten Rezeptorzellen. Diese Zelltypen sind charakteristisch für dieses Organ und werden an keiner anderen Stelle in der Larve ausgebildet. Untereinander und mit der umgebenden Epidermis sind die Zellen des Auges durch apikale Adhaerenzonen verbunden. Das Auge hat eine ungewöhnliche Form. Eine Pigmentzelle bildet einen keulenförmigen Fortsatz von 4 µm Länge und 2,5 µm Breite, der über die Oberfläche der Epidermis herausragt. Posterior dieses Fortsatzes senken sich die pigmentierten Zellen zu einer 3,8 µm breiten und 5 µm tiefen Grube ein. An deren Boden treten die sensorischen Zellen zwischen den Pigmentzellen an die Oberfläche, so dass diese Grube den Augenbecher darstellt (Abb. 4.2.1A).

Auffälligstes Merkmal der pigmentierten Zellen ist eine Vielzahl von membranumschlossenen Pigmentvesikeln, deren Inhalt sich im Bild elektronendicht darstellt. Dieser scheint sich bei der Fixierung zu verfestigen und bricht mitunter beim Schneiden der Präparate heraus, so dass einige der Pigmentvesikel leer erscheinen. Die Vesikel sind kugelig, haben einem Durchmesser von circa 880 ± 130 nm ($n = 6$) und verteilen sich über die gesamte Ausdehnung der Zelle. Der Zellkern dieses Zelltyps ist unregelmäßig geformt und liegt in der basalen Region der Zelle, etwas unterhalb der Ebene der Epidermiszellen. Im Verhältnis zu den anderen Epidermiszellen besitzt er ein elektronendichteres Karyoplasma und etwas weniger Heterochromatinanteile. Sie bilden eine geschlossene Schicht auf der Innenseite der Kernmembran sowie einzelne, zentrale Inseln. Es ist auffällig, dass in diesen Zellen, im Gegensatz zu den umgebenden Epidermiszellen, keine basale elektronendichte Schicht aus Aktinfasern ausgebildet ist. Im verhältnismäßig elektronendichten Cytoplasma befinden sich wenige kleine und weit verstreute Mitochondrien, Vesikel unterschiedlicher Größe und Kontrastierbarkeit sowie wenig endoplasmatisches Retikulum. Die Pigmentzellen weisen nur sehr wenige, kurze Mikrovilli auf; diese konzentrieren sich auf der der Augengrube

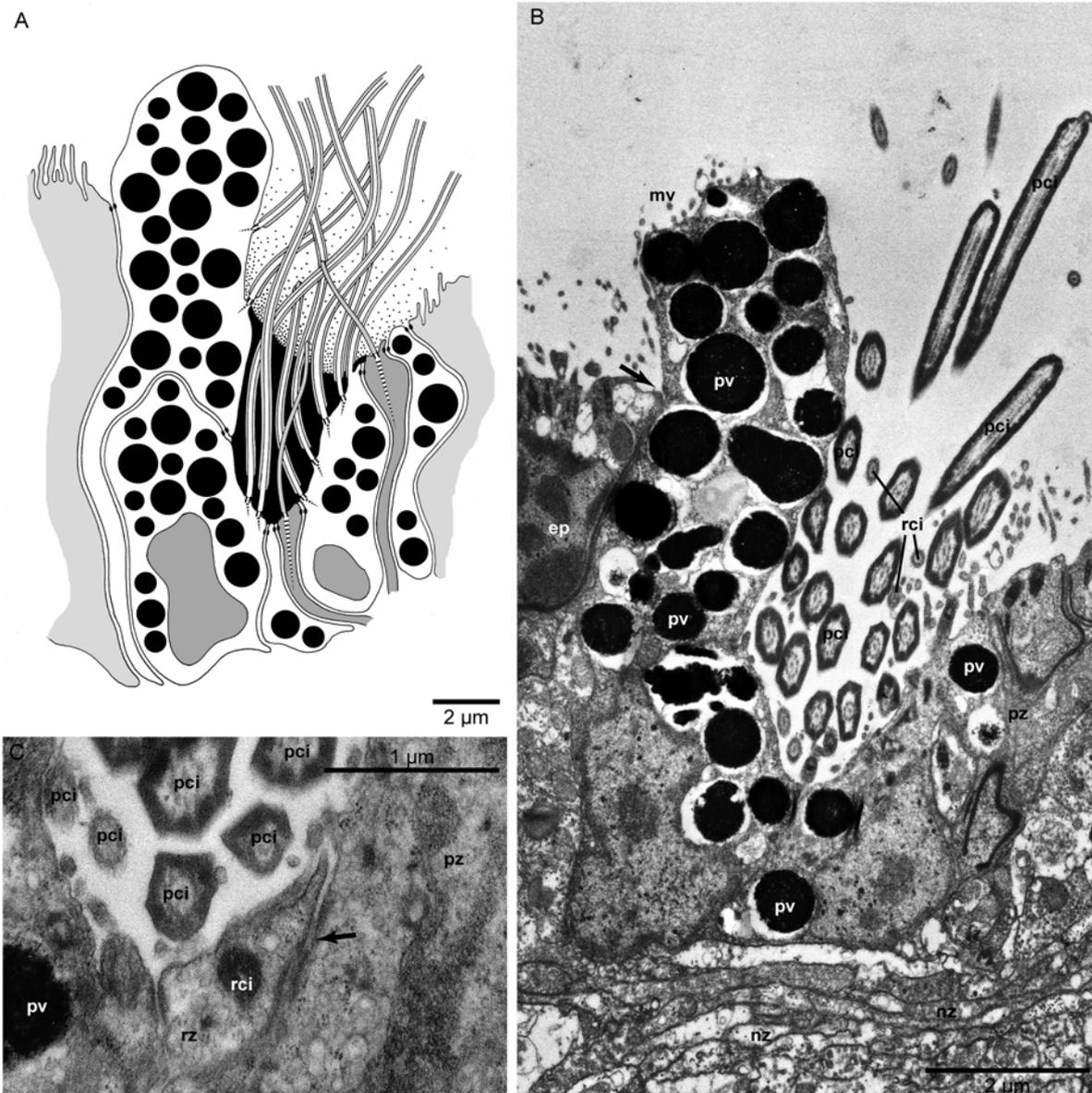


Abbildung 4.2.1: Ciliäre Auge von *Carinoma mutabilis* („Palaeonemertea“), 8 Tage alt. A. Rekonstruktion. B, C. Transmissionselektronenmikroskopie. A. Die Larve von *C. mutabilis* besitzt nur ein Auge, das aus 3 Pigmentzellen und 3 Rezeptorzellen besteht. Die Pigmentzellen bilden einen keulenförmigen Fortsatz, der sich über den Augenbecher wölbt. Zwischen den Pigmentzellen treten die monociliär bewimperten Rezeptorzellfortsätze an die Oberfläche. Ihre Perikaryen befinden sich unter der epidermalen Zellschicht im Nervengewebe (Zellkerne und apikale Mikrovilli der Pigmentzellen nicht dargestellt). B. Die Pigmentzelle enthält große elektronen-dunkle Pigmentvesikel, apikal ist sie mit den umgebenden Epidermiszellen über Adhaerenzonen verbunden (Pfeil). Der Membran ihrer Cilien ist von innen eine elektronendichte Schicht aufgelagert. Dazwischen befinden sich die Cilien der Rezeptorzellen, die keine Besonderheiten aufweisen. C. Rezeptorzellen sind über apikale Adhaerenzonen mit den umgebenden Pigmentzellen verbunden (Pfeil). ep – Epidermiszelle, mv – Mikrovillus, nz – Nervenzelle, pci – Pigmentzellcilium, pv – Pigmentvesikel, pz – Pigmentzelle, rci – Rezeptorzellcilium, rz – Rezeptorzelle.

abgewandten Seite und scheinen grubenseitig von Cilien verdrängt zu werden, denn alle Cilien der Pigmentzellen inserieren im Boden und an den unteren Seitenwänden des Augenbeckers, so dass der aus der Ebene der Epidermis herausragende keulenförmige Fortsatz, cilienfrei ist (Abb. 4.2.1B). Im untersuchten Auge wurden 27 Cilien gezählt, davon inseriert die Mehrzahl (16) in einer der Pigmentzellen mit während sich der Rest der Cilien

auf die anderen beiden Zellen etwa gleichmäßig verteilt (5 bzw. 6). Die Cilien der Pigmentzellen weisen Besonderheiten sowohl hinsichtlich ihrer Position, als auch ihres Aufbaus auf. Jedes Cilium besitzt eine elektronendichte Umhüllung von 70 nm Dicke, die nur 300 nm im basalen Bereich freilässt und bis an die Spitzen der Cilien zieht. Diese Hülle ist der Cilienmembran von innen aufgelagert, so dass ein schmaler Hof um die peripheren Mikrotubuli-Duplets frei bleibt. Die Axoneme der Cilien weisen ein reguläres $9 \times 2 + 2$ Mikrotubuli-Muster auf. Am Basalkörper jeder dieser Cilien entspringt eine kurze, senkrechte Cilienwurzel von etwa 300 nm Länge. Eine Verbindung zwischen der Pigmentzellen und dem Nervensystem konnte nicht nachgewiesen werden.

Zwischen den Pigmentzellen treten dendritische Ausläufer von drei Sinneszellen an die Oberfläche. Auch diese Zellen weisen nicht das für die Epidermiszellen charakteristische basale Aktinfilamentnetz auf. Jeder Zellausläufer sendet ein mit 8 μm Länge vergleichsweise kurzes Cilium in den Augenbecher, das ein reguläres Axonem mit einem $9 \times 2 + 2$ Mikrotubuli-Muster besitzt. Akzessorische Centriole wurden in diesem Zelltyp nicht beobachtet (Abb. 4.2.1C), jedoch erstreckt sich vom Basalkörper des Ciliums eine etwa 2 μm lange Cilienwurzel senkrecht zur Zelloberfläche ins Zellinnere. Diese Cilien sind gut von den sie umgebenden Cilien der Pigmentzellen zu unterscheiden, da ihre Membran keine elektronendichte Hülle aufweist, sondern die reguläre Zellmembran. Das Cytoplasma der Rezeptorzellen ist elektronenheller als das der Pigmentzellen. Zahlreiche kleine Mitochondrien und Mikrotubuli sind über den gesamten Verlauf der Zelle durch die umliegenden Pigmentzellen zu beobachten. Basal, unterhalb der Höhe der Pigmentzellen, treten die sensorischen Zellausläufer unter starker Verringerung ihres Durchmessers durch den Verbund der Pigmentzellen hindurch und verlaufen in ein subepidermal gelegenes neuronales Gewebe, in dem ihr Verlauf nicht mehr mit Sicherheit zu verfolgen ist. Die Zellkörper der Rezeptoren sind wahrscheinlich in diesem neuronalen Zellverbund lokalisiert, aber nicht identifizierbar. Aufgrund der Ultrastruktur der Rezeptorzellen muss das larvale Auge von *C. mutabilis* als ciliärer Photorezeptor klassifiziert werden.

4.2.2 *Procephalothrix oestrymnicus* Junoy & Gibson, 1991 („Palaeonemertea“)

Die Larve von *Procephalothrix oestrymnicus* besitzt ein Paar pigmentierter Augen, die am 4. Tag nach der Befruchtung ausgebildet sind. Sie liegen beidseitig ventro-lateral und etwas

anterior der Mundöffnung. Die ultrastrukturellen Befunde weisen diese Organe als im Verbund der Epidermiszellen liegend aus. Zwei Zellformen sind am Aufbau des Auges beteiligt. Neben zwei monociliären Rezeptorzellen gibt es eine multiciliäre Pigmentzelle. Letztere reicht bis an die Oberfläche der Epidermis, bildet einen Teil von ihr und ist über apikale Adhaerenzonen fest mit den umgebenden larvalen Epidermiszellen verbunden (Abb. 4.2.2A). Basal zieht diese Zelle bis an die basale Matrix der Epidermis. Sie umgibt eine etwa 3,5 µm weite und 1,5 µm hohe Augenhöhle, deren Öffnung schräg nach basal weist. Durch diese treten die distalen, jeweils ein Cilium tragenden Anteile zweier Rezeptorzellen ein. An der Eintrittsstelle sind beide Rezeptorzellen untereinander und mit der Pigmentzelle durch Adhaerenzonen verbunden, so dass die Augenhöhle vollständig gegenüber der Umgebung abgeschlossen ist. Die Oberfläche der Pigmentzelle ist wie die umgebenden Epidermiszellen mit unregelmäßig angeordneten Microvilli besetzt und multiciliär bewimpert (Abb. 4.2.2D). Die Cilien weisen ein reguläres Axonem mit einem $9 \times 2 + 2$ Mikrotubuli-Muster auf. Ein Basalkörper ist vorhanden und regulär ausgebildet. Von ihm aus erstrecken sich zwei Cilienwurzeln von unterschiedlicher Länge in das Zellinnere. Es wurden keine Verbindungen der Basalkörper oder Cilienwurzeln untereinander beobachtet. Auch können keine akzessorischen Centriole nachgewiesen werden. Unterhalb der Cilienwurzeln, und parallel zur Zelloberfläche verlaufend, durchzieht eine elektronendichte, fibrilliäre Schicht die Zelle. Diese wird entsprechend auch in den umgebenden Epidermiszellen beobachtet. Es handelt sich dem Anschein nach um ein Aktinfasernetzwerk, welches über eine zweite, basaler gelegene Adhaerenzzone mit dem umgebender Zellen verbunden ist (Abb. 4.2.2B). Augenbecherseitig weist die Pigmentzelle keinerlei Differenzierung der Zelloberfläche auf.

Durch den Augenbecher ist die Pigmentzelle gleichsam zweigeteilt, denn hierdurch wird sie auf einen schmalen Cytoplasmasaum eingeeengt. Damit entsteht der Eindruck einer transversal verlaufenden Grenze, der durch zwei ultrastrukturell voneinander unterscheidbare Abschnitte verstärkt wird, einen apikalen Abschnitt, der etwa ein Drittel der Höhe der Zelle ausmacht, und einen basalen, der die übrigen zwei Drittel einnimmt (Abb. 4.2.2A). Der apikale Teil der Zelle weist zahlreiche kleinere ($390 \pm 0,11$ nm Durchmesser, $n = 6$), ovoide bis längliche, weniger elektronendichte Vesikel auf, die dicht gepackt und in mehreren Ebenen parallel und senkrecht zur Zelloberfläche liegend ein Linsenfeld ausbilden. Zwischen ihnen erstreckt sich eine etwas elektronendichtere, amorphe, stark fingerartig aufgefaltete Struktur, dessen Zusammensetzung nicht bestimmbar ist (Abb. 4.2.2B). Im basalen Teil der Zelle, proximal der Einschnürung, die die Augenhöhle bildet, befindet sich eine Vielzahl größerer (860 ± 40

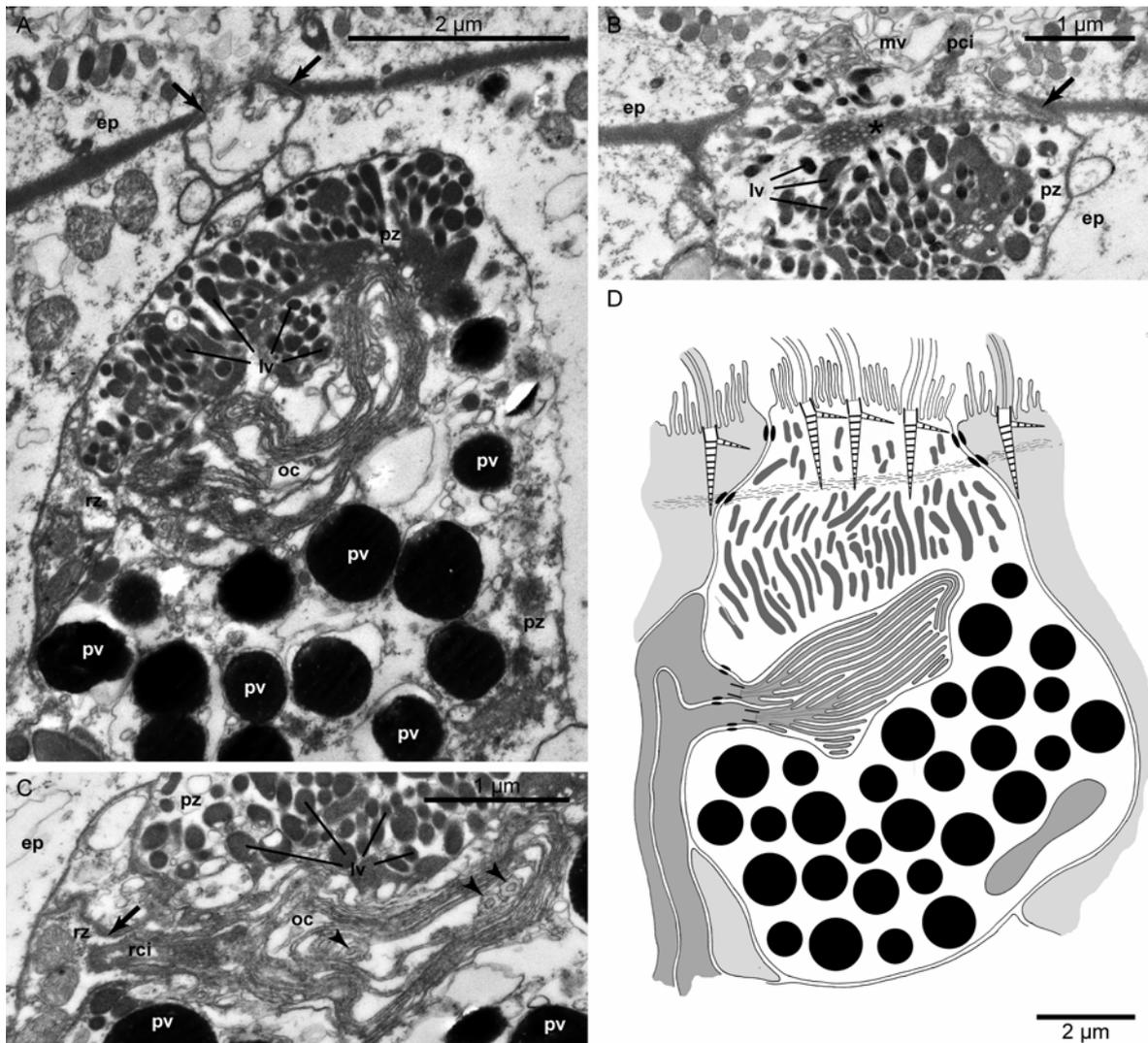


Abbildung 4.2.2: Ciliäres Auge von *Procephalothrix oestrymnicus* („Palaeonemerte“), 5 Tage alt. A-C. Transmissionselektronenmikroskopie. D. Rekonstruktion. A. Die Pigmentzellen sind durch apikale Adhaerenzzonen mit den umliegenden Epidermiszellen (*Pfeile*) verbunden. Das apikale Zeldrittel enthält zahlreiche kleinere unregelmäßig geformte Linsenvesikel, während sich im basalen Teil große, elektronendunkle Pigmentvesikel befinden. An einer Seite weist die Zelle eine Invagination auf, die die Augenhöhle darstellt. **B.** Die Oberfläche weist eine multiciliäre Bewimperung und zahlreiche Microvilli auf. Darunter ist eine siebartige, elektronen-dichte Struktur ausgebildet (*Sternchen*) die mit einer. basalen Adhaerenzzone verbunden zweiten ist (*Pfeil*). **C.** Die Augenhöhle wird von den sensorischen Cilien zweier Rezeptorzellen ausgefüllt, die durch Adhaerenzzonen miteinander apikal und mit der Pigmentzelle verbunden sind (*Pfeil*). Die Membran der Cilien ist stark aufgefalteter. Ihr Axonem ist aufgelöst und zeigt keine geordnete Struktur (*Pfeilspitzen*). **D.** *P. oestrymnicus* besitzt ein Paar larvale Augen. Sie bestehen aus einer Pigmentzelle und zwei Rezeptorzellen. Die Pigmentzelle hat eine fassförmige Gestalt und umgibt die Augenhöhle, in die die rezeptorischen Cilien zweier Rezeptorzellen ziehen. Ihre Zellkerne befinden sich in subepidermal gelegenen neuronalen Gewebe. *ep* – Epidermiszelle, *lv* – Linsenvesikel, *mv* – Mikrovillus, *oc* – Augenhöhle, *pci* – Pigmentzellcilium, *pv* – Pigmentvesikel, *pz* – Pigmentzelle, *rci* – Rezeptorzellcilium, *rz* – Rezeptorzelle.

nm Durchmesser, $n = 6$), elektronendichterer, kugelförmiger Pigmentvesikel, die das Auge zur Körperunterseite hin vom einfallenden Licht abschirmen (Abb. 4.2.2A). Zwischen diesen Pigmentvesikeln sind zahlreiche Mitochondrien sowie der unregelmäßig geformte Zellkern lokalisiert. Dieser enthält vorwiegend elektronenhelles Euchromatin; es sind nur wenige

elektronendunklere heterochromatische Anteile auszumachen. Das Cytoplasma in der gesamten Zelle ist elektronenhell; es finden sich darin neben den genannten Organellen und einigen Vesikeln keine auffälligen Einschlüsse.

Die Zellkörper der Rezeptorzellen befinden sich weit außerhalb des von der Pigmentzelle umgebenen Bereichs; sie liegen wahrscheinlich subepidermal in einer neuronalen Zellmasse und sind, wie die Rezeptorzellen von *Carinoma mutabilis*, nicht sicher darin zu verfolgen. Der dendritische Ausläufer, den jede der beiden Zellen zunächst lateral der Pigmentzelle, dann abknickend bis in die Augenhöhle aussendet, weist elektronenhelles Cytoplasma auf, in dem neben Mikrotubuli und einzelnen Vesikeln keine weiteren auffälligen Zellorganellen auszumachen sind. An der Durchtrittsstelle in den Augenbecher weitet sich der Durchmesser der Dendriten. Hier befinden sich die Aktinfilamentgürtel der Adhaerenzzone und vereinzelte, kleine Mitochondrien. Augenbecherwärts inseriert in jedem Dendriten ein Cilium, das sich bald verzweigt und stark gefaltete, pergamentrollenartig aufgewickelte Membranstapel im Inneren des Augenbechers bildet (Abb. 4.2.2C). Basal weist das Axonem des Ciliums ein $9 \times 2 + 0$ Axonem auf, dem das zentrale Mikrotubuli-Duplet fehlt. Es verliert mit zunehmender Entfernung von seinem Ursprungsort, dem Basalkörper, seine Ordnung. Einzelne Mikrotubuli ziehen weit in die Äste des sich verzweigenden Ciliums hinein. Rechtwinklig des Basalkörpers liegt ein akzessorisches Centriol; eine Cilienwurzel wurde nicht gefunden. Auch die Augen von *P. oestrymnicus* müssen aufgrund der Ultrastruktur ihrer Rezeptorzellen als ciliäre Photorezeptoren klassifiziert werden.

4.2.3 *Paranemertes peregrina* Coe, 1901 (Hoploneurtea)

Die Larve von *P. peregrina* weist am 8. Tag ihrer Entwicklung ein Paar, am 10. bereits zwei Paar pigmentierte Augen auf, die dorsal in einer Reihe auf beiden Seiten des Kopfes vor der Mundöffnung als dunkle, runde Flecken lichtmikroskopisch zu erkennen sind. Die Augen wurden bei einer 10 und einer 14 Tage alten Larve untersucht. Der Vergleich zeigt, dass alle Augen ultrastrukturell identisch aufgebaut sind, wobei das weiter caudal liegende Paar etwas kleiner ist und weniger Rezeptorzellen aufweist. Die frontaler gelegenen Augen sind im Durchmesser etwa 10 μm groß und etwa 13,4 μm hoch. Die Augenbecher liegen unter die Epidermis innerhalb der subepidermalen Zellschicht. Die Augen bestehen aus zahlreichen rhabdomerischen Rezeptorzellen, die von einem pigmentierten Augenbecher umfasst werden.

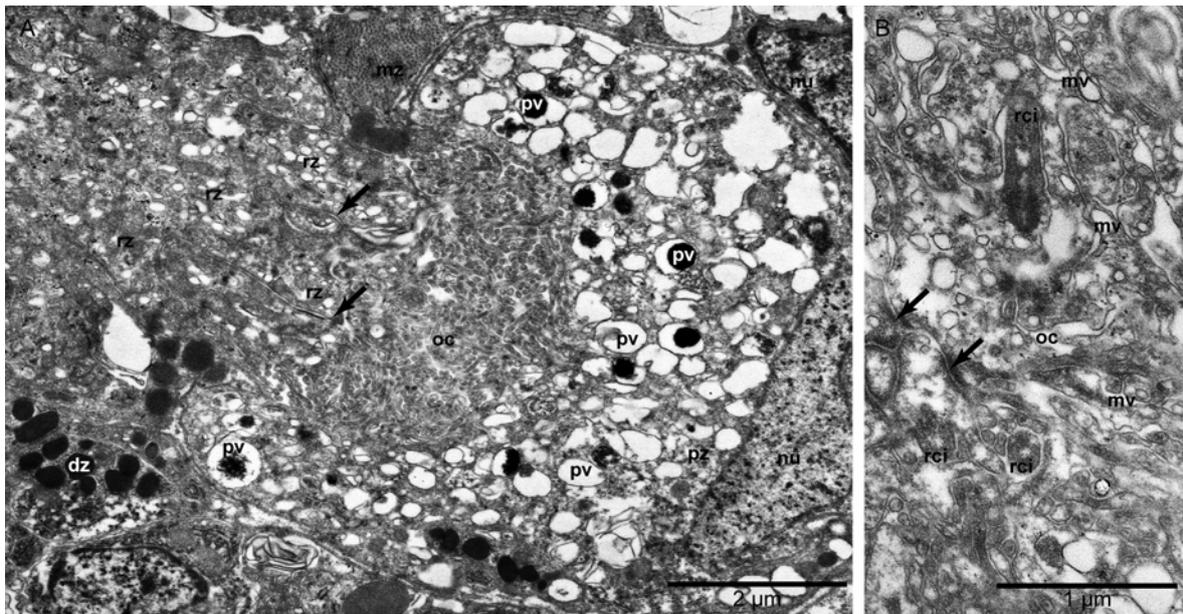


Abbildung 4.2.3: Rhabdomerisches Auge von *Paranemertes peregrina* (Hoplonemertea), 10 Tage alt. Transmissionselektronenmikroskopie. A. Das Auge liegt unter der Epidermis und ist von Muskel- und Drüsenzellen umgeben. In einem von einer Pigmentzelle geformten Augenbecher liegen die sensorischen Anteile zahlreicher Rezeptorzellen. Alle Zellen sind untereinander durch apikale Adhaerenzzonen verbunden und bilden eine geschlossene Augenhöhle. Die Kerne der Rezeptorzellen liegen außerhalb des Augenbeckers. Die Pigmentzelle hat einen großen Zellkern und enthält zahlreiche elektronendunkle Pigmentvesikel. **B.** Die Rhabdomere werden von vielen Mikrovilli gebildet. Jede Rezeptorzelle weist ein degeneriertes Cilium ohne zentrales Mikrotubuli-Paar auf (*Pfeile* markieren Adhaerenzzonen.) *dz* – Drüsenzelle, *mv* – Mikrovillus, *mz* – Muskelzelle, *nu* – Zellkern, *oc* – Augenhöhle, *pv* – Pigmentvesikel, *pz* – Pigmentzelle, *rci* – Rezeptorzellcilium, *rz* – Rezeptorzelle.

Sie sind in die extrazelluläre Matrix eingebettet und von versenkten Drüsen und Muskelzellen umgeben. Der Augenbecher schirmt mehr als 10 Rezeptorzellen zur Körperinnenseite hin ab und besteht aus einer einzelnen, großen Zelle (Abb. 4.2.3A).

Die Zellmembran der Pigmentzelle ist auf der den Rezeptorzellfortsätzen abgewandten Seite in großen Loben aufgefaltet, während sie augenbecherseitig keine Auffaltung aufweist, aber kurze Mikrovilli ausbildet, die ebenfalls in den Augenbecher ragen und zwischen die längeren rhabdomerischen Mikrovilli treten. Das Innere dieser Pigmentzelle ist überwiegend mit Pigmentvesikeln verschiedener Größe und Form angefüllt. Der Inhalt dieser Vesikel ist bei der Präparation großteils herausgelöst worden, aber in einigen Vesikeln noch zu erkennen. Hier wird deutlich, dass er aus einem körnigen, elektronendunklen Material besteht. Das Zellplasma ist verhältnismäßig elektronenhell und enthält neben den Pigmentvesikeln einige Mitochondrien und zahlreiche kleinere, elektronenhelle Vesikel. Es wurden darüber hinaus keine weiteren auffälligen Zellorganelle, wie Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat oder Cilien beobachtet. Ein einzelner, großer Zellkern liegt etwas seitlich am distalen Rand des Augenbeckers, durch seine Größe von 5 µm mal 2 µm mal 2 µm zieht er aber proximal

bis etwa auf die Hälfte der Höhe des Augenbeckers. Sein Karyoplasma ist weitgehend elektronenhell gefärbt, mit kleinen elektronendunklen Körnchen (Abb. 4.2.3A). Das Erbmaterial liegt, bis auf einen prominenten, zentralen Nucleolus, im euchromatischen Zustand vor; es wurde sonst kein heterochromatisches Material nachgewiesen.

Die Perikaryen der Rezeptorzellen liegen außerhalb des Augenbeckers. Sie enthalten große elektronendicht kontrastierbare Kerne mit hohem Euchromatin-Anteil und entsenden Axone zu den sich entwickelnden Neuropilen (Cerebralganglien), deren Anbindung in dieser Untersuchung nicht weiter verfolgt wurde. Die dendritischen Ausläufer der Rezeptorzellen treten in einem Bündel in den Augenbecher und verbreitern sich hier zu einem Rhabdomer, das aus zahlreichen, unregelmäßigen Mikrovilli besteht. Die Mikrovilli füllen den gesamten Augenbecher aus und stellen den rezeptiven Bereich des Auges dar. Sie liegen in einem ungeordneten Zustand vor und stehen so dicht, dass in der Augenhöhle kein Hohlraum verbleibt (Abb. 4.2.3A). In jeder Rezeptorzelle ist ein kurzes, etwas eingesenktes, rudimentäres Cilium vorhanden. Es enthält ein Axonem, das 9 periphere Mikrotubuli-Duplets, jedoch kein zentrales Mikrotubulipaar aufweist (Abb. 4.2.3B). Die peripheren Doppeltubuli gehen aus dem Basalkörper hervor, der mit einer kurzen Cilienwurzel in der Rezeptorzelle inseriert; ein akzessorisches Centriol fehlt. Basal dieses Rhabdomerbereiches sind die Dendriten untereinander und mit den Zellausläufern der Pigmentzelle durch Adhaerenzonen verbunden, so dass eine geschlossene Höhle entsteht (Abb. 4.2.3A). Das Zellplasma im gesamten analysierten Teil der Zelle ist elektronendunkler als das der Pigmentzelle und enthält zahlreiche Mikrotubuli. Distal der Adhaerenzonen, also außerhalb des Augenbeckers, verlaufen die Zellausläufer über den gesamten beobachteten Bereich zunächst parallel, bis sie sich zu den Perikaryen erweitern. Aufgrund der Ultrastruktur ihrer Rezeptorzellen müssen die Augen der Larve von *P. peregrina* als rhabdomerische Photorezeptoren klassifiziert werden.

4.2.4 Bewertung der Befunde

Während die Augen erwachsener Nemertinen ultrastrukturell bereits bei einigen Arten untersucht wurden (Eakin & Westfall 1968, Vernet et al. 1970, Storch & Welsch 1972, Jespersen & Lützen 1988, Turbeville 1991), stellen diese Ergebnisse die ersten ultrastrukturellen Befunde larvaler Augen dar. Diese weisen trotz gravierender Unterschiede

in ihrer Morphologie zunächst einmal einige grundsätzliche Gemeinsamkeiten auf, die sie eindeutig als Photorezeptoren ausweisen. Bei allen untersuchten Augen handelt es sich um pigmentierte Lichtsinnesorgane, die aus zwei Zelltypen aufgebaut sind, einem pigmentierten und einem sensorischen Typ. Die Zellkerne der Rezeptorzellen sind bei allen untersuchten Vertretern nicht in unmittelbarer Nähe des Augenbechers lokalisiert, sondern in neuronalen Geweben, die sich etwas entfernt des Auges befinden. Sie senden dendritische Ausläufer mit terminalen, rezeptiven Bereichen in den Augenbecher. Alle diese Gemeinsamkeiten teilen sie mit pigmentierten Photorezeptoren anderer Spiralia (Bartolomaeus 1987, 1992a, b; Kunert & Ehlers 1987; Purschke 1992, 2005; Purschke et al. 2006; Soppott-Ehlers 1999). Von diesen Gemeinsamkeiten abgesehen, zeigen die untersuchten Arten erhebliche Unterschiede hinsichtlich des Aufbaus ihrer optischen Sinnesorgane sowie der Anzahl der daran beteiligten Zellen. Bei *Carinoma mutabilis* wird nur ein einzelnes pigmentiertes Auge ausgebildet. Es besteht aus einem zur Außenwelt hin offenen Augenbecher, der von drei pigmentierten Zellen gebildet wird. Zwischen diesen sind drei ciliäre Rezeptorzellen verteilt, die unabhängig voneinander in das darunter liegende neuronale Gewebe ziehen. Die Larve von *Procephalothrix oestrymnicus* weist ein Paar Augen auf, die jeweils eine abgeschlossene pigmentierte Augenhöhle besitzen, die nur von einer Pigmentzelle gebildet wird. Den rezeptiven Bereich bilden zwei Zellen, die modifizierte, stark verzweigte Cilien mit aufgefalteten Membranen ausbilden. *Paranemertes peregrina* schließlich, für die die erwachsenen Augen bereits ohne ausführliche Dokumentation ultrastrukturell bearbeitet wurden (Eakin & Westfall 1968), besitzt zunächst ein Paar, dann, noch während der freischwimmenden Phase, zwei Paar larvaler Augen, die sich im Laufe der weiteren Ontogenese vermehren werden. In diesem zeitlichen Verlaufsmuster besteht Übereinstimmung mit der sich direkt entwickelnden Heteronemertine *Lineus viridis* (Döhren & Bartolomaeus 2007). Der Pigmentbecher der Augen larvaler *P. peregrina* besteht aus einer einzigen großen Zelle, die den rezeptiven Bereich der Sinneszellen umfasst. Die Ausläufer der Sinneszellen, die in großer Zahl im larvalen Auge vorhanden sind, treten gemeinsam gebündelt in den Augenbecher ein. Dort weisen sie einen rhabdomerischen Rezeptorbereich auf, dessen Oberfläche durch zahlreiche Mikrovilli und ein einzelnes rudimentäres Cilium, das kein zentrales Mikrotubuliduplet besitzt, vergrößert ist. Dieser letztgenannte Befund steht im Widerspruch zu Informationen von Eakin & Westfall (1968), wonach keine Spur einer ciliären Struktur in den Sinneszellen erwachsener *P. peregrina* nachweisbar ist. Da eine ontogenetische Kontinuität der Augen bei dieser Art besteht (Roe 1976), ist es unwahrscheinlich, dass das Cilium im Laufe der weiteren Entwicklung reduziert wird. Die

Autoren untersuchten außer den Augen der Adulti dieser Art diejenigen von *Emplectonema gracile* (Johnston, 1837) und einer nicht näher bestimmten *Tetrastemma*-Art. Detaillierte Ergebnisse wurden jedoch, mit Hinweis auf identische Ultrastruktur bei den anderen untersuchten Arten, nur für *E. gracile* publiziert. Daher ist eine klare Bewertung der Details von Augen adulter *P. peregrina* schwierig; es ist nicht auszuschließen, dass das kurze, rudimentäre Cilium der Rezeptorzellen von *P. peregrina* übersehen wurde. Bisher ist die Ultrastruktur der Augen erwachsener Palaeonemertinen nie untersucht worden, was auch damit zusammenhängt, dass die adulten Palaeonemertinen fast ausnahmslos keine pigmentierten Augen besitzen (Gibson 1982).

Unabhängig vom ontogenetischen Status der bearbeiteten Arten lassen sich die bisher untersuchten Augen in zwei Gruppen einteilen. Die Augen der palaeonemertinen Arten *C. mutabilis* und *P. oestrymnicus* sind epidermale, ciliäre Organe, die auf larvaler Organisation verbleiben und während der weiteren Ontogenese verloren gehen. Bei *P. peregrina* stellt sich die Situation anders dar: hier ist in der Larve ein subepidermales, rhabdomerisches Auge ausgebildet, welches, mit der oben diskutierten Einschränkung, dem Auge der adulten Tiere dieser Art entspricht. Das wird durch die Befunde der Augenentwicklung von juvenilen *Lineus viridis* gestützt (Döhren & Bartolomaeus 2007), nach denen das erste pigmentierte Paar Augen, das im Jungtier angelegt wird, größer wird und in die Adultorganisation übernommen wird. Es ist daher anzunehmen, dass das erste Paar pigmentierter Augen auch bei *P. peregrina* persistiert, womit es keine exklusiven Larvalaugen darstellt, sondern im strengen Sinne Adultorgane. Die adulten pigmentierten Augen sind bei allen untersuchten Arten der Hoplonemertea ähnlich (Eakin & Westfall 1968 für *E. gracile*, *P. peregrina*, *Tetrastemma* sp.; Jespersen & Lützen 1988 für *Acteonemertes bathmae* Pantin, 1961, *Nipponemertes pulcher* (Johnston, 1837), *Prostoma graecense* (Böhmig, 1892); Turbeville 1991 für *Nemertopsis bivittata* (Delle Chiaje, 1841)). Ihre subepidermale Lage, ihr Aufbau aus einer oder wenigen Pigmentzellen und zahlreichen rhabdomerischen Rezeptorzellen begründen die Hypothese einer generellen Homologie der Hoplonemertinen-Augen. Da auch die Augen der Heteronemertea-Arten *Lineus ruber* (Müller, 1774) und *L. viridis* subepidermal liegen und rhabdomerische Rezeptorzellen besitzen (Döhren & Bartolomaeus 2007, siehe Anhang, Manuskript 4; Jespersen & Lützen 1988; Storch & Welsch 1972; Vernet et al. 1970), kann davon ausgegangen werden, dass dieser Augentyp bei Hetero- und den Hoplonemertea homolog ist. Eine Homologie dieser Augen mit den ersten pigmentierten Augen der beiden untersuchten Arten der „Palaeonemertea“ lässt sich indes kaum begründen. Bei diesen

Photorezeptoren handelt es sich um transitorische Larvalorgane, die ciliäre Rezeptorzellen ausgebildet haben. Dabei wiegt insbesondere die unterschiedliche Rezeptorausstattung schwer, da Signaltransduktion und -weitergabe sich zwischen rhabdomerischen und ciliären Rezeptoren fundamental unterscheiden (Purschke et al. 2006).

Die Frage nach dem Grundmuster der pigmentierten Augen der Nemertea lässt daher zwei mögliche Szenarien zu.

(1) Rhabdomerische, subepidermale Augen, wie sie bei Hoplo- und Heteronemertea zu finden sind, gehören ins Grundmuster der Nemertea. Sie stellen die ontogenetisch frühesten Augen dar. Diese Augen müssen bei Vertretern der „Palaeonemertea“ reduziert worden sein. An ihrer Stelle evolvierten larvale, epidermale Augen mit ciliärem Rezeptortyp.

(2) In das Grundmuster der Nemertea gehören larvale, epidermale Augen mit ciliärem Rezeptortyp. Die subepidermalen rhabdomerischen Augen stellen eine evolutive Neuheit einer Einheit dar, die Hetero- und Hoplonemertea umfasst.

Vor allem vor dem Hintergrund, dass bei den übrigen Spiraliern und deren Larven nahezu ausschließlich epidermale, pigmentierte, rhabdomerische Lichtsinnesorgane als ontogenetisch früheste und später degenerierende Augen auftreten (Annelida: Bartolomaeus 1992a, Mollusca: Bartolomaeus 1992b, Sipuncula: Blumer 1997; Ausnahme: Plathelminthes, Lafranchi & Bedini 1986), erscheint die erste Annahme wahrscheinlicher. Als evolutive Neuheit der Nemertea wäre dann möglicherweise die Versenkung der Augen in subepidermale Zellschichten zu werten. Ausgehend von den Befunden phylogenetischer Analysen unter Einbeziehung fast aller Teiltaxa (Sundberg & Strand 2007; Sundberg et al. 2001; Thollesson & Norenburg 2003) repräsentieren die palaeonemertinen Arten jedoch eine paraphyletische Ansammlung, so dass die erste Annahme nicht mehr das sparsamste Szenario darstellt, da die Reduktion der rhabdomerischen Augen und ihr Ersatz durch ciliäre Augen danach zumindest mehr als zweimal erfolgt sein muss. Dabei ließen sich allerdings die Unterschiede zwischen den ciliären Augen als Ausdruck konvergenter Evolution deuten. Aufgrund der aktuellen Hypothesen zur Phylogenie der Nemertea erscheint im Moment die zweite Annahme sparsamer, nach der ciliäre larvale Augen ins Grundmuster gehören und die rhabdomerischen Augen erst in einer gemeinsamen Stammlinie der Hoplo- und Heteronemertea evolvierten. Das Merkmal der rhabdomerischen Augen stellt danach eine Synapomorphie dar, die ein Schwestergruppenverhältnis von Hoplo- und Heteronemertea unterstützt, so wie von Thollesson & Norenburg (2003) hypothetisiert. Für einzelne Arten der

Gattung *Cephalothrix* („Palaeonemertea“) sind pigmentierte Augen auch im Adultus beschrieben (Gibson 1982; Gibson & Junoy, 1991). Ihre ultrastrukturelle Untersuchung steht jedoch noch aus. Es bleibt zu klären, um welchen Typ pigmentierte Augen es sich handelt. Nach den oben gemachten Aussagen ist zu erwarten, dass es sich um epidermale, ciliäre Lichtsinnesorgane handelt, die womöglich aufgrund von Heterochronie-Effekten in die Adultorganisation übernommen wurden.

5 Diskussion

Ausgehend von *Lineus viridis*, einer im Intertidal der deutschen Bucht abundanten Nemertine (Nordhausen 1988), wurden zunächst einmal Daten zu Reproduktion, Ontogenese und Ultrastruktur erhoben. Das Ziel bestand darin, für eine Art der Heteronemertinen eine möglichst genaue Dokumentation ihrer Biologie und Morphologie zu erarbeiten und damit einen Kenntnisstand zu erreichen, der für die Hoplonemertine *Paranemertes preregrina* bereits vorliegt (Roe 1967, 1970, 1976, 1979). Ausgehend davon wurde ein Vergleich mit anderen Nemertinen-Arten geführt mit der Zielsetzung (1) eine verbesserte Auflösung der Nemertinen-Phylogenie oder zumindest eine verbesserte Unterstützung der auf molekularen Daten basierenden Nemertinen-Phylogenien zu erzielen und (2) morphologische Daten zu erheben, die existierende Kenntnislücken schließen und Hinweise auf die Stellung der Nemertea im System der Tiere liefern.

5.1 *Lineus viridis* (Heteronemertea)

Lineus viridis ist eine geschlechtsdimorphe Art. Diese kontrovers diskutierte Feststellung (Bartolomaeus 1984 versus Gontcharoff 1951) konnte durch umfangreiche Freiland-Datenerhebungen bestätigt werden. Ganzjährig existiert ein signifikanter Größenunterschied zwischen weiblichen Tieren, den im Sommer nicht-fertilen Mitgliedern der Population sowie den Männchen, die als solche nur im Winterhalbjahr eindeutig zu erkennen sind und sonst in die Gruppe nicht-fertiler Tiere fallen (Beckers et al, zur Publikation angenommen; siehe Manuskript 1). Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich der Geschlechtsdimorphismus nicht nur auf die Größe und die Position der Gonoporen beschränkt, sondern sich auch in verschiedenen Zyklen der generativen Gewebe widerspiegelt. Die Weibchen behalten das ganze Jahr über die Gonaden bei und beginnen bald nach der Fortpflanzung mit der Oogenese für die nächste Fortpflanzungszeit. Auch die Gonoporen persistieren und sind das ganze Jahr über vorhanden; der Gonodukt wird durch eine Gewebebrücke verschlossen. Die männlichen Tiere büßen nach der Fortpflanzungszeit nicht nur die Gonoporen und Gonodukte ein, sondern auch der gesamte Hoden erfährt durch Abbauprozesse gravierende Änderungen, die, oberflächlich betrachtet, zu der Annahme verleiten, die Tiere könnten die Gonade vollständig verlieren und einen Geschlechtswechsel in ihrem Lebenszyklus vollziehen (Döhren & Bartolomaeus 2006). Diese anfängliche Vermutung erwies sich jedoch als unzutreffend

(Beckers et al., zur Publikation angenommen, siehe Manuskript 1). Stattdessen wird das generative Gewebe kurz vor der Fortpflanzungszeit wieder aktiviert und die Gametenproduktion setzt von neuem ein. Die sehr lange Zeitspanne der Gonadenentwicklung beim weiblichen Tier ist ursächlich mit den sehr dotterreichen Eiern und der direkten Entwicklung verbunden. Verglichen mit Nemertinen, die dotterarme Eier haben und sich über ein spezielles Larvenstadium entwickeln (unpubl. für *Carinoma mutabilis*, *Rhaphogordius lacteus*, *Procephalothrix filiformis*, *P. oestymnicus*) ist die Anzahl der von einem Weibchen abgegebenen Eier daher eher gering. Für eine freie Abgabe und einen unsicheren Reproduktionserfolg investieren Weibchen von *L. viridis* zu viel in die Gametenproduktion. Das mag einer der Gründe sein, warum sehr früh eine Assoziation der Geschlechter erfolgt (mehr als 2 Monate vor der Befruchtung). Doch auffälligerweise sind es die Männchen, die die Weibchen suchen.

Das wirft die Frage nach Mechanismen auf, die es den Tieren ermöglichen, potentielle Fortpflanzungspartner aktiv aufzuspüren. Da das optische System zum Erkennen eines Partners unzureichend entwickelt ist (Döhren & Bartolomaeus 2007), lassen die abiotischen Faktoren eines aquatischen Lebensraums eine durch Pheromone vermittelte, chemische Partnerfindung vermuten. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass Männchen von graviden Weibchen angezogen werden, also ein chemisches Signal erhalten (Beckers et al., zur Publikation angenommen; s. Manuskript 1). Das wurde für pelagische Nemertinen zwar schon vermutet, konnte bisher aber nicht belegt werden (Norenburg & Roe 1998).

5. 2 Vergleichende Spermienultrastruktur – Bedeutung für die Nemertinen-Phylogenie

Das bereits erwähnte, komplizierte Paarungsverhalten, das mit einer abschließenden Pseudokopulation verbunden ist, führt zu der Erwartung, dass die Spermien eine an diese abgeleitete Situation angepasste Gestalt haben. Es ist schon länger bekannt, dass *L. viridis* und die nahe verwandte Art *L. ruber*, die mit dieser oft verwechselt wird (vgl. Gontcharoff 1951, Friedrich 1979), langgestreckte Spermatozoen ausbilden. In der Ultrastruktur zeigt sich jedoch, dass sich nur einige Komponenten des Spermiums verändern. So sind der Zellkern und die Mitochondrien zwar verlängert, das Akrosom weist aber eine vorgeblich ursprüngliche Gestalt auf (Döhren & Bartolomaeus 2006). In einem umfangreichen Vergleich mit weiteren Arten aus fast allen Teilgruppen, bei der auch verfügbare Literatur zur

Spermienultrastruktur weiterer Arten der Nemertea hinzugezogen wurde, zeigt sich, dass einzelne Spermienmerkmale bei näher verwandten Arten nahezu gleich gestaltet sind, während sich andere artspezifisch unterscheiden. So ist das Akrosom der untersuchten Heteronemertinenarten *Rhampogordius lacteus*, *R. sanguineus*, *R. pseudolacteus*, *L. viridis* sowie *Micrura fasciolata* nahezu identisch gestaltet. Andere, auch hinsichtlich ihres Fortpflanzungsverhaltens vermeintlich ursprüngliche Arten weisen völlig anders geformte Akrosome auf. Dieser Umstand machte es lohnenswert, erstmalig ultrastrukturelle Daten zu Spermien von Nemertinen für phylogenetische Analysen zur Klärung der Innengruppenverhältnisse zugänglich zu machen. Die Befunde dieser Untersuchung unterstützen gängige Verwandtschaftshypothesen, wie die Monophylie der Hetero- und Hoplonemertea. Sie lassen bisher jedoch ähnlich wie bereits veröffentlichte Daten keine fundierten Verwandtschaftshypothesen für diejenigen Teilgruppen zu, die unter der Bezeichnung „Palaeonemertea“ zusammengefasst werden (Döhren et al., eingereicht; siehe Manuskript 5). Die bisherigen Phylogenien auf der Basis molekularer Daten kommen, je nach Wahl der Nukleotidsequenzen, zu völlig unterschiedlichen Auflösungen; die Schwestergruppenverhältnisse der gut unterstützten Taxa, wie auch die der Taxa der "Palaeonemertea" untereinander, sind widersprüchlich. Mit morphologischen Befunden wurde dieses Problem bisher auch keiner Lösung zugeführt. Die entsprechenden Analysen zielten bisher auf die Klärung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb einzelner Teilgruppen ab (Härlin 1998, Härlin & Sundberg 1994, Härlin & Härlin 2001, Schwartz & Norenburg 2001). Dieses Problem bleibt bestehen und wird erst durch umfassendere Analysen unter Einbezug weiterer morphologischer und molekularer Merkmale auf der Basis eines breiten *taxon samplings* zu lösen sein. Die neuen morphologischen Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich dafür eine genaue Bearbeitung der Ontogenese unter besonderer Berücksichtigung der als "Palaeonemertea" klassifizierten Taxa lohnt.

5.3 Merkmale der larvalen Organisation

5.3.1 Metamorphose

Die dotterreichen Eier von *Lineus viridis* entwickeln sich ohne freischwimmendes Stadium zum Adultus (Nusbaum & Oxner 1913, Gontcharoff 1951). Damit fehlt dieser Art die für Heteronemertea typische Pilidium-Larve. Für diese Larve ist charakteristisch, dass sich im

Anschluss an die Gastrulation zunächst eine sehr umfangreiche larvale Epidermis und ein sackförmiger Darm ausbilden. Im Laufe der weiteren Entwicklung wird die juvenile Nemertine im Inneren des Pilidium aus Imaginalscheiben gebildet, die sich von der Epidermis ablösen, sich um den Darmkanal gruppieren und fusionieren. Damit entsteht, unter anderem, unter der Epidermis des Pilidiums diejenige des juvenilen Organismus (Coe 1899, Wilson 1900, Salensky 1912, Cantell 1969, 1972). Am Ende der Entwicklung steht die pilidiale Epidermis noch über den Vorderdarm mit dem juvenilen Organismus in Verbindung. Während der Metamorphose schlüpft das Jungtier aus der pilidiaen Hülle und frisst diese auf (Cantell 1966). Es war schon recht früh beschrieben worden (Nusbaum & Oxner 1913, Schmidt 1964; vgl. Gontcharoff 1951, Friedrich 1979 zur Frage der Artidentität der untersuchten Arten), dass *Lineus viridis* ein intrakapsuläres Entwicklungsstadium durchläuft und dass sich auch hier die Entwicklung über Imaginalscheiben vollzieht.

5.3.2 Planuliforme Larve

In anderen Teilgruppen der Nemertea, insbesondere bei den "Palaeonemertea" und Hoplonemertea, ist eine freischwimmende plankto- oder lecitotrophe Larvenform ausgebildet, das als planuloide (auch planuliforme) Larve bezeichnet wird (Gibson 1972). Sie weist äußerlich außer einem apikalen und bei den Hoplonemertinen auch einem caudalen Wimperschopf nur wenige Merkmale auf. Die Larven der meisten Arten besitzen ein Paar Augen (*Carinoma*-Arten nur ein einzelnes Auge) und der Darm ist als blind-endender Sack ausgebildet. Im Laufe der Entwicklung werden die Organe des Adultus kontinuierlich ausgebildet; die Augen der "Palaeonemertinen" werden vermutlich reduziert (Adulttiere weisen keine Augen auf) (Iwata 1960, Gibson 1972, Friedrich 1979). Der endgültige Übergang zum Bodenleben ist bei Arten mit diesem Larventyp selten beobachtet worden (z. B. Roe 1976 für *P. peregrina*). Die Untersuchungen zur Larvalentwicklung der "Palaeonemertea" und der Vergleich mit Befunden der entsprechenden Organe der als stärker abgeleitet geltenden Gruppen unterstützen die gängigen Verwandtschaftshypothesen innerhalb der Nemertea und lassen Aussagen zur Lesrichtung der Merkmale zu. So zeigt sich in der Entwicklung der Hetero- und Hoplonemertea eine larvale, transitorische Epidermis, die während der weiteren Entwicklung verloren geht. Dieser entledigen sich die Hoplonemertinen *P. peregrina*, *A. phyllospadicola* und *O. dorsalis* in Form einzelner Zellen, während bei den Heteronemertea mit einer Pilidium-Larve die larvale Hülle zusammenhängend abgestreift und

zumeist gefressen wird. Dies trifft auch, entgegen anders lautender Angaben (Nusbaum & Oxner 1913, Schmidt 1964), für *Lineus viridis* zu, der eine intrakapsuläre Larve aufweist (Döhren im „review“-Verfahren, siehe Manuskript 3). Setzt man voraus, dass die Lineiden innerhalb der Heteronemertea abgeleitet sind, so behält *L. viridis* einen scheinbar nutzlosen Entwicklungsschritt bei. Da in dieser Zellschicht aber nahezu die Hälfte des im Ei mitgegebenen Dotters gelagert ist, ist dieser Entwicklungsmodus eine Möglichkeit, sich den Dotter zugänglich zu machen. Dieser gerät in die Epidermis aufgrund der annähernden Gleichverteilung des Dotters während der ersten äquatorialen Teilungen, die in nahezu allen untersuchten Arten, auch „Palaeonemertinen“, gleichgroße, zuweilen größere Mikromere als Makromere hervorbringen (Friedrich 1979). Für *Carinoma mutabilis* existieren entsprechend erste Hinweise, dass auch hier larvale Epidermiszellen abgestoßen und gefressen werden (unpubl.). Es wird zu prüfen sein, ob dieses Verhalten charakteristisch für alle Nemertinen ist und lediglich bei der Metamorphose des Pilidiums besonders spektakulär ausfällt. Völlig unabhängig davon ist jedoch eine freischwimmende Larve in das Grundmuster der Nemertinen einzusetzen. Nach den bisherigen Ergebnissen ist das die planuliforme Larve; die Pilidium-Larve vieler Heteronemertea ist apomorph, die planuliforme Larve der Hoplonemertea modifiziert.

5.3.3 Muskeldifferenzierung

Die Entwicklung der Muskulatur der Hetero- und Hoplonemertea ist als abgeleitet innerhalb der Nemertea zu betrachten. Als sekundäre Bildung der Ringmuskelschicht dürften die diagonalen Fasern von *Procephalothrix oestrymnicus* nicht homolog zu den diagonal verlaufenden Muskelsträngen von *L. viridis* oder *Paranemertes peregrina* ist. Die Position dieser Muskelschicht bei den genannten Arten ist zu unterschiedlich, um eine primäre Homologiehypothese zu formulieren. Das Schwestergruppenverhältnis dieser Taxa, wie es auf der Basis molekularer Daten von Thollesson & Norenburg (2003) aufgelöst wurde, wird von Daten zur Myogenese nicht unterstützt.

5.3.4 Augen

Struktur und Position der ersten larvalen Augen unterstützen die genannte Verwandtschaftshypothese (Abb. 1.1A). In der Entwicklung von Vertretern der Gruppen, die

im Taxon Neonemertea zusammengefasst werden, bilden sich rhabdomerische, subepidermale Augen als erste pigmentierte Photorezeptoren. Sie enthalten eine Vielzahl von Rezeptorzellen und werden in die Adultorganisation vollständig übernommen. Die Augen der untersuchten Palaeonemertea weisen neben offensichtlichen Unterschieden, wie der Anzahl der pigmentierten Augen, der Struktur des Augenbeckers und der an ihnen beteiligten Pigment- und Rezeptorzellen, signifikante Ähnlichkeit untereinander auf. Es handelt sich in beiden untersuchten Arten um intraepidermale, ciliäre Photorezeptoren, die aus nur wenigen Rezeptorzellen bestehen und nicht über das Larvenstadium hinaus persistieren. Sie sind damit sehr wahrscheinlich einander, aber nicht den Augen der Hoplo- und Heteronemertea homolog. Daher darf als sicher gelten, dass die subepidermalen rhabdomerischen Augen eine Autapomorphie eines Taxons Neonemertea darstellen (Abb. 1.1A).

5.3.5 Protonephridiale Kopfnieren

Die larvalen Protonephridien von *P. filiformis* und *C. mutabilis* erfüllen mit Ausnahme der komplex strukturierten terminalen Filterbereiche alle Kriterien für larvale Kopfnieren (sensu Hatschek 1878, 1886) bei den Trochozoa: sie sind aus wenigen Zellen aufgebaut und besitzen eine Nephroporuszelle, die den Übergang des transcytotischen Kanals zur Außenwelt vermittelt (Bartolomaeus & Quast 2005). Die Nierenorgane sind auf Höhe der Mundöffnung gelegen, und zumindest bei *C. mutabilis* repräsentiert das Paar larvaler Protonephridien nicht die adulten Nierenorgane. Bei *P. filiformis* ist die Persistenz der Protonephridien nicht gesichert, sie ist aber aufgrund der sehr frontalen Lage des Protonephridiums im Adultus wahrscheinlich (Bartolomaeus et al., eingereicht, siehe Anhang, Manuskript 7). Demgegenüber fehlen der Heteronemertine *L. viridis* (Bartolomaeus 1985) und der Hoplonemertine *P. peregrina* solche Kopfnieren. Diese Befunde stellen ebenfalls einen Hinweis auf eine gemeinsame Stammlinie von Hetero- und Hoplonemertinen dar, in der die larvalen Protonephridien reduziert oder wenigstens positional verändert wurden.

5.4 Phylogenetische Stellung der Nemertea

Aufgrund der Merkmalsverteilung und vorgeordneter Verwandtschaftshypothesen aus Analysen molekularer Daten ist deutlich geworden, dass die Merkmale der basal

abzweigenden „palaeonemertinen“ Taxa die ursprüngliche Ausprägung repräsentieren. Es ist daher unabdingbar, dass jegliche Diskussion über die phylogenetische Zugehörigkeit der Nemertea von diesen Taxa ausgehen muss. Die Zugehörigkeit der Nemertea zu den Spiralia ist aufgrund ihres stereotypen Furchungsmodus und den damit verbundenen typischen Zellschicksalen unbestritten (Henry & Martindale 1998, Martindale & Henry 1992, Maslakova et al. 2004a,b). Die Schwestergruppe der Nemertea innerhalb der Spiralia betreffend existieren verschiedene konkurrierende Verwandtschaftshypothesen.

5.4.1 Nemertea als Schwestergruppe der Plathelminthes

Wurden sie ursprünglich als Teilgruppe der Plathelminthes angesehen (Coe 1905), hält sich bis heute die Ansicht, dass, die Nemertea als eigenständiges hochrangiges Taxon die Schwestergruppe der Plathelminthes bilden (Nielsen 2001). Grundlage hierfür ist die Trochea-Theorie (Nielsen 1985), die sich auf eine allen Spiralia homologe planktische Larve und die weitgehend parenchymatische Organisation der beiden Gruppen bezieht. Letzteres wird als ursprünglicher Merkmalszustand der Bilateria diskutiert (Bartolomaeus 1993, Ax 1996) und ist danach keine Synapomorphie, die ein Schwestergruppenverhältnis unterstützt. Die Homologie der Larven der Polycladen und der Pilidien muss auch bezweifelt werden, da es sich hierbei um Neuerwerbungen innerhalb der Gruppen handelt (Jenner 2004). Es verbleibt als Synapomorphie lediglich das Fehlen von Chitin (Nielsen 2001). Dieses Negativmerkmal ist aufgrund vorgeordneter Verwandtschaftshypothesen bezüglich der basalen Metazoa nicht zur Unterstützung eines Schwestergruppenverhältnisses geeignet. Zu bewerten ist jedoch das Auftreten einer diagonalen Muskelschicht als eigenständige Entität innerhalb des Hautmuskelschlauchs der Plathelminthen (Hooge 2001) und die Entwicklung der Augen unterhalb und unabhängig der Epidermis (Cardona et al 2005, Morris et al 2004). Beide Merkmalsausprägungen lassen sich auch bei Vertretern der Nemertea finden, nämlich bei *P. peregrina* und *L. viridis*. Wie oben ausgeführt, stellen die Merkmale aufgrund der Innengruppenverhältnisse wahrscheinlich konvergente Neuerwerbungen in der Stammlinie der Neoneemertea (sensu Thollesson & Norenburg 2003) für die Augen, oder unabhängige Neuerwerbungen in beiden Teilgruppen dar (diagonale Muskulatur). Für die larvalen Augen und Muskelsysteme der basalen Nemertinentaxa kann, bezüglich dieser Strukturen in Plathelminthen, eindeutig keine primäre Homologiehypothese formuliert werden.

Die jüngste Verwandtschaftshypothese stellt ein Schwestergruppenverhältnis von Nemertea und Phoronida bzw. einem Taxon aus Phoronida und Brachiopoda auf (Dunn et al. 2008). Diese Annahme beruht auf der phylogenetischen Analyse von EST Daten von unter anderem *C. mutabilis* und *Cerebratulus lacteus* als Vertreter der Nemertinen und *Phoronis vancouverensis* Pixell, 1912 (Phoronida) sowie *Terebratalia transversa* (Sowerby, 1846) (Brachiopoda). Vom morphologischen Standpunkt findet sich keinerlei Unterstützung für eine solche Gruppierung. Phoroniden- und Brachiopodenlarven besitzen eine Muskulatur aus Epithelmuskelzellen (Lüter 2000, Bartolomaeus 2001) und weisen keine Augen auf. Während Larven der Brachiopoden keine Nephridien ausbilden, liegen diejenigen der Phoroniden caudal und somit in einer Position, die einer primären Homologiehypothese widerspricht.

5.4.2 Nemertea: eine Teilgruppe der Trochozoa oder deren Schwestergruppe?

Aufgrund der Merkmalsausprägungen bei den Nemertea erscheinen zwei mögliche Schwestergruppen gleich wahrscheinlich. Der einen Hypothese nach, die von Turbeville (1986, 1991) formuliert wurde, sind die Annelida die Schwestergruppe der Nemertea. Die andere Hypothese beruht auf Überlegungen von Ax (1996) und Bartolomaeus (1993) und stellt den Nemertea die Trochozoa als nächste Verwandte zur Seite. Dabei ist es unerheblich, ob ein Taxon Articulata existiert oder die Arthropoda ein Subtaxon der Ecdysozoa bilden, da es hier um die Merkmalsausprägung derjenigen basalen Gruppen geht, für die eine ausreichende Datenbasis für Vergleiche existiert, namentlich die Anneliden und Mollusken (larvale Augen: Bartolomaeus 1992a,b, Purschke et al. 2006; Nierenorgane: Bartolomaeus 1989, Bartolomaeus & Quast 2005; Myogenese: Haszprunar & Wanninger 2000, Hill & Boyer 2001, Wanninger & Haszprunar 2002, McDougall et al. 2006, Nielsen et al. 2007).

Die Hypothese der Annelida als Schwestergruppe der Nemertea hat zwei Wurzeln. Die eine ist die Gonocoel-Theorie (Goodrich 1945), die jedoch mittlerweile als widerlegt gelten kann (Bartolomaeus 1999), während die andere sich aus den Lageübereinstimmungen des endothelialisierten, lateralen Blutgefäßsystems mit den Coelomräumen der Anneliden speist (Ruppert & Carle 1983, Turbeville & Ruppert 1985, Turbeville 2002). Die von Turbeville (1986) gezeigten dezidierten Übereinstimmungen der Bildung der Blutgefäße bei *Prosorhochmus americanus* Gibson, Moore, Ruppert & Turbeville 1986 und der Coelomogenese von *Magelona* sp. sind jedoch zu bezweifeln (Bartolomaeus & Ruhberg 1999)

da sich bei Anneliden die gesamte somatische und viscerale Muskulatur aus dem Coelomepithel bildet, während wenigstens die Körperwandmuskulatur von *P. americanus* unabhängig gebildet wird. Es handelt sich bei dieser Art um einen Vertreter der Hoplonemertea, daher ist, insbesondere wenn die Daten zur Myogenese berücksichtigt werden, nicht zu erwarten, dass es sich hierbei um ein ursprüngliches Merkmal handelt. Insofern sind Daten zur Entstehung der lateralen Blutgefäße notwendig, um diese Hypothese bewerten zu können. Diese sind bei den planktotrophen Larven der meisten basalen Nemertinen aber schwer zu erhalten, da sich die Blutgefäße erst sehr spät ausbilden und die Aufzucht der Larven sich als limitierender Faktor darstellt. Über den Anteil der larvalen Muskulatur am adulten Muskelsystem kann daher auch nur spekuliert werden.

Bei kritischer Betrachtung der alternativen Theorie, wonach Nemertea und Trochozoa Schwestergruppen bilden, zeigt sich, dass die untersuchten Organsysteme in weiten Teilen Übereinstimmungen hinsichtlich der Merkmale bei den Nemertea zeigen. Bei Annelida bildet sich larval eine proximale Längsmuskelschicht aus, über der sich eine Ringmuskelschicht differenziert (Hill & Boyer 2001; McDougall et al. 2006). Ein ähnliches orthogonales Muskelgitter, wie es primär bei den untersuchten „Palaeonemertea“ gebildet wird, ist auch in den basalen Mollusken *Chaetoderma nitidulum* Lovén, 1844 (Caudofoveata) (Nielsen et al. 2007) sowie *Mopalia mucosa* Gould, 1846 und *Chiton olivaceus* Spengler, 1797 zu beobachten (Wanninger & Haszprunar 2002). Einzig die strukturelle Komplexität der terminalen Filterbereiche der larvalen Protonephridien bei Nemertea sowie der Rezeptorzelltyp der Augen von einigen Anneliden (rhabdomerisch) (Purschke et al. 2006) unterscheiden sich. Es ist aber anzumerken, dass die Merkmalspolarität der Augen in den Trochozoa problematisch ist (Purschke et al. 2006) und deren Grundmuster daher bisher nicht zweifelsfrei rekonstruiert wurde.

Die vorliegende Arbeit macht deutlich, dass die Stellung der Nemertea innerhalb der Spiralia nicht so basal ist, wie ihre acoelomate Organisation vermutet lässt (Nielsen 2001). Sie stellen mit Sicherheit nicht die Schwestergruppe der Plathelminthes dar, sondern zweigen später auf dem Ast der Spiralia ab. Ein Schwestergruppenverhältnis zu den Phoroniden (und Brachiopoden) (Dunn et al. 2008) ist ebenso kritisch zu bewerten. Es zeigen sich aufgrund der derzeitigen morphologischen Datenlage keinerlei übereinstimmende Strukturen, für die primäre Homologie-Hypothesen begründet werden könnten.

Sicher ist dagegen, dass die Nemertea in die nähere Verwandtschaft der Trochozoa gehören. Ob sie die Schwestergruppe der Trochozoa (Ax, 1996) oder der Annelida innerhalb der Trochozoa (Turbeville 1991) bilden, ist aufgrund der erhobenen Daten aber nicht zu entscheiden. Vergleichende Untersuchungen der Entwicklung des Gefäßsystems der basalen Nemertea im Vergleich mit derjenigen der Coelomräume der Annelida ist erforderlich, um eine Aussage über eine mögliche Homologie dieser Organe zu machen. Solange diese Daten fehlen, lassen sich die bisher vergleichend analysierten Merkmale am sparsamsten mit einem Schwestergruppenverhältnis zwischen Nemertea und Trochozoa erklären.

6 Zusammenfassung

Nemertea (Schnurwürmer) sind unsegmentierte, wurmförmige Spiraler, deren Monophylie aufgrund einer Reihe von Autapomorphien sicher begründet ist. Sie besitzen einen ausstülpbaren Rüssel, der in Ruhe in einem flüssigkeitsgefülltem Hohlraum liegt, ein ringförmiges Cerebralganglion, das sich statt um den Schlund um die Insertion des Rüssels legt, und ein mit einem Epithel ausgekleidetes laterales Gefäßsystem. Abgesehen davon gelten sie als merkmalsarm, was dazu geführt hat, dass sie als basale Spiraler gewertet und in Verwandtschaft mit den Plathelminthes gestellt wurden. Neuere Hypothesen sehen die Nemertea an der Basis der Trochozoa oder platzieren sie innerhalb der Trochozoa. Jede der formulierten Hypothesen lässt eine spezifische Merkmalskombination in der Ausbildung des Hautmuskelschlauches, der Nierenorgane und der pigmentierten Augen erwarten. Daten zu diesen Organsystemen sind bei Nemertinen, im Gegensatz zu den möglichen Schwestergruppen, nicht ausreichend vorhanden, um die genannten Verwandtschaftshypothesen zu bewerten. Insbesondere für die basalen Teilgruppen der Nemertea sind diese Daten nicht bekannt, wären aber für eine Evaluation der Merkmalspolarität von besonderer Relevanz. Zur Klärung der phylogenetischen Stellung der Nemertea innerhalb der Spiralia wurden die Entwicklung der pigmentierten Augen und der Muskulatur sowie die Ultrastruktur der Nierenorgane in Larven und Jungtieren von Vertretern der meisten hochrangigen Teiltaxa der Nemertea vergleichend untersucht. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Kenntnisse zur Biologie einer der häufigsten europäischen Nemertinen-Arten, *Lineus viridis*, erweitert und eine vergleichende Untersuchung zur Spermienmorphologie zur Klärung der Innengruppenverhältnisse bei den Nemertea durchgeführt. Deren Ergebnisse bestätigen aktuelle Hypothesen über die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Nemertea und erlauben eine Bewertung der konkurrierenden Verwandtschaftshypothesen zu anderen Spiralia. Aufgrund der neuen Daten kann ein Schwestergruppenverhältnis mit den Plathelminthes ausgeschlossen werden. Ob die Nemertea an die Basis der Spiralia, als Schwestergruppe der übrigen Trochozoa oder ein Teiltaxon der Trochozoa darstellen, ist in weiteren Untersuchungen zu klären. Die bisherigen Befunde lassen sich am sparsamsten durch ein Schwestergruppenverhältnis zwischen den Nemertea und den Trochozoa erklären.

7 Summary

Nemertea are unsegmented spiralian worms whose monophyly is undisputed due to various autapomorphic traits. They possess an eversible proboscis, a ring-shaped cerebral ganglion that surrounds the proboscis insertion instead of the pharynx, and an epithelialized vascular system. In other respects they are character-poor and thus have formerly been regarded as basal Spiralia with closest affinities to Platyhelminthes. More recent hypotheses place the Nemertea as sister taxon to or among the Trochozoa, putatively with closest relationship to annelids. Each of these hypotheses implies a distinctive combination of character traits concerning the formation of the body wall musculature, larval nephridia, and pigmented eyes. In contrast to other spiralian taxa, data on these character systems are largely missing in nemerteans, which hampered an evaluation of the phylogenetic hypotheses thus far. Especially in the basally branching "palaeonemertean" subtaxa, which are essential for determining character polarities, the relevant data are unknown. In order to clarify the phylogenetic position of Nemertea within the Spiralia, comparative studies on the above mentioned organ systems were conducted for most of the high-ranking subtaxa of the Nemertea. Additional studies on the reproductive biology of one of the most common European nemertean species, *Lineus viridis*, were complemented by a comprehensive survey on nemertean sperm ultrastructure. The latter contributed to a clarification of the ingroup relations of the Nemertea with new morphological support for topologies that yet were merely based on analyses of molecular data. Data obtained permit a discussion of the currently competing phylogenetic hypotheses on the phylogenetic position of the Nemertea. A sister group relationship to Platyhelminthes is unambiguously rejected by the new data. Whether nemerteans form the sister group to remaining Trochozoa or are more closely related to annelids still requires further studies. Presently the most parsimonious explanation for the observed character states in Nemertea is a sister group relationship to Trochozoa.

8 Literaturverzeichnis

- Ax, P. (1996): Multicellular animals. A new approach to the phylogenetic order in nature. Vol 1. Springer, Heidelberg.
- Bartolomaeus, T. (1984): Zur Fortpflanzungsbiologie von *Lineus viridis*. – Helgoländer Meeresuntersuchungen 38: 185-188.
- Bartolomaeus, T. (1985): Ultrastructure and development of the protonephridia of *Lineus viridis* (Nemertini). – Microfauna Marina 2: 61-83.
- Bartolomaeus, T. (1988): No direct contact between the excretory system and the circulatory system in *Prostomatella arenicola* Friedrich (Hoplonemertini). – Hydrobiologia 156: 175-181.
- Bartolomaeus, T. (1989): Larvale Nierenorgane bei *Lepidochiton cinereus* (Polyplacophora) und *Aeolidia papillosa* (Gastropoda). – Zoomorphology 108: 297-307.
- Bartolomaeus, T. (1992a): Ultrastructure of the photoreceptors in certain larvae of the Annelida. – Microfauna Marina 7: 191-214.
- Bartolomaeus, T. (1992b): Ultrastructure of the photoreceptors in the larvae of *Lepidochiton cinereus* (Mollusca, Polyplacophora) and *Lacuna divaricata* (Mollusca, Gastropoda). – Microfauna Marina 7: 215-236.
- Bartolomaeus, T. (1993): Die Leibeshöhlenverhältnisse und Verwandtschaftsbeziehungen der Spiralia. – Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft 86.1, 42
- Bartolomaeus, T. (2001): Ultrastructure and formation of the body cavity lining in *Phoronis mülleri* (Phoronida). – Zoomorphology 120: 135-148.
- Bartolomaeus, T. & Quast, B. (2005): Structure and development of nephridia in Annelida and related taxa. – Hydrobiologia 535/536:139-164.
- Bartolomaeus, T. & Ruhberg, H. (1999): Ultrastructure of the body cavity lining in embryos of *Epiperipatus biolleyi* (Peripatidae, Onychophora). – Invertebrate Biology 118: 165-174.
- Cantell C.-E. (1966): The devouring of the larval tissues during metamorphosis of pilidium larvae (Nemertini). – Arkiv För Zoologie 18: 480-493.
- Cantell C.-E. (1969): Morphology, development, and biology of the pilidium larvae (Nemertini) from the Swedish West Coast. – Zoologiska Bidrag Från Uppsala 38: 61-111.
- Cantell C.-E. (1972): Studies on the morphology, taxonomy, and larval development of heteronemertines (Nemertina). – Acta Universitatis Uppsala 218: 1-7.

- Cardona A., Hartenstein V. & Romero R. (2005). The embryonic development of the triclad *Schmidtea polychroa*. – *Development, Genes and Evolution* 215: 109-131
- Coe, W. R. (1899): On the development of the pilidium of certain nemerteans. – *Transactions of the Connecticut Academy* 10: 235-262.
- Coe, W. R. (1905): Nemerteans of the west and northwest coasts of America. – *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College* 47: 1-318.
- Coe, W. R. (1943): Biology of the nemerteans of the Atlantic Coast of North America. – *Transactions of the Connecticut Academy* 35: 129-328.
- Dunn, C. W., Hejnol, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A., Seaver, E., Rouse, G. W., Obst, M., Edgecombe, G. D., Sørensen, M. V., Haddock, S. H. D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R. M., Wheeler, W. C., Martingale, M. Q. & Giribet, G. (2008): Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. – *Nature* 452: 745-749.
- Friedrich, H. (1979): Nemertini. – In: F. Seidel (ed.) *Morphogenese der Tiere*, Vol. 3, D5-1. Jena, Gustav Fischer. Pp 1-136.
- Gibson, R. (1972): *Nemerteans*. London, Hutchinson. Pp 1-224.
- Gibson, R. (1995): Nemertean genera and species of the world: an annotated checklist of original names and description citations, synonyms, current taxonomic status, habitats and recorded zoogeographic distribution. – *Journal of Natural History* 29: 271-562.
- Giribet, G. & Wheeler, W.C. (2002): On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. – *Invertebrate Biology* 121: 271-324.
- Gontcharoff, M. (1951): Biologie de la régénération et de la reproduction chez quelques Lineidae de France. – *Annales des Sciences Naturelles, Série 11*, 13: 149-235.
- Gontcharoff, M. (1960): Le développement post-embryonnaire et la croissance chez *Lineus ruber* et *Lineus viridis* (Némertes Lineidae). – *Annales des Sciences Naturelles, Série 12*, 2: 225-279.
- Goodrich, E. S. (1945): The study of nephridia and genital ducts since 1895. – *Quarterly Journal of microscopical Science* 86: 113-301, 303-392.
- Härlin, M. (1998): Tree-thinking and nemertean systematics, with a systematization of the Eurentantia. – *Hydrobiologia* 365: 33-46.
- Härlin, M. & Härlin, C. (2001): Phylogeny of the eurentantic nemerteans revisited. – *Zoologica Scripta* 30 (1): 49-58.

- Härlin, M. & Sundberg, P. (1994): Cladistic analysis of the eureptantic nemerteans (Nemertea: Hoplonemertea). – *Invertebrate Taxonomy* 9 (6): 1211-1229.
- Haszprunar, G. & Wanninger, A. (2000): Molluscan muscle systems in development and evolution. – *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 38: 157-163.
- Hatschek, B. (1878): Studien über die Entwicklungsgeschichte der Anneliden. – *Arbeiten aus dem Zoologischen Institut der Universität Wien und der Zoologischen Station Triest* 1: 277-404
- Hatschek, B. (1886): Zur Entwicklung des Kopfes von *Polygordius*. – *Arbeiten aus dem Zoologischen Institut der Universität Wien und der Zoologischen Station Triest* 6: 109-210.
- Henry, J. J. & Martindale, M. Q. (1998): Conservation of the spiralian developmental program: cell lineage of the nemertean, *Cerebratulus lacteus*. – *Developmental Biology* 201: 253-269.
- Hill, S. D. & Boyer, B. C. (2001): Phalloidin labeling of developing muscle in embryos of the polychaete *Capitella* sp. I. – *Biological Bulletin* 201: 257-258.
- Hooge, M. D. (2001): Evolution of body-wall musculature in the Platyhelminthes (Acoelomorpha, Catenulida, Rhabditophora). – *Journal of Morphology* 249: 171-194.
- Iwata, F. (1960): Studies on the comparative embryology of nemerteans with special reference to their interrelationships. – *Publications of the Akkeshi Marine Biological Station* 10: 1-51.
- Jenner, R. A. (2004): Towards a phylogeny of the Metazoa: evaluating alternative phylogenetic positions of Platyhelminthes, Nemertea, and Gnathostomulida, with a critical reappraisal of cladistic characters. – *Contributions to Zoology* 73 (1-2): 3-163.
- Lüter, C. (2000): The origin of the coelom in Brachiopoda and its phylogenetic significance. – *Zoomorphology* 120:15-28.
- Martindale, M. Q. & Henry, J. Q. (1992): Evolutionary changes in the program of spiralian embryogenesis: fates of early blastomeres in a direct-developing nemertean worm. – *American Zoologist* 32: 79A.
- Maslakova, S. A., Martindale, M. Q. & Norenburg, J. L. (2004a): Fundamental properties of the spiralian developmental program are displayed by the basal nemertean *Carinoma tremaphoros* (Palaeonemertea, Nemertea). – *Developmental Biology* 267: 342-360.
- Maslakova, S. A., Martindale, M. Q. & Norenburg, J. L. (2004b): Vestigial prototroch in a basal nemertean *Carinoma tremaphoros* (Palaeonemertea, Nemertea). – *Evolution & Development* 6 (4): 219-226.

- McDougall, C., Chen, W., Shimeld, S.M & Ferrier D., E., K. (2006) The development of the larval nervous system, musculature and ciliary bands of *Pomatoceros lamarckii* (Annelida): heterochrony in polychaetes. - *Frontiers in Zoology* 2006: 3:16
- Morris J, R Nallur, P Ladurner, B Egger, R Rieger & V Hartenstein (2004) The embryonic development of the flatworm *Macrostomum sp.* – *Development, Genes & Evolution* 214: 214-220
- Nielsen, C. (1985): Animal phylogeny in the light of the trochaea theory. – *Biological Journal of the Linnean Society* 25: 243-299.
- Nielsen, C. (2001): *Animal Evolution. Interrelationships of the living phyla.* Second edition. Oxford, Oxford Univ. Press.
- Nielsen, C., Haszprunar, G., Ruthensteiner, B. & Wanninger, A. (2007): Early development of the aplousobranchian mollusc *Chaetoderma*. – *Acta Zoologica (Stockholm)* 88: 231-247.
- Nordhausen, W. (1988): Impact of the nemertean *Lineus viridis* on its polychaete prey on an intertidal sandflat. – *Hydrobiologia* 156: 39-46.
- Norenburg, J. L. & Roe, P. (1998): Reproductive biology of several species of recently collected pelagic nemerteans. – *Hydrobiologia* 365: 73-91.
- Nusbaum, J. & Oxner, M. (1913): Die Embryonalentwicklung des *Lineus ruber* Müll. Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Nemertinen. – *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 107: 78-197.
- Purschke, G., Arendt, D., Hausen, H. & Müller, M. C. M. (2006): Photoreceptor cells and eyes in Annelida. – *Arthropod Structure and Development* 35: 211-230.
- Roe, P. (1967): Studies on the food and feeding behavior of the nemertean *Paranemertes peregrina*. M. Sc. Thesis, University of Washington. 44 pp.
- Roe, P. (1970): The nutrition of *Paranemertes peregrina* (Rhynchocoela: Hoplonemertea). I. Studies on food and feeding behavior. – *Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, 139: 80-91.
- Roe, P. (1976): Life history and predator-prey interactions of the nemertean *Paranemertes peregrina* Coe. – *Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, 150: 80-106.
- Roe, P. (1979): A comparison of aspects of the biology of *Paranemertes peregrina* (Nemertea) from Bodega Harbor, California, and Washington State. – *Pacific Science*. 33: 281-287.
- Ruppert, E. E. & Carle, K. J. (1983): Morphology of metazoan circulatory systems. – *Zoomorphology* 103: 193-208.

- Salensky, W. (1912): Morphogenetische Studien an Würmern. II. Über die Morphogenese der Nemertinen. I. Entwicklungsgeschichte der Nemertine im Innern des Pilidiums. – Zap. imp. Akad. Nauk, Ser. 8, 30: 1-74.
- Schmidt, G. A. (1964): Embryonic development of littoral nemertines *Lineus desori* (mihi, species nova) and *Lineus ruber* (O. F. Mülleri, 1774, G. A. Schmidt, 1945) in connection with ecological relation changes of mature individual. – Zoologica Poloniae 14: 75-122.
- Schwartz, M. L. & Norenburg, J. L. (2001): Can we infer heteronemertean phylogeny from available morphological data? – Hydrobiologia 456: 165-174.
- Sundberg, P., Turbeville, J. M. & Lindh, S. (2001): Phylogenetic relationships among higher nemertean (Nemertea) taxa inferred from 18S rDNA sequences. – Molecular Phylogenetics and Evolution 20 (3): 327-334.
- Thollesson, M. & Norenburg, J. L. (2003): Ribbon worm relationships: a phylogeny of the phylum Nemertea. – Proceedings of the Royal Society London B 270: 407-415.
- Turbeville, J. M. (1986): An ultrastructural analysis of coelomogenesis in the hoplonemertine *Prosorhochmus americanus* and the polychaete *Magelona* sp. – Journal of Morphology 187: 51-60.
- Turbeville, J. M. (1991): Nemertinea. – In: Harrison, F. W. & Bogitsh, B. J. (eds) Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 3: Platyhelminthes and Nemertinea. New York, Wiley Liss., pp. 285-328.
- Turbeville, J. M. (2002): Progress in nemertean biology: development and phylogeny. – Integrative and Comparative Biology 42: 692-703.
- Turbeville, J. M. & Ruppert, E. E. (1985): Comparative ultrastructure and the evolution of nemertines. – American Zoologist 25: 53-71.
- Wanninger, A. & Haszprunar, G. (2002): Muscle development in *Antalis entails* (Mollusca, Scaphopoda) and its significance for scaphopod relationships. – Journal of Morphology 254: 53-64.
- Wilson, C. B. (1900): The habits and early development of *Cerebratulus lacteus* (Verrill). – Quarterly Journal of microscopical Science 43: 97-198.