

Anhang

1. Abkürzungen

α -	anti-
Ac	Acetat
AD	Aktivierungsdomäne
ade	Adenin
AK	Antikörper
amp	Ampicillin
ARP	Atonal related Protein/s
AS	Aminosäure
AS-C	Achaete/Scute-Complex
3 AT	3-Amino-1,2,4,-triazol
b	basic; (basische DNA-Interaktionsdomäne Domäne des bHLH-Motives)
BD	DNA- Interaktionsdomäne
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
blastX	Algorithmus zur Suche nach Sequenzhomologien in allen 6 Leserahmen ausgehend von einer Nukleotidsequenz
bp	Basenpaare
BrdU	Brom-desoxy-Uridin
BSA	Rinderserumalbumin
Bz	Batteriezell
Cad	Cadherin
Cad-EXD	extrazelluläre Domäne von Cadherin
Cad-ICD	intrazelluläre Domäne von Cadherin
cam	Chloramphenicol
CBP	<i>c-AMP- Respond Element Binding Protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C. elegans/ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
ch	<i>chicken</i> , Huhn
CHO	<i>chondrotonal organ</i>
CPD	cytoplasmatische Domäne
Da	Dalton ($1,6605 \cdot 10^{-24}$ g)
De	Desmoneme
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr	Drüsenzelle
dr	<i>Danio rerio</i>
dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
dNTP	desoxy-Nucleotidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESO	<i>external sensory organ</i>
E-Value	Wahrscheinlichkeitswert einer zufälligen Übereinstimmung von Sequenzen
FB	<i>final bleed</i> ; Serum nach 4 Immunisierungen am Tag 87
GAL	β -Galactosidase
GAL4-AD	Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4
GAL4-BD	DNA-Interaktionsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4
GOF	gain of function-mutation
HEK 293 EBNA	Humane embryonale Nierenzelllinie
His/H	Histidin
HIS3	Reportersystem des Hefe-TH-Systems, ermöglicht bei Interaktion Wachstum auf Histidin-freiem Medium
HM	Hydramedium

HRP	Meeretiichperoxidase
-HWLU	ohne Histidin, Tryptophan, Leucin und Uracil
hy	Hydra
HyCad-ICD	Hydra Cadherin, Intrazelluläre Domäne
HyCad-EXD	Hydra Cadherin, Extrazelluläre Domäne
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyramosid
Ir	Isorhize
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
I-Zelle	interstitielle Stammzelle
kb	Kilobasen (10^3 Base-n)
LB-Medium	Lurea Bertani-Medium
LB	<i>large bleed</i> ; Serum nach 4 Immunisierungen am Tag 66
Leu/L	Leucin
LOF	loss of function-mutation
lys	Lysin
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NBM	Nematocyten-Batteriezell-Mesogloea-Komplex
Ne	Nest
NemDP	Nematocytendifferenzierungsweg
Ngs	<i>natural goat serum</i> ; Ziegenserum
NvDP	Nervenzelldifferenzierungsweg
Nt	NucleotidO
Nv	Nervenzelle
OD	optische Dichte
ON	<i>over night</i>
pAD	<i>Two Hybrid</i> Vektor; „Zielvektor“ (<i>Prey</i> -Vektor)
pAD::SAII	<i>Two Hybrid</i> Zielvektor mit Hydra cDNA-Insert
pBD	<i>Two Hybrid</i> Ködervektor (<i>Bait</i> -Vektor)
pBD::DA	<i>Two Hybrid</i> Zielvektor mit <i>Daughterless</i> Insert
pCEP-Pu-His/Myc	Vektor zur rekombinanten Expression in HEK Zellen
pCEP-Pu::LiAS	Vektor zur rekombinanten Expression von LiAS in HEK Zellen
pGemt	Standard-TA-Klonierungsvektor
pPET-19b	Vektor zur bakteriellen Expression in Bakterien
pPET-19b::LiAS	Vektor zur rekombinanten Expression von LiAS in Bakterien
RT	Raumtemperatur
SAII	<i>Hydra vulgaris</i> cDNA-Two Hybrid-Bibliothek
SB	<i>small bleed</i> ; Serum nach 3 Immunisierungen am Tag 38
SD	Hefe-Selektivmedium
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
St	Stenotele
tet	Tertracyclin
THS	<i>Two Hybrid Screen</i> ; genetisches Screening Verfahren nach Protein-Proteininteraktionspartnern
Trp (W)	Tryptophan
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
Ura/U	Uracil
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
Verti/-s	Vertikal zu anti-Cad-ICD-positiven Axonen orientierte Stenotelen
W (Trp)	Tryptophan
-WLU	ohne Tryptophan, Leucin und Uracil
w/o	<i>without</i> , ohne
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
XL1bue	Bakterienstamm
XL0LR	Bakterienstamm
YLP	Hefe-Lysis-Puffer

2. Angaben aus dem THS Bank-Datenblatt

Bei der verwendeten cDNA-Bibliothek handelte es sich um eine selbstplifizierende *Hybri ZAP 2.1. custom cDNA library* der Firma Stratagen, die als SAll bezeichnet wurde (Hobmayer *et al.*, 2001)

Organismus:	<i>Hydra vulgaris</i>
Primer :	Oligo dT
Insertgröße :	>0,4 kb
Cloning Site:	<i>EcoRI</i> und <i>Xho I</i>
geschätzter Hintergrund:	1% nicht Rekombinante
geschätzter Titer (unamplif.):	3x10 ⁶ pfu/ml; 7,4x10 ⁶ pfu/ml; 9,2x10 ⁶ pfu/ml
geschätzter Titer (amplif.) :	1,8x10 ¹⁰ pfu/ml (entspr. 10 ⁶ Rekombinanten)
durchschnittliche Insertgröße:	1,5 kb
Insertgrößenbereich:	0,8 kb bis 2,8 kb

3. Sequenz- und Vektordaten

Die entsprechenden Vektorkarten wurden soweit möglich den Firmen Webseiten entnommen oder entsprechen den verfügbaren Sequenzen mit dem Programm „pDRAW32“ erstellt (<http://www.acaclone.com>).

Plasmid	Charakteristik	Wirt	Referenz
<i>pGEMT</i>	amp ^R	XL1 blue	Promega
<i>pBlueSkript</i>	amp ^R	XL1 blue	Stratagene
<i>pAD-GAL4-2.1</i>	amp ^R	YRG2/XL1-blue/XL0LR	Stratagene
<i>pBD-GAL4</i>	cam ^R	YRG2/XL1-blue/XL0LR	Stratagene
<i>pET19b</i>	amp ^R	BL21DE3	Novagen
<i>pCEP-Pu</i>	amp ^R	HEK 293	Invitrogen
<i>pAD::SAll</i>	<i>Hydra vul.</i> Insert	YRG2/XL1-blue/XL0LR	Hobmayer <i>et al.</i> (2001)
<i>pBD::DA</i>	Ködervektor	YRG2/XL1-blue/XL0LR	Müller <i>et al.</i> , 2003

Tab. A1: Verwendete Vektoren (Details siehe Text)

3.1. Primersequenzen

5' LiAS pCep-Pu	: CCGGCTAGCCATGACAAGCACATACAC
3' LiAS pCep-Pu (rc)	: GGCGGATCCTTAATTTTCTACGTCAATGTCAT
5'LiAS_Nde1	: AAGCATATGACAAGCACATACAC
3'LiASBamh1Stop(rc)	: CATGGATCCTTAATTTTCTAGTCA
5' hy_AS-C3	: ATGGTGGTTATGACTCCAAATATG
3' hy_AS-C3(rc)	: ACTGAAGCTATGGTGAGTAAATTTTA
5'hy_Ath-a	: ATGGGCTATAATTCAAATGACGAA
3'hy_Ath-a (rc)	: TTAATTCTTATATTTATCTTGATAGTTTAAAAAC

5'hy_Ngn : ATGGATCCTAAAAATAGGGGAA
 3'hy_Ngn (rc) : TTACATTTCAAAAAAGTTATTGCTAACAG

 5'hy_ND : ATGAAGATGCCAGCCTGT
 3'hy_ND (rc) : AGATCTTATCAGGTAGAGATTAG

 5'hy_NATO/p48 : ATGATAAATATGGCGATGCATGAAAAT
 3'hy_NATO/p48 (rc) : TTATTTATAGTAAAAGTCATCTTTTCCCAT

 5'hy_Scleraxis : ATGTCATATAACATTGAACCATCTC
 3'hy_Scleraxis (rc) : CTAACGCTGGTTTAGTGATCTTA

 5'LiASbHLH : CCAGAATTCATTCGCAAAAAGAAAAT
 3'LiASbHLH (rc) : ACCCTGCAGTTAGTAGTTAATGGC

 5' GeneRacer ext : GGTGTTCTCTGAACAACCTGGTTGATCGTAGTC
 5' GeneRacer int. : GGCAGATACGACAAACCATTGCCGTCTGTG

3.2. Sequenzdaten der neu identifizierten bHLH- Gene

In den folgenden Sequenzdaten der neu identifizierten bHLH-Fktoren wurde die entsprechende Proteinsequenz unterhalb der Nucleotidsequenz abgebildet und das konservierte bHLH Motiv jeweils schwarz unterlegt.

3.2.1. Hydra LiAS

```

1 ATGACAAGCA CATAACATA TACCACAGAC GGCAATGGTT TGTCGTATCT
  M T S T Y T Y T T D G N G L S Y L      Frame 1
51 GCCTTATGAC GTATACAATT GTGTTTCATC TCCTACAGAC AACTTTTGTA
  P Y D V Y N C V S S P T D N F C I      Frame 1
101 TTGATGCTGG TTTATTAGAC TACGATCAAC CAGTTGTTCA GAGAACACCA
  D A G L L D Y D Q P V V Q R T P      Frame 1
151 ATTGATAACT GGGTTATAAC AAACATTAAC CCAAACCTCGT ACAACAACGG
  I D N W V I T N I N P N S Y N N G      Frame 1
201 AATTAAC TTT AGTGT TTTGA CATATCCGTA CTTACATGAT TATGGCGAGC
  I N F S V L T Y P Y L H D Y G E P      Frame 1
251 CAGGTTTCAT TCGCAAAAGA AATGAACGAG AAAGAATGAG AGTTCGGAAT
  G F I R K R N E R E R M R V R N      Frame 1
301 GTTAATGAAG GTTATGCTCG TCTTAGAGAC CATTGCCCC TTGAACCAA
  V N E G Y A R L R D H L P L E P N      Frame 1
351 CGAAAAAGA CTTTCAAAG TTGAGACACT CCGAGGAGCC ATTAAC TACA
  E K R L S K V E T L R G A I N Y I      Frame 1
401 TTAAGCTTCT GCAAGATATT TTAGAAAAAT CTTCAAAGT TGATAAAAAA
  K L L Q D I L E K S S K V D K K      Frame 1
451 ACAAACTTAT ACGAAAAGAA ACTGAATGAA GAAACAAATG ACATTGACGT
  T N L Y E K K L N E E T N D I D V      Frame 1
501 AGAAAAT TAA
  E N *      Frame 1
  
```

3.2.2. Hydra AS-C3

51 AAGCAATGAA GAAACAAAAA AGAAAGTGGa ACTTGAAATT AAAAATGAAA
S N E E T K K K V E L E I K N E N Frame 1

101 ATTTAAAGCC CGAGGTTTTT GAAACGTTTT TACCGACAAC GATTAGTTAC
L K P E V F E T F L P T T I S Y Frame 1

151 CACTCGAATT GTTTACCAGA CGCGATTTTT CTTACGACGT CCAACGGTCA
H S N C L P D A I F L T T S N G Q Frame 1

201 GTTAATCACA ACATCTACAA TAAATTACTC AATATTTTTG ACAGACATTA
L I T T S T I N Y S I F L T D I T Frame 1

251 CTTCCTCATC CGTTACAAAC AAACAAGAAA CTAAAAAGA TAAAGACGAG
S S S V T N K Q E T K K D K D E Frame 1

301 GAACATCTTA TAGCTGCAGC TGCGACGCCA TCTGCAAGTC AACTGTGTTC
E H L I A A A A T P S A S Q L C S Frame 1

351 ATCTGCAACG AGCAAAGAAG AAAACATATT CTCACCAAAG TTTCATTTTT
S A T S K E E N I F S P K F P F L Frame 1

401 TAACAACAAG TTCACAAAGC GATAACAACA TTACAAAAAC ATTTGCTCCA
T T S S Q S D N N I T K T F A P Frame 1

451 GTTTCAGTT TATCCAATCC ATTACTTGCA CGAACCTTG CAATACCCAT
V F S L S N P L L A P N L A I P I Frame 1

501 TTACAACACT CAGCCAATA CTACAGGTGT TGGTGATTCT TTTAAAAATA
Y N T Q P T T T G V G D S F K N I Frame 1

551 TATTTGTTAC TACACCACAA GCAAACCAA ACCCTTCTAA ATCTAAAGAA
F V T T P Q A K P N P S K S K E Frame 1

601 TCAGGTAAct CAGAGAGTGA CAGCCATAAT ATGGCAACTT CACGGGGCAG
S G N S E S D S H N M A T S R G R Frame 1

651 AAAACGTACT GCTCAATCTC GTTTGCCAGC TAAACTTAAA GAACCAGCGG
K R T A Q S R L P A K L K E P A A Frame 1

701 CAGTTGCACG CAGAAATGCA CGTGAAAGAA GACGCGTAAA AATGGTTAAT
V A R R N A R E R R R V K M V N Frame 1

751 GATGGCTTTT TAAGATTGCG AAGACATGTT CCGACTGATC CTAAAAACAA
D G F L R L R R H V P T D P K N K Frame 1

801 AAAGCTATCT AAAGTTAAAA CACTTCGTTT AGCAATAGAG TATATTCATC
K L S K V K T L R L A I E Y I H H Frame 1

851 ATTTGCAACA CTTACTCCAA GTTGACAATT GTTCTCAACA AACTCTGCAA
L Q H L L Q V D N C S Q Q T L Q Frame 1

901 TTAGTTGCAA ATATTTCTCA AGTGTCTTCA TTCGATGACA TAGACGGTGG
L V A N I S Q V S S F D D I D G G Frame 1

951 GAATGCATGG CTGAACACTG AAGCTATGGT GAGTAAATTT TAA
N A W L N T E A M V S K F * Frame 1

3.2.3. *Hydra Ath-a*

1	ATGGGCTATA	ATTCAAATGA	CGAACGTGCT	CCAAAAACCTG	TTTATAAAAT	
	M G Y N	S N D	E R A	P K T V	Y K I	Frame 1
51	TGAACAGAG	GAATAGAAG	TTAACAAGA	GATGAGTAAA	GAATACAAAA	
	E T E	E I E V	K Q E	M S K	E Y K K	Frame 1
101	AGAGAAGAAA	AGCCATAAAC	CGTGAAGATG	CAGATTCAAA	TAATCGATCA	
	R R K	A I N	R E D A	D S N	N R S	Frame 1
151	AACGAAAATG	TATCCCCTTT	AGCGGACACT	TCAATAAAAG	AGAAAAAAT	
	N E N V	S P L	A D T	S I K E	K K I	Frame 1
201	AACATTGAAC	GAAAAAATG	ATTATCAGCG	AAAACGTAGT	AACTTAATA	
	T L N	E K N D	Y Q R	K R S	K L N N	Frame 1
251	ATATTCTTTT	TCGATTGGAA	AAGAGAAAGA	AAACAGAAAA	CACTCATGAA	
	I L F	R L E	K R K K	T E N	T H E	Frame 1
301	AAATTAAGAA	CAGAAATTAA	GGAGCTTGAT	GAAAAACCTC	ATGAACAAGA	
	K L R T	E I K	E L D	E K L H	E Q D	Frame 1
351	CAAACCAAAT	CAAATATAT	TTAAGAAAAG	AAAGAATACA	AATAAAAATA	
	K P N	Q N I F	K K R	K N T	N K N S	Frame 1
401	GTGAAAGTAA	AGAGCATGAA	CAAAGGTTT	CACAAATACA	ACGCCGTCTT	
	E S K	E H E	Q K V S	Q I Q	R R L	Frame 1
451	GTTGCAAACG	CAAGGGAACG	GTCACGCGTT	CATGCTTTAA	GTAATGCGTT	
	V A N A	R E R	S R V	H A L S	N A F	Frame 1
501	TAATTTGTTA	AGAACGTCTA	TACCTAGTTA	TTCACCGGAA	CAAAAACCTT	
	N L L	R T S I	P S Y	S P E	Q K L S	Frame 1
551	CAAACTAAC	GATTCTCAGA	GTTGCTATAA	ACTATATTAG	CGCACTTGAG	
	K L T	I L R	V A I N	Y I S	A L E	Frame 1
601	GAGATTTTGA	ACGATAATCC	TTCAATTCAT	AATTTTGCTG	GATTTGTTGA	
	E I L N	D N P	S I H	N F A G	F V D	Frame 1
651	TGAATGCACG	TGTATATTGC	AGACAGAATA	TGGAAGGTCC	AAGTTTTTAA	
	E C T	C I L Q	T E Y	G R S	K F L N	Frame 1
701	ACTATCAAGA	TAAATATAAG	AATTAA			
	Y Q D	K Y K	N *			Frame 1

3.2.4. *Hydra Ngn*

1	ATGGATCCTA	AAAATAGGGG	AACAAATGAA	GAAAATATAC	CTTCTCGTGT	
	M D P K	N R G	T N E	E N I P	S R V	Frame 1
51	TAAAAGAATT	ATAGACGCAG	ATGAAGAAAA	TATACCTTCT	CGAGTTAAAA	
	K R I	I D A D	E E N	I P S	R V K R	Frame 1
101	GAATATAGA	TACAAATGGC	CGAAAAGAC	GTATATATAG	TATTATACAT	
	I I D	T N G	R K R R	I Y S	I I H	Frame 1
151	CAAGATCCTA	AACAAAGTTG	TCGTGATTC	CGTGCAAACG	ACCGCGAAAG	
	Q D P K	Q S C	R R F	R A N D	R E R	Frame 1
201	ACATCGTATG	AACTCTTTGA	ATGGCGGCT	GCAGACATTA	AAACGATGTG	
	H R M	N S L N	G A L	Q T L	K R C V	Frame 1
251	TTCCTTTATA	TCATGGAAAA	AGAAGAGTTA	CAAACTACA	AATTTTACAG	
	P L Y	H G K	R R V T	K L Q	I L Q	Frame 1
301	TTTGCTTGTC	ATTATATAAG	CGATCTCTCG	GATATTTTGT	GCAACCCAAA	
	F A C H	Y I S	D L S	D I L C	N P N	Frame 1
351	TTCATTACAT	GACTCGTTTG	AAGATAATCG	TAATTCCAG	ATAAGTTCTT	
	S L H	D S F E	D N R	N S Q	I S S L	Frame 1
401	TAATAAATAT	GATGAAATA	CGTTCATCAG	AAGGATTTTC	AGCAACTTCA	
	I N M	M E I	R S S E	G F S	A T S	Frame 1
451	AATCAATCAT	TGATAGAAAG	AATGGATTTT	TTAACGTGTA	ATACGATTAA	
	N Q S L	I E R	M D F	L T C N	T I N	Frame 1
501	CATGTTTTCG	GATGTAAGTA	TGTTCCATC	ATCACACATA	TACCCAATAG	
	M F S	D V S M	F P S	S H I	Y P I V	Frame 1
551	TTAATATTCC	TCAATGCACT	GTTAGCAATA	ACTTTTTTGA	AATGTAA	
	N I P	Q C T	V S N N	F F E	M *	Frame 1

3.2.5. *Hydra NeuroD*

1 ATGAAGATGC CAGCCTGTCA ACCTTTAGGA GAAAATGATA ATTCAAATTG
M K M P A C Q P L G E N D N S N C Frame 1

51 TTTATGTCCT TCACCTACCA CTTCAGAAGA AAGTTTACCG CACAAATCAC
L C P S P T T S E E S L P H K S L Frame 1

101 TACATGGAAA AGTGGACCGA TCCAAACGTT TAAAGGCAAG CGCAAGAGAA
H G K V D R S K R L K A S A R E Frame 1

151 CGAAGACGGC GTCATGTTTT AAATGATGCT CTTGAAAATC TTCGGAGAAA
R R R R H V L N D A L E N L R R K Frame 1

201 AGTTCCCGTC ATCAATGAAA AATCAAAAACA TAAGCTTTC AAGATTGAGG
V P V I N E K S K H K L S K I E V Frame 1

251 TTTTAAGAAT GGCAATTGAT TATATTGCTA TGCTAAGCTA TTA^{CT}TGGAA
L R M A I D Y I A M L S Y Y L E Frame 1

301 TGCTCCTCAT TACCAGAATA CGATCTTTC ACGGAAATCC GGCAACGAAA
C S S L P E Y D L S T E I R Q R N Frame 1

351 TTATGGCGTA ACCTTGAATA AATTCAGTGA AGAACACATA ATTCATTAC
Y G V T L N K F S E E H I I S L Q Frame 1

401 AGAACTTGAG ATCTTATCAG GTAGAGATTT AG
N L R S Y Q V E I * Frame 1

3.2.6. *Hydra NATO/p48*

1 ATGATAAATA TGGCGATGCA TGAAAATATT AACTACAATT CCCAGAGCAA
M I N M A M H E N I N Y N S Q S N Frame 1

51 TCAATATGAA CCAGGAGTTC ATTATTTTTC ATGTAACAA ATCAAATCTA
Q Y E P G V H Y F S C K Q I K S T Frame 1

101 CTTTGAAACA TAATAAAAAA ACAAGTCATA AGCAGTACGA CTCTGCATAT
L K H N K K T S H K Q Y D S A Y Frame 1

151 GCGCGGACTC GGTCAGCAGC AAAC^{TT}TCGT GAGCGTCGGC GGATGCAATG
A R T R S A A N F R E R R R M Q C Frame 1

201 TTTAAATGAA GCATTTGAAG GGCTTCGAAC TCATATTCCA TCATTGCCAT
L N E A F E G L R T H I P S L P Y Frame 1

251 ACGAGAAAAG ATTGTC^{CAA}A ATAGACACGT TGAAACTGGC TATCTCTTAC
E K R L S K I D T L K L A I S Y Frame 1

301 ATTCAATTTT TAGCTGACTT AATTAAAGAC GATGAAGAAA AGAAAAGAGT
I Q F L A D L I K D D E E K K R V Frame 1

351 TTCCAGCTCT TCAACAAATC AAAATCCGGA AAAAATATTG ATATATAACA
S S S S T N Q N P E K I L I Y N T Frame 1

401 CTTCCATAGG TAATCTTGTT TTATTTATTA ATCTTATTTT TGAAGAAAAT
S I G N L V L F I N L I F E E N Frame 1

451 TATTTTATTA GAAACTAGG TGCAAAATGG CGGATGGGAA AAGATGACTT
Y F I R K L G A K W R M G K D D F Frame 1

501 TTA^{CT}TATAAA TAA
Y Y K * Frame 1

3.2.7. *Hydra Scleraxis (hyScl)*

1 ATGTCATATA ACATTGAACC ATCTCAAAAA TGCAATTTTG ATGAACTATC
 M S Y N I E P S Q K C N F D E L S Frame 1

51 TGAGTATCAA AAAGTAGACC AACCAAATCA ATTAAATGAA GGAATAAATC
 E Y Q K V D Q P N Q L N E G L N L Frame 1

101 TATTCCGAAA CACTGCAAAC CGTAAAAGAC ATCTTTCGTT TAATGATGAA
 F R N T A N R K R H L S F N D E Frame 1

151 AATATTTCACT TTAAAAACAA AACAAACTGT CCCTCAAGTG GTTTTCACCA
 N I H F K N K T N C P S S G F H Q Frame 1

201 GACAATATAC AACTTTCAAC AGTGTAAATAT AGACTCCAGC GCCGAAAATT
 T I Y N F Q Q C N I D S S A E N S Frame 1

251 CTACATTACT TTACTTACGT CAAGTCAACA TCAAAGAGCG CTCTCGTTCT
 T L L Y L R Q V N I K E R S R S Frame 1

301 CATAGCGTAA ACGACGCTTT TACTCACCTT CGTACATTAA TTCCCACTGA
 H S V N D A F T H L R T L I P T D Frame 1

351 TCCACCGAGC AGAAAACCTT CTAAAATAGA AACGTTACGG TTAGCAACAA
 P P S R K L S K I E T L R L A T S Frame 1

401 GCTACATAAA TCATTTAAGC TCTTTGTTAA AGCAGTCGGA CTATAAAGAG
 Y I N H L S S L L K Q S D Y K E Frame 1

451 TTAAACCCTG GGTGCAACAA AGAATTAGTA TATGCTTCTT GTTCATCCGG
 L N P G C N K E L V Y A S C S S G Frame 1

501 AACAAACCAA ATATGTACAT TTTGCGTCAC ATTTTAAAGA TCACTAAACC
 T N Q I C T F C V T F L R S L N Q Frame 1

551 AGCGTTAG
 R * Frame 1

4. Positive Klone des Daughterless -THS

Zusammenfassend werden hier eine Auswahl der putativen Interaktionspartner des Da-THS aufgelistet. Homologe Sequenzen (Blast Hits) wurden unter Bemerkungen notiert.

Klon #	Bemerkung	E-Value	Synonym
A2a	ASh	$7 \cdot 10^{-16}$	LiAS
B4#3	ASh	$1 \cdot 10^{-18}$	LiAS
D1	rib. Protein	$5 \cdot 10^{-79}$	
E1	low Hit	0,23	
E2	low Hit	0,18	
F	rib. Protein	$2 \cdot 10^{-76}$	
F1	rib. Protein	$3 \cdot 10^{-75}$	
SC1	ASh	$7 \cdot 10^{-24}$	LiAS
SC2	low Hit	0,31	
2.1	low Hit	0,49	
SC3#1	new Protein	$8 \cdot 10^{-34}$	
SC4	ASh	$1 \cdot 10^{-23}$	LiAS
4.2	rib. Protein	$4 \cdot 10^{-36}$	
SC5	Collagen prec.	$6 \cdot 10^{-9}$	
SC6	ASh	$9 \cdot 10^{-24}$	LiAS
6	low Hit	0,25	
16	kein Eintrag		
18	HN1like	0,0005	
20	Soma Ferritin	$1 \cdot 10^{-54}$	
21	kein Eintrag		
22	EF1g	$1 \cdot 10^{-61}$	
37	Calponin	$1 \cdot 10^{-30}$	
38	rib. Protein	$5 \cdot 10^{-20}$	
39	26SProtease	$1 \cdot 10^{-81}$	
43	Ferritin	$1 \cdot 10^{-53}$	
48	rib. Protein	$2 \cdot 10^{-48}$	
54	rib. Protein	$8 \cdot 10^{-27}$	
55	42-9-9	10^{-23}	
59	Ribophorin II	10^{-20}	
63	Macroph. stim. fac,	10^{-6}	
68A	rib. Protein	$5 \cdot 10^{-93}$	
68	neural. Lazarillo	$8 \cdot 10^{-9}$	
69	rib. Protein	10^{-41}	
75	rib. Protein	$4 \cdot 10^{-58}$	
75B	ATP/GTP binde Prot.	$1 \cdot 10^{-62}$	
81	low Hit	0,2	
83	rib. Protein	$2 \cdot 10^{-32}$	
84	Hydra Tyr Kinase Rezpt.	$2 \cdot 10^{-17}$	sweet tooth
88	Calmodulin	$7 \cdot 10^{-29}$	

Klon #	Bemerkung	E-Value	Synonym
92	Hydra KS1	10 ⁻⁹	
93	skeletal musc. LIM	10 ⁻²⁰	
94	neural Lazarillo	10 ⁻⁹	
95	Hydra Actin	10 ⁻¹¹⁸	
96	Proteinkinase C	10 ⁻¹²⁰	RACK
97	rib. Protein	4*10 ⁻⁴⁵	
98	EF1g	8*10 ⁻⁶⁶	
102	Frizzeld	10 ⁻¹⁶	
122.1	STG1	9*10 ⁻¹⁷	
126	rib. Protein	4*10 ⁻⁷⁷	
128	SOH1 like	7*10 ⁻⁴¹	
129	low Hit	1,3	
132	G-Protein	8*10 ⁻¹⁰	
135	Gesolin/Severin	1*10 ⁻⁷⁹	
180	low Hit	1,9	
183	splicing factort	3*10 ⁻⁷	
186	kein Eintrag		
188	rib. Protein	3*10 ⁻⁶²	
191	rib. Protein	7*10 ⁻⁶⁷	
196	CalPoNin/ neur. Prot.	10 ⁻³¹	
197	lin 7c	3*10 ⁻⁵⁵	
198	rib. Protein	10 ⁻¹¹⁰	
202	Tropomyosin	2*10 ⁻²⁹	
203	rib. Protein	3*10 ⁻⁴¹	
208	low Hit	0,8	
212	low Hit	0,2	
231	26S Protease	8*10 ⁻¹²	
136	put. Rezeptor	10 ⁻⁴⁰	
SC 16	Hydra Mini-Col.	10 ⁻⁹	
SC14	seastar reg. Protease	10 ⁻²⁷	
SC13	Ferritin	10 ⁻²⁹	
SC12	Low Hit	3,9	
Da24	ASh	10 ⁻¹⁷	LIAS
Da25	ASh	10 ⁻¹⁷	LIAS
Da29	ASh	10 ⁻¹⁷	LIAS
Da16	low Hit		
Da18	kein Eintrag		
Da3	seastar reg. Protease	10 ⁻³¹	
Da8	low Hit		
Da9	Glutamate Rezept.	10 ⁻⁶	

Blast E value unter e-1=20

Blast E value e-1 bis e-10=14

Blast E value e-10 bis e-50=25

Blast E value e-50 bis e-100=16

Blast E value >e-100=3

5. Ergebnisse der Sequenzanalyse mit PSORT

5.1. Wahrscheinliche zelluläre Lokalisationen

LiAS k-NN Voraussage: (k=9/23)	HyNeuroD k-NN Voraussage: (k=9/23)
73,9% Nucleus	95,7% Nucleus
17,4% Cytoplasma	4,3% sekretorische Vesikel
8,7% Cytoskelett	
HyAS-C3 k-NN Voraussage: (k=9/23)	HyNATO/p48 k-NN Voraussage: (k=9/23)
65,2% Nucleus	69,6% Nucleus
17,4% Cytoplasma	17,4% Cytoplasma
13,0% Mitochondrium	4,3% Vakuolen
4,3% Peroxisom	4,3% Golgi
	4,3% Plasmamembran
HyAth-a k-NN Voraussage: (k=9/23)	HyScleraxis k-NN Voraussage: (k=9/23)
82,6% Nucleus	87% Nucleus
17,4% Cytoplasma	4,3% Cytoplasma
	4,3% Vakuolen
HyNgn k-NN Voraussage: (k=9/23)	4,3% Mitochondrium
65,2% Nucleus	
17,4% Cytoplasma	
13,0% Mitochondrium	
4,3% Peroxisom	

5.2. Ergebnisse der PSORT Subprogramme

5.2.1. Details der PSOPRT -Analyse für LiAS

```

PSG: a new signal peptide prediction method
N-region: length 10; pos.chg 0; neg.chg 1
H-region: length 9; peak value 0.00
PSG score: -4.40

GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition
GvH score (threshold: -2.1): -11.08
possible cleavage site: between 26 and 27

>>> Seems to have no N-terminal signal peptide

ALOM: Klein et al's method for TM region allocation
Init position for calculation: 1
Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 0
number of TMS(s) .. fixed
PERIPHERAL Likelihood = 10.18 (at 121)
ALOM score: 10.18 (number of TMSs: 0)

MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq
R content: 0 Hyd Moment(75): 1.20
Hyd Moment(95): 1.64 G content: 2
D/E content: 2 S/T content: 7
Score: -7.09

Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq
cleavage site motif not found

NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals
pat4: none
pat7: PGFIRKR (3) at 84
bipartite: none
content of basic residues: 12.4%
NLS Score: -0.22

KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none

ER Membrane Retention Signals: none

SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: none

SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: none

```

VAC: possible vacuolar targeting motif: none

RNA-binding motif: none

Actinin-type actin-binding motif:
 type 1: none
 type 2: none

NMYR: N-myristoylation pattern : none

Prenylation motif: none

memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none

Tyrosines in the tail: none

Dileucine motif in the tail: none

checking 63 PROSITE DNA binding motifs:
 Myc-type, 'helix-loop-helix' dimerization domain signature (PS00038): *** found
 SKVETLRGAINYIKLL at 122

checking 71 PROSITE ribosomal protein motifs: none

checking 33 PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none

NNCN: Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination
 Prediction: nuclear
 Reliability: 89

5.2.2 Details der PSORT-Analyse für Hy-AS-C3

PSG: a new signal peptide prediction method
 N-region: length 11; pos.chg 1; neg.chg 1
 H-region: length 0; peak value -11.30
 PSG score: -15.70

GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition
 GvH score (threshold: -2.1): -10.01
 possible cleavage site: between 54 and 55

>>> Seems to have no N-terminal signal peptide

ALOM: Klein et al's method for TM region allocation
 Init position for calculation: 1
 Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 0
 number of TMS(s) .. fixed
 PERIPHERAL Likelihood = 2.92 (at 151)
 ALOM score: 2.92 (number of TMSs: 0)

MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq
 R content: 0 Hyd Moment(75): 2.61
 Hyd Moment(95): 4.65 G content: 1
 D/E content: 2 S/T content: 4
 Score: -6.97

Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq
 cleavage site motif not found

NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals
 pat4: none
 pat7: PKNKKLS (5) at 264
 bipartite: KKGLKNTSNEETKKKVE at 11
 bipartite: RRRVKMVNDGFLRLRRH at 243
 content of basic residues: 13.0%
 NLS Score: 0.94

KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none

ER Membrane Retention Signals:
 KKXX-like motif in the C-terminus: MVSK

SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: SKF

SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: none

VAC: possible vacuolar targeting motif: none

RNA-binding motif: none

Actinin-type actin-binding motif:
 type 1: none
 type 2: none

NMYR: N-myristoylation pattern : none

Prenylation motif: none

memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none

Tyrosines in the tail: none

Dileucine motif in the tail: none

checking 63 PROSITE DNA binding motifs: none

checking 71 PROSITE ribosomal protein motifs: none

checking 33 PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none

NNCN: Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination
 Prediction: nuclear
 Reliability: 94.1

5.2.3. Details der PSORT-Analyse für Hy-Ath-a

PSG: a new signal peptide prediction method
 N-region: length 9; pos.chg 1; neg.chg 2
 H-region: length 2; peak value 0.00
 PSG score: -4.40

GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition
 GvH score (threshold: -2.1): -15.77
 possible cleavage site: between 60 and 61

>>> Seems to have no N-terminal signal peptide

ALOM: Klein et al's method for TM region allocation
 Init position for calculation: 1
 Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 0
 number of TMS(s) .. fixed
 PERIPHERAL Likelihood = 3.13 (at 183)
 ALOM score: 3.13 (number of TMSs: 0)

MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq
 R content: 0 Hyd Moment(75): 7.55
 Hyd Moment(95): 8.12 G content: 1
 D/E content: 2 S/T content: 1
 Score: -6.79

Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq
 cleavage site motif not found

NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals
 pat4: KKRR (5) at 33
 pat4: KRRK (5) at 34
 pat4: KRKK (5) at 91
 pat4: KRRK (5) at 125
 pat7: none
 bipartite: KKITLNEKNDYQRKRK at 65
 bipartite: RKRSKLNNILFRLEKRK at 77
 bipartite: KRSKLNNILFRLEKRKK at 78
 content of basic residues: 20.7%
 NLS Score: 3.54

KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none

ER Membrane Retention Signals:
 KKXX-like motif in the C-terminus: DKYK

SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: none

SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: none

VAC: possible vacuolar targeting motif: none

RNA-binding motif: none

Actinin-type actin-binding motif:
 type 1: none
 type 2: none

NMYR: N-myristoylation pattern : none

Prenylation motif: none

memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none

Tyrosines in the tail: none

Dileucine motif in the tail: none

checking 63 PROSITE DNA binding motifs:
Myc-type, 'helix-loop-helix' dimerization domain signature (PS00038): *** found
SKLTILRVAINYISAL at 184

checking 71 PROSITE ribosomal protein motifs: none

checking 33 PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none

NNCN: Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination
Prediction: nuclear
Reliability: 94.1

5.2.4. Details der PSORT-Analyse für Hy-Ngn

PSG: a new signal peptide prediction method
N-region: length 11; pos.chg 2; neg.chg 3
H-region: length 4; peak value 0.00
PSG score: -4.40

GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition
GvH score (threshold: -2.1): -14.56
possible cleavage site: between 40 and 41

>>> Seems to have no N-terminal signal peptide

ALOM: Klein et al's method for TM region allocation
Init position for calculation: 1
Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 0
number of TMS(s) .. fixed
PERIPHERAL Likelihood = 4.77 (at 98)
ALOM score: 4.77 (number of TMSs: 0)

MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq
R content: 1 Hyd Moment(75): 4.22
Hyd Moment(95): 7.92 G content: 1
D/E content: 2 S/T content: 1
Score: -6.36

Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq
R-3 motif at 47 RRIY|S

NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals
pat4: RKRR (5) at 41
pat7: PSRVKRI (4) at 14
pat7: PSRVKRI (4) at 29
bipartite: KRIIDAEENIPSRVKR at 18
content of basic residues: 14.1%
NLS Score: 1.02

KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none

ER Membrane Retention Signals: none

SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: none

SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: none

VAC: possible vacuolar targeting motif: none

RNA-binding motif: none

Actinin-type actin-binding motif:
type 1: none
type 2: none

NMYR: N-myristoylation pattern : none

Prenylation motif: none

memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none

Tyrosines in the tail: none

Dileucine motif in the tail: none

Prenylation motif: none

memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none

Tyrosines in the tail: none

Dileucine motif in the tail: none

checking 63 PROSITE DNA binding motifs:
Myc-type, 'helix-loop-helix' dimerization domain signature (PS00038): *** found *
TKLQILQFACHYISDL at 94

checking 71 PROSITE ribosomal protein motifs: none

checking 33 PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none

NNCN: Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination
Prediction: nuclear
Reliability: 94.1

5.2.5. Details der PSORT-Analyse für Hy-NeuroD

PSG: a new signal peptide prediction method
N-region: length 11; pos.chg 1; neg.chg 1
H-region: length 1; peak value -8.47
PSG score: -12.88

GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition
GvH score (threshold: -2.1): -8.60
possible cleavage site: between 25 and 26

>>> Seems to have no N-terminal signal peptide

ALOM: Klein et al's method for TM region allocation
Init position for calculation: 1
Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 0
number of TMS(s) .. fixed
PERIPHERAL Likelihood = 4.19 (at 79)
ALOM score: 4.19 (number of TMSs: 0)

MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq
R content: 0 Hyd Moment(75): 6.15
Hyd Moment(95): 3.50 G content: 1
D/E content: 2 S/T content: 0
Score: -7.82

Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq
cleavage site motif not found

NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals
pat4: RRRR (5) at 51
pat4: RRRH (3) at 52
pat7: none
bipartite: RRRRHVLNDALENLRRK at 51
bipartite: RRRHVLNDALENLRRKV at 52
bipartite: RRRHVLNDALENLRRKVP at 53
content of basic residues: 16.8%
NLS Score: 1.51

KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none

ER Membrane Retention Signals: none

SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: none

SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: none

VAC: possible vacuolar targeting motif: none

RNA-binding motif: none

Actinin-type actin-binding motif:
type 1: none
type 2: none

NMYR: N-myristoylation pattern : none

Prenylation motif: none

memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none

Tyrosines in the tail: none

Dileucine motif in the tail: none

checking 63 PROSITE DNA binding motifs:
 Myc-type, 'helix-loop-helix' dimerization domain signature (PS00038): *** found
 SKIEVLRMAIDYIAML at 80

checking 71 PROSITE ribosomal protein motifs: none

checking 33 PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none

NNCN: Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination
 Prediction: nuclear
 Reliability: 94.1

COIL: Lupas's algorithm to detect coiled-coil regions
 total: 0 residues

5.2.6. Details der PSORT-Analyse für Hy-NATO/p48

PSG: a new signal peptide prediction method
 N-region: length 8; pos.chg 0; neg.chg 1
 H-region: length 11; peak value 0.00
 PSG score: -4.40

GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition
 GvH score (threshold: -2.1): -14.76
 possible cleavage site: between 35 and 36

>>> Seems to have no N-terminal signal peptide

ALOM: Klein et al's method for TM region allocation
 Init position for calculation: 1
 Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 1
 Number of TMS(s) for threshold 0.5: 0
 PERIPHERAL Likelihood = 4.77 (at 91)
 ALOM score: 0.21 (number of TMSs: 0)

MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq
 R content: 0 Hyd Moment(75): 10.17
 Hyd Moment(95): 7.42 G content: 0
 D/E content: 2 S/T content: 2
 Score: -5.73

Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq
 cleavage site motif not found

NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals
 pat4: none
 pat7: none
 bipartite: none
 content of basic residues: 16.5%
 NLS Score: -0.47

KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none

ER Membrane Retention Signals: none

SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: none

SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: none

VAC: possible vacuolar targeting motif: none

RNA-binding motif: none

Actinin-type actin-binding motif:
 type 1: none
 type 2: none

NMYR: N-myristoylation pattern : none

Prenylation motif: none

memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none

Tyrosines in the tail: none

Dileucine motif in the tail: none

checking 63 PROSITE DNA binding motifs:
 Myc-type, 'helix-loop-helix' dimerization domain signature (PS00038): *** found
 SKIDTLKLAISYIQFL at 89

checking 71 PROSITE ribosomal protein motifs: none

checking 33 PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none

NNCN: Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination
 Prediction: nuclear
 Reliability: 94.1

COIL: Lupas's algorithm to detect coiled-coil regions
 total: 0 residues

5.2.7. Details der PSORT-Analyse für Hy-Scleraxis

PSG: a new signal peptide prediction method
 N-region: length 10; pos.chg 1; neg.chg 1
 H-region: length 3; peak value -11.14
 PSG score: -15.54

GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition
 GvH score (threshold: -2.1): -14.39
 possible cleavage site: between 40 and 41

>>> Seems to have no N-terminal signal peptide

ALOM: Klein et al's method for TM region allocation
 Init position for calculation: 1
 Tentative number of TMS(s) for the threshold 0.5: 0
 number of TMS(s) .. fixed
 PERIPHERAL Likelihood = 7.00 (at 163)
 ALOM score: 7.00 (number of TMSs: 0)

MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq
 R content: 0 Hyd Moment(75): 0.71
 Hyd Moment(95): 5.11 G content: 0
 D/E content: 2 S/T content: 2
 Score: -7.31

Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq
 cleavage site motif not found

NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals
 pat4: RKRH (3) at 41
 pat7: none
 bipartite: none
 content of basic residues: 11.9%
 NLS Score: -0.29

KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none

ER Membrane Retention Signals: none

SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: none

SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: none

VAC: possible vacuolar targeting motif: none

RNA-binding motif: none

Actinin-type actin-binding motif:
 type 1: none
 type 2: none

NMYR: N-myristoylation pattern : none

Prenylation motif: none

memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: none

Tyrosines in the tail: none

Dileucine motif in the tail: none

checking 63 PROSITE DNA binding motifs:
 Myc-type, 'helix-loop-helix' dimerization domain signature (PS00038): *** found
 SKIETLRRLATSINHL at 124

checking 71 PROSITE ribosomal protein motifs: none

checking 33 PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none

NNCN: Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination
 Prediction: nuclear
 Reliability: 94.1

COIL: Lupas's algorithm to detect coiled-coil regions
 total: 0 residues

6. Vorläufige ISH-Daten zu *hyAS-C3* und *hyNgn*

Die gezeigten Abbildungen entsprechen ersten Ergebnissen, die weiterer Bestätigung durch Wiederholung bedürfen und aus diesem Grund nicht in den Ergebnis-Teil aufgenommen wurden.

6.1. Vorläufige ISH-Ergebnisse für *hyAS-C3*

Die ISH Resultate für *hy-AS-C3* Sonden zeigten Signale im Rumpf, die möglicherweise eine proliferierende I-Zellpopulation darstellen könnten. In einigen Experimenten (Abb. A1, b) konnten neben dicht nebeneinander liegenden Nestern (Abb. A1, a') auch Nematocysten-Nester beobachtet werden (Abb. A1, b'). Generell zeigten ISH mit *hy-AS-C3* Sonden einen hohen Hintergrund, der noch weiter zu optimieren ist.

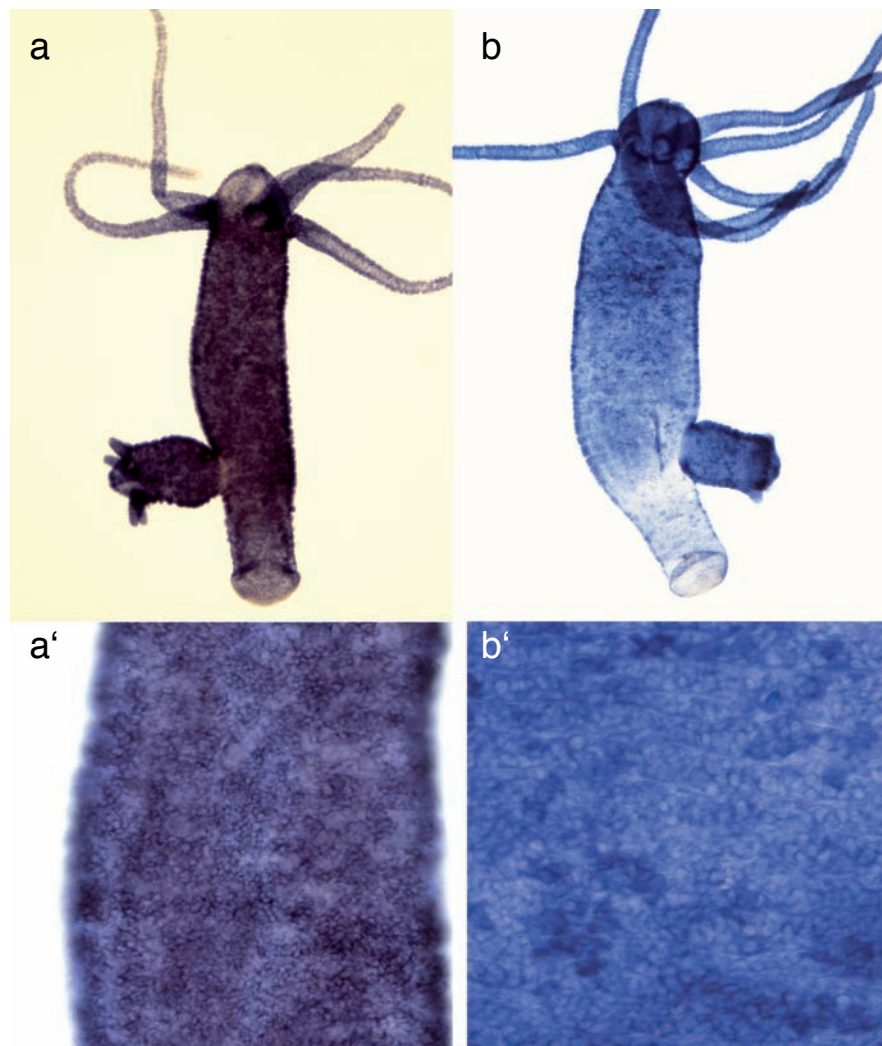


Abb. A1: Vorläufige ISH- Ergebnisse mit *hyAS-C3*-Sonden

(a-b) Übersichtsaufnahmen unabhängiger Experimente. (a'-b') Detailvergrößerung. (Erklärung siehe Text)

6.2. Vorläufige ISH-Experimente mit *hyNgn*

Vorläufige ISH-Ergebnisse mit *hyNgn*-Sonden zeigten I-Zellnester im Rumpf der Tiere und Signale an der Tentakelbasis. In einigen geschlechtlichen Tieren (Abb. A2, d,g) entstand der Eindruck, das *hyNgn* auch an der Entwicklung von männlichen Keimzellen beteiligt sein könnte. Im Vergleich zu andern *Hydra* bHLH-Faktoren scheinen *hyNgn*-positive Nester eine größere I-Zellpopulation zu repräsentieren, deren Nester im Vergleich zu *NemDP* assoziierten Genen (*LiAS*, *Cnash*, *HyZic*, *NOWA*) größer und in engerer Nachbarschaft zueinander lokalisiert sind.

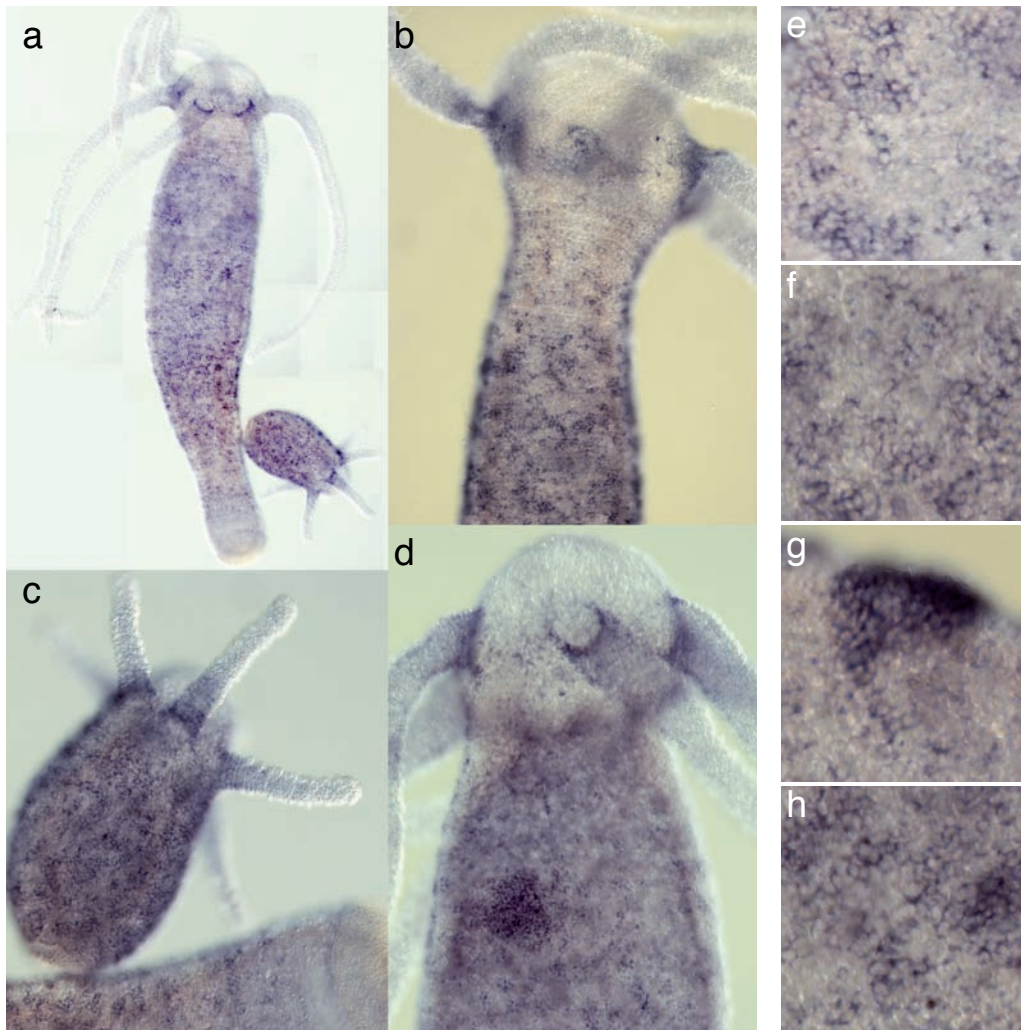


Abb. A2: Vorläufige ISH-Ergebnisse mit *hyNgn*-Sonden

Übersichtsaufnahmen (a-d) zeigen das räumliche Expressionsmuster in ersten Versuchen mit *hyNgn*-Sonden. Dabei konnten im Rumpf eng nebeneinander liegende Nester unterschiedlicher Größe beobachtet werden (e-h). In einigen geschlechtlichen Tieren (d) konnten zusätzliche Signale in den entstehenden Hoden (g) beobachtet werden. (Siehe Text)

7. Kontrollexperimente mit polyklonalem anti-LiAS Serum

Im Zug der Qualitätskontrolle des polyklonalem anti-LiAS Serums wurden verschiedene Kontrollexperimente durch geführt: Ein Teil des Serums mit bakteriell exprimierten rekombinantem LiAS-Protein affinitätsgereinigt und anschließend im Dot-Blot und Immunfärbungen getestet. Parallel wurde anti-LiAS Antikörper mit rekombinantem LiAS-Protein (bakteriell exprimiert) kompetititiert und anschließenden in Immunfärbugen überprüft.

7.1. Kontrollen mit affinitätsgereinigtem anti-LiAS-Serum

Für die affinitäts-Reinigung wurden 1,26 mg bakteriell exprimiertes LiAS-Protein an NHS-Sepharose gekoppelt und anschließend mit 5 ml Ammoniumsulfat-gefälltem anti-LiAS-Serum inkubiert. Nach mehreren Reinigungsschritten wurde der affinitätsgereinigte Antikörper (AF- α -LiAS) fraktioniert eliert und jeweils 2 μ l pro Fraktion im Dot-Blot überprüft. Dabei zeigten sich Signale in allen 10 Fraktionen, die anschließend vereint und mit Vivaspinproteinkonzentratoren 30x aufkonzentriert wurden.

In Dot-Blot Experimenten mit rekombinantem LiAS-Protein war AF- α -LiAS in der Lage rekombinantes LiAS in verschiedenen Konzentrationen zu detektieren (Abb. A3). Im Vergleich mit nicht affinitätsgereinigtem Serum zeigte dieser Antikörper keine Kreuzreaktion mit BSA und deutlich weniger Hintergrund. Allerdings schien AF- α -LiAS während der Reinigungsprozedur stark verdünnt worden zu sein, weshalb er nur in Verdünnungen von 1:100 oder unverdünnt eingesetzt werden konnte.

In Immunfärbungen konnten im Vergleich zwischen anti-LiAs (vgl. Ergebnisteil) und AF- α -LiAS (Abb. A.4) bis auf eine geringere Signalintensität des affinitäts-gereinigten Antikörpers keine wesentlichen Unterschiede beobachtet werden, weshalb alle Immunfärbungen aus praktikablen Gründen mit anti-LiAS-Serum durchgeführt wurden. Die in Western-Blot Experimente mit anti-LiAS-Serum festgestellte Kreuzreaktion mit BSA schien dabei keinen Einfluß auf die Qualität der Immunfärbung zu haben, wie folgende Kontrollexperimente zeigen.

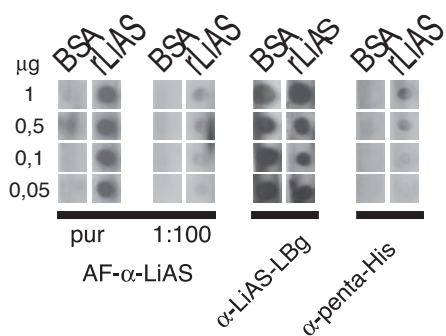


Abb. A3: Dot-Blot Kontrolle des affinitäts gereinigten anti-LiAS Antikörpers

Verschiedene Mengen BSA (B) und LiAS (L) wurden auf Nitrocellulosestreifen getropft und mit affinitätsgereinigtem anti-LiAS (AF α -LiAS), Ammoniumsulfat gefälltem anti-LiAS (α -LiAS-LBg) und α -penta-His Antikörper analysiert. Dabei detektierte AF α -LiAS ausschließlich rekombinantes LiAS, während bei α -LiAS-LBg eine Kreuzreaktion BSA beobachtet wurde. Als Kontrolle diente die Detektion durch α -penta-His Antikörper, in der ebenfalls nur rekombinantes LiAS Protein nachgewiesen wurde.

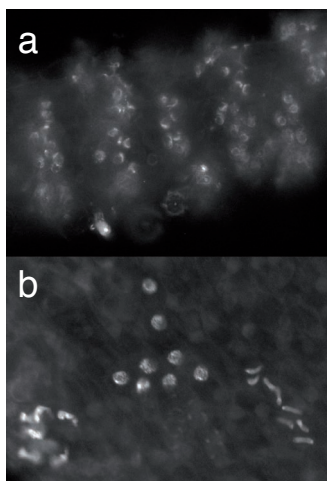


Abb. A4: Immunfärbung mit affinitäts gereinigtem anti-LiAS-Serum (AF- α -LiAS)

Die Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte einer Immunfärbung mit affinitäts-gereinigtem anti-LiAS Antikörper, der 1:10 verdünnt eingesetzt wurde. (a) zeigt einen Ausschnitt aus einem Tentakel, (b) einen Ausschnitt aus dem Rumpf, in dem typische anti-LiAS-positive Signale beobachtet werden konnten. (siehe Text)

7.2. *Kompetition der LiAS Antikörper-Färbung mit bakteriell exprimierten LiAS-Protein*

Um die Signalspezifität des Antiserums zu überprüfen, wurde anti-LiAS Antikörper in verschiedenen Verdünnungen mit rekombinantem LiAS Protein präadsorbiert und anschließend in Antikörperfärbungen eingesetzt (Abb. A5). Parallel wurden Tiere mit entsprechenden Verdünnung nicht-präadsorbierten anti-LiAS-Serum als positiv Kontrolle behandelt.

Um zusätzlich Kompetition durch Konzentrationseffekte auszuschließen, wurden parallel Kontrollen mit entsprechenden Mengen BSA und Knob (virales Protein) Wildtyp Protein durchgeführt. Im Vergleich zu diesen mitgeführten Kontrollen konnte die anti-LiAS-Färbung konzentrationsabhängig mit rekombinantem LiAS-Protein kompetitiert werden. Da weder BSA noch Wildtyp Knob Einfluß auf die Immunfärbung hatten, wird in Abbildung A5 nur stellvertretend die BSA Kontrolle den entsprechenden Kompetitionen mit rekombinantem LiAS (rLiAS) gegenüber gestellt.

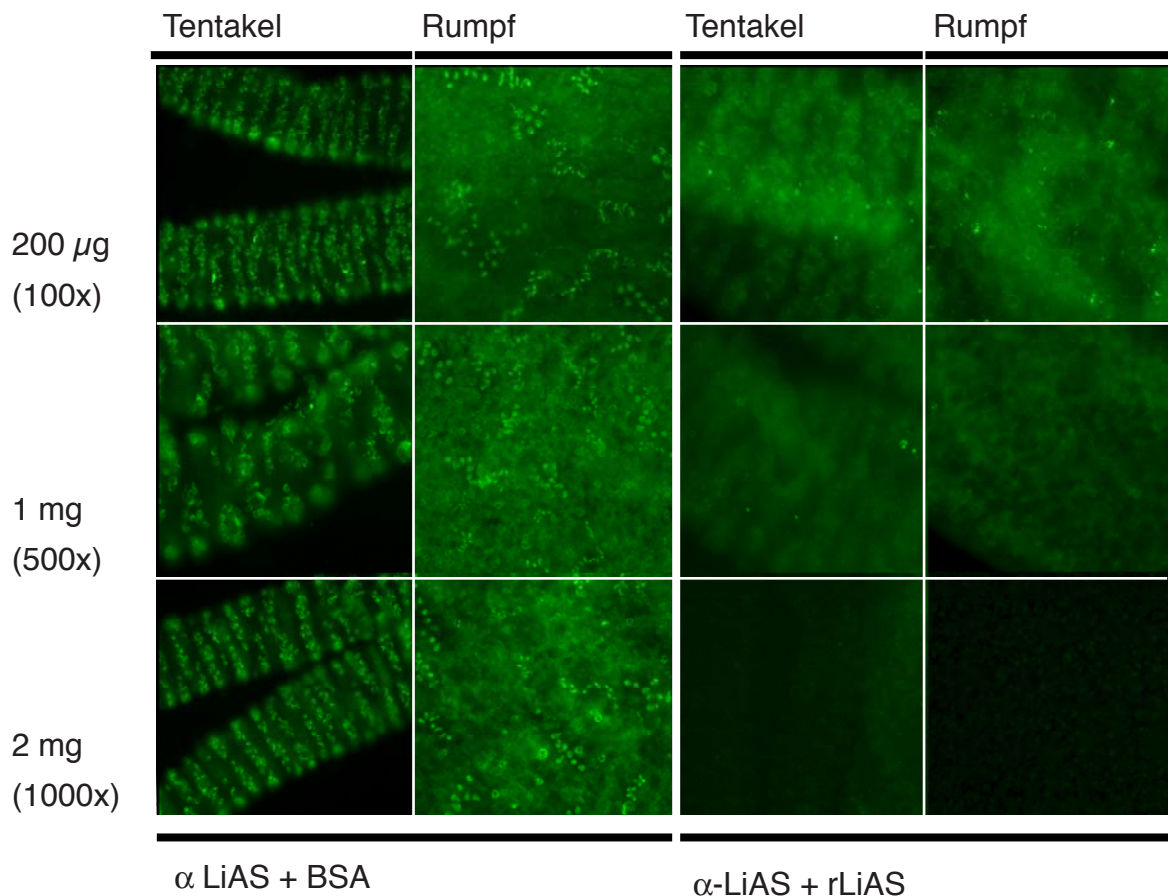


Abb. A5: Kompetition mit rekombinantem LiAS-Protein

Anti-LiAS Antikörper (α -LiAS) wurde mit BSA (linke Hälfte) und rekombinantem LiAS-Protein (rLiAS) inkubiert und anschließend in Immunfärbungen eingesetzt. Gezeigt werden jeweils repräsentative Ausschnitte aus Tentakel und Rumpf. Die jeweilige Menge Proteins ist links angegebene. Im Vergleich zu BSA negativ Kontrolle ließ sich das anti-LiAS Signal spezifisch mit rekombinantem LiAS-Protein (rLiAS) inhibieren. Dabei genügte ein 100 facher Überschuß des Proteins im Vergleich zum Antikörper, um die Signale in Tentakel und Rumpf deutlich zu reduzieren, während bei einem 500 bis 1000 fachen Überschuß keine Signale detektiert werden konnten.

8. Erste DAPT-Experimente und Auswirkungen auf anti-Cadherin und anti-LIAS Immunfärbungen.

Tiere wurden unterschiedlich lang in 20 μM DAPT inkubiert und anschließend mit anti-HyCad-ICD untersucht (Abb. A6). Dabei zeigten sich bereits nach 24 h erste Veränderungen bezüglich der anti-Cadherin-Färbung: während in den Tentakeln die Signalstärke der Kontrolle entsprach, nahmen die Signal im Rumpf deutlich ab. Nach 48 h Inkubation in DAPT konnten in einigen Tieren deutliche Veränderungen im anti-Cadherin-positiven Tentakelnervennetz beobachtet werden: die Knöpfchen-förmigen Enden verschwanden



Abb. A6: Immunfärbung mit anti-HyCad-ICD nach DAPT-Inkubation

Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte von unterschiedlich lang DAPT-inkubierten Tieren. Dabei konnte eine drastische Verkürzung der Tentakel beobachtet werden, die mit Veränderungen im anti-Cadherin-positiven Nervennetz begleitet wurde. Die Ausschnitte (a) und (a') zeigen jeweils Köpfe während Ausschnitt (b) Tentakel und (c) Rumpfausschnitte zeigt. (Details siehe Text)

und die Vernetzung der Nerven schien unterbrochen. Parallel reduzierte sich die Länge der Tentakel während sich der Rumpf verlängerte. Nach 72 h hatte ein Großteil der Tiere Stummeltentakel und konnte nur noch mit den Tentakelenden Beute fangen. Parallel gingen Signale und Signaleintensität im Rumpf weiter zurück während sich die Signale im Tentakel auf das Soma zu konzentrieren schienen und Axone nicht mehr kontinuierlich gefärbt waren. Zeitgleich konnte in anti-LIAS-Färbungen Stenotelen- und Desmonemenfreie Bereiche an der Tentakelbasis beobachtet werden (Abb. A7). In Immunfärbungen mit anti-LIAS-Antikörper fiel weiterhin aus, dass bereits nach 24 h keine differenzierenden Neststadien detektiert werden konnten, während in den Tentakeln keine Veränderungen bezüglich der Färbung beobachtet werden konnten. Nach 72 h Inkubation waren im Rumpf noch vereinzelt migrierende Nematocyten zu beobachten, die jedoch im Kopfbereich nicht mehr in die Tentakel einzuwandern schienen (Abb. A7,a'). Nach einem weiteren Tag Inkubation in DAPT waren in einigen Tieren im Rumpf nur noch integrierte Stenotelen zu beobachten, die schwach gefärbt erschienen. Gleichzeitig konnte an der Tentakelbasis größere Nematocyten-freie Bereiche beobachtet werden.

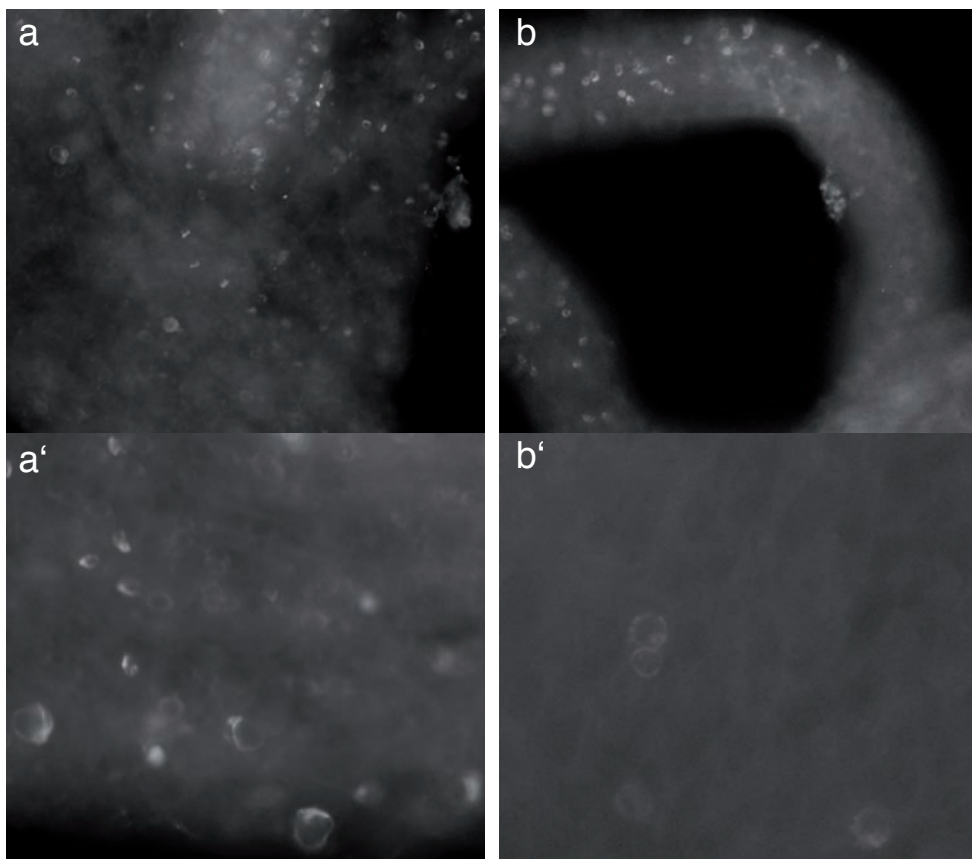
72 h DAPT(20 μ M)/ anti-LIAS96 h DAPT(20 μ M)/ anti-LIAS

Abb. A7: Immunfärbung mit anti-LIAS nach DAPT-Inkubation

(a, b) Ausschnittsvergrößerung aus dem Kopfbereich, (a', b') Ausschnittsvergrößerung aus dem Rumpfbereich. (Details siehe Text)

9. Lösungen & Rezepte

Alle gängigen Standard Puffer und Lösungen wurden nach üblichen Rezepten hergestellt und werden an dieser Stelle nicht aufgeführt. Gleiches gilt für verwendete kommerziell erhältlichen Kulturmedien und Lösungen

DNA-Auftragspuffer	30 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylenblau
PEG (50 %)	50 % (w/v) Polyethylenglycol (MW 3350)
X-Gal Stammlösung	20 mg/ml X-Gal in DMF
Z-Puffer Stammlösung	60 mM Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O 40 mM NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ * 7 H ₂ O
X-Z-Mix	98 ml Z-Puffer 0,27 ml β-Mercaptoethanol 1,67 ml X-Gal Stammlösung
Glucosestammlösung	50% (w/v) in H ₂ O bidest.
YPAD-Medium (1 Liter)	20 g Pepton (Difco) 10 g Hefeextrakt (Roth) ad. 960 ml H ₂ O pH5,8 40 mg Adeninhemisulfat (Sigma) autoklavieren 40 ml Glucosestammlösung
SD-Medium (1 Liter)	6,7 g „yeast nitrogen base w/o aminoacids“ ad. 860 ml H ₂ O pH 5,8 100 ml entsprechende „Dropout“-Lösung 40 ml Glucosestammlösung
10x „Dropout“-Lösung	L-Isoleucin (I) 300 mg/ml L-Valin (V) 1,5 g/ml L-Adeninhemisulfat 200 mg/ml L-Argenin HCl (R) 200 mg/ml L-Histidin HCl Monohydrat (H) 200 mg/ml L-Leucin (L) 1 g/ml L-Lysin HCl (K) 300 mg/ml L-Methionin (M) 200 mg/ml L-Phenylalanin (F) 500 mg/ml T-Threonin (T) 2 g/ml L-Tryptophan (W) 200 mg/ml L-Tyrosin (Y) 300 mg/ml L-Uracil (U) 200 mg/ml L-Glutamat (E) 1 g/ml L- Aspartat (D) 1 g/ml L-Serin (S) 4 g/ml

Dür die einzelnen „Dropout“-Lösungen wurden die entsprechenden AS eingewogen, der pH-Wert auf 5,8 eingestellt und die Lösungen anschließend autoklaviert.

Quellenverzeichnis

1. Links:

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ClustalW
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>

CnidBase: Cnidarian Evolutionary Genomic Database
<http://cnidbase.bu.edu/>

ExPASy Proteomics Server
<http://www.expasy.ch>

ExPASy-PROSITE
<http://www.expasy.ch/prosite/>

FlyBASE: A Database of *Drosophila* Genes & Genomes
<http://flybase.bio.indiana.edu/>

Gietz-Lab Yeast Transformation Home Page
<http://home.cc.umanitoba.ca/~gietz/>

Hydra mag. Browser
<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>

Protocol Online: your lab's reference book
<http://www.protocol-online.org/>

The Cnidaria Home Page
<http://www.ucihs.uci.edu/biochem/steele/default.html>

The Interaktive Fly
<http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

SMART
<http://smart.embl-heidelberg.de/>

2. Literaturverzeichnis

Allman, G. J. (1853). On the anatomy and physiology of Cordylophora: A contribution to our knowledge of the Tubularian zoophytes. *Philos Trans R Soc Lond* 143, 367-384.

Anderson, D. J. (1999). Lineages and transcription factors in the specification of vertebrate primary sensory neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9, 517-524.

Arnold, H. H. & Braun, T. (2000). Genetics of muscle determination and development. *Curr Top Dev Biol* 48, 129-164.

Atchley, W. R. & Fitch, W. M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5172-5176.

Baki, L., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Georgakopoulos, A., Wen, P., Cui, W., Shioi, J., Koo, E., Ozawa, M., Friedrich, V. L., Jr. und Robakis, N. K. (2001). Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2381-2386.

Bednorz, N. L. (2004) Analyse proneuraler und antineuronaler Gene von *Hydra vulgaris*, Darmstadt, Diplomarbeit

- Bellefroid, E. J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D. J., Kintner, C. und Pieler, T.** (1996). X-MyT1, a Xenopus C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell* 87, 1191-1202.
- Ben-Arie, N., Hassan, B. A., Bermingham, N. A., Malicki, D. M., Armstrong, D., Matzuk, M., Bellen, H. J. und Zoghbi, H. Y.** (2000). Functional conservation of atonal and Math1 in the CNS and PNS. *Development* 127, 1039-1048.
- Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., Bellen, H. J., Lysakowski, A. und Zoghbi, H. Y.** (1999). Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284, 1837-1841.
- Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Wang, V. Y., Fernandez, M., Banfi, S., Bellen, H. J., Fritsch, B. und Zoghbi, H. Y.** (2001). Proprioceptor pathway development is dependent on Math1. *Neuron* 30, 411-422.
- Bertrand, N., Castro, D. S. und Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-530.
- Bielen, H., Oberleitner, S., Marcellini, S., Gee, L., Lemaire, P., Bode, H. R., Rupp, R. und Technau, U.** (2007). Divergent functions of two ancient Hydra Brachyury paralogues suggest specific roles for their C-terminal domains in tissue fate induction. *Development* 134, 4187-4197.
- Bode, H., Martinez, D., Shenk, M. A., Smith, K., Steele, R. und Technau, U.** (1999). Evolution of head development. *Biol Bull* 196, 408-410.
- Bode, H. R.** (1996). The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J Cell Sci* 109 (Pt 6), 1155-1164.
- Bode, H. R., Heimfeld, S., Chow, M. A. und Huang, L. W.** (1987). Gland cells arise by differentiation from interstitial cells in *Hydra attenuata*. *Dev Biol* 122, 577-585.
- Bosch, T. C.** (2003). Ancient signals: peptides and the interpretation of positional information in ancestral metazoans. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 136, 185-196.
- Bosch, T. C.** (2007a). Symmetry breaking in stem cells of the basal metazoan *Hydra*. *Prog Mol Subcell Biol* 45, 61-78.
- Bosch, T. C.** (2007b). Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for *Hydra* regeneration. *Dev Biol* 303, 421-433.
- Bosch, T. C. & David, C. N. (1984). Growth regulation in *Hydra*: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev Biol* 104, 161-171.
- Bosch, T. C. & David, C. N.** (1991). Decision making in interstitial stem cells of *Hydra*. *In Vivo* 5, 515-520.
- Bosch, T. C. & Fujisawa, T.** (2001). Polyps, peptides and patterning. *Bioessays* 23, 420-427.
- Bosch, T. C. D., C.N.** (1997). Stem cells of *Hydra magnipapillata* can differentiate into somatic and germ line cells. *Dev Biol* 121, 182-191.
- Brand, M., Jarman, A. P., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1993). *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 119, 1-17.
- Brown, D., Wagner, D., Li, X., Richardson, J. A. und Olson, E. N.** (1999). Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor *scleraxis* in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis. *Development* 126, 4317-4329.
- Bruses, J. L.** (2000). Cadherin-mediated adhesion at the interneuronal synapse. *Curr Opin Cell Biol* 12, 593-597.
- Bruses, J. L.** (2006). N-cadherin signaling in synapse formation and neuronal physiology. *Mol Neurobiol* 33, 237-252.
- Burgess, R., Cserjesi, P., Ligon, K. L. und Olson, E. N.** (1995). *Paraxis*: a basic helix-loop-helix protein expressed in paraxial mesoderm and developing somites. *Dev Biol* 168, 296-306.
- Cabrera, C. V. & Alonso, M. C.** (1991). Transcriptional activation by heterodimers of the *achaete-scute* and *daughterless* gene products of *Drosophila*. *Embo J* 10, 2965-2973.

- Campbell, R. D.** (1967a). Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. I. Patterns of cell division. *Dev Biol* 15, 487-502.
- Campbell, R. D.** (1967b). Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement. *J Morphol* 121, 19-28.
- Campbell, R. D. & David, C. N.** (1974). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. II. Interstitial cells. *J Cell Sci* 16, 349-358.
- Campos-Ortega, J. A.** (1998). The genetics of the *Drosophila* achaete-scute gene complex: a historical appraisal. *Int J Dev Biol* 42, 291-297.
- Campuzano, S., Carramolino, L., Cabrera, C. V., Ruiz-Gomez, M., Villares, R., Boronat, A. und Modolell, J.** (1985). Molecular genetics of the achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*. *Cell* 40, 327-338.
- Campuzano, S. & Modolell, J.** (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet* 8, 202-208.
- Cau, E., Casarosa, S. und Guillemot, F.** (2002). Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* 129, 1871-1880.
- Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. und Guillemot, F.** (1997). Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124, 1611-1621.
- Cau, E. & Wilson, S. W.** (2003). Ash1a and Neurogenin1 function downstream of Floating head to regulate epiphyseal neurogenesis. *Development* 130, 2455-2466.
- Chae, J. H., Stein, G. H. und Lee, J. E.** (2004). NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 18, 271-288.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. und Fields, S.** (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9578-9582.
- Cramer von Laue, C.** (2003) Untersuchungen zur dualen Funktion von beta-Catenin im Wnt-Signalweg und der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion bei *Hydra*, TU, Darmstadt, Dissertation.
- Cronmiller, C. & Cline, T. W.** (1987). The *Drosophila* sex determination gene daughterless has different functions in the germ line versus the soma. *Cell* 48, 479-487.
- Cserjesi, P., Brown, D., Ligon, K. L., Lyons, G. E., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. und Olson, E. N.** (1995). Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* 121, 1099-1110.
- Dambly-Chaudiere, C. & Vervoort, M.** (1998). The bHLH genes in neural development. *Int J Dev Biol* 42, 269-273.
- David, C. N. & Gierer, A.** (1974). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. III. Nerve and nematocyte differentiation. *J Cell Sci* 16, 359-375.
- David, C. N. & Hager, G.** (1994). Formation of a primitive nervous system: nerve cell differentiation in the polyp hydra. *Perspect Dev Neurobiol* 2, 135-140.
- David, C. N. & Plotnick, I.** (1980). Distribution of interstitial stem cells in *Hydra*. *Dev Biol* 76, 175-184.
- Day, R. M. & Lenhoff, H. M.** (1981). *Hydra* mesoglea: a model for investigating epithelial cell-basement membrane interactions. *Science* 211, 291-294.
- Derycke, L. D. & Bracke, M. E.** (2004). N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol* 48, 463-476.
- Dominguez, M. & Campuzano, S.** (1993). asense, a member of the *Drosophila* achaete-scute complex, is a proneural and neural differentiation gene. *Embo J* 12, 2049-2060.
- Dübel, S. H. & Schaller, H.C.** (1987). Differentiation pathways of ectodermal epithelial cells in *hydra*. *Differentiation* 34, 181-189.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M. und Harrison, S. C.** (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* 8, 970-980.
- Engel, U., Ozbek, S., Streitwolf-Engel, R., Petri, B., Lottspeich, F. und Holstein, T. W.** (2002). Nowa, a novel protein with minicollagen Cys-rich domains, is involved in nematocyst formation in *Hydra*. *J Cell Sci* 115, 3923-

3934.

Ferreiro, B., Kintner, C., Zimmerman, K., Anderson, D. und Harris, W. A. (1994). XASH genes promote neurogenesis in *Xenopus* embryos. *Development* 120, 3649-3655.

Ferreiro, B., Skoglund, P., Bailey, A., Dorsky, R. und Harris, W. A. (1993). XASH1, a *Xenopus* homolog of achaete-scute: a proneural gene in anterior regions of the vertebrate CNS. *Mech Dev* 40, 25-36.

Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Fields, S. & Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10, 286-292.

Frittsch, B. B. et al. (2001). Evolution and development of the vertebrate ear. *Brain Research Bulletin* 55, 711-721.

Fujisawa, T. (1989). Role of interstitial cell migration in generating position-dependent patterns of nerve cell differentiation in *Hydra*. *Dev Biol* 133, 77-82.

Fujisawa, T. (2003). *Hydra* regeneration and epithelipeptides. *Dev Dyn* 226, 182-189.

Fujisawa, T. (2006). *Hydra* is joining the bandwagon. *Bioessays* 28, 560-562.

Fujisawa, T. & David, C. N. (1981). Commitment during nematocyte differentiation in *Hydra*. *J Cell Sci* 48, 207-222.

Fujisawa, T. & David, C. N. (1982). Commitment during stenotele differentiation in *Hydra* is localized near the S/G2 boundary in the terminal cell cycle. *Dev Biol* 93, 226-230.

Fujisawa, T., Nishimiya, C. und Sugiyama, T. (1986). Nematocyte differentiation in *hydra*. *Curr Top Dev Biol* 20, 281-290.

Galliot, B., Miljkovic-Licina, M., Ghila, L. und Chera, S. (2007). RNAi gene silencing affects cell and developmental plasticity in *hydra*. *C R Biol* 330, 491-497.

Garcia-Bellido, A. & Santamaria, P. (1978). Developmental Analysis of the Achaete-Scute System of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 88, 469-486.

Ge, W., He, F., Kim, K. J., Bianchi, B., Coskun, V., Nguyen, L., Wu, X., Zhao, J., Heng, J. I., Martinowich, K. et al. (2006). Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1319-1324.

Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., Cui, W., Li, H. C., Schutte, M., Gordon, R., Holstein, G. R., Martinelli, G. et al. (1999). Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts. *Mol Cell* 4, 893-902.

Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Friedrich, V. L., Jr., Shioi, J., Efthimiopoulos, S. und Robakis, N. K. (2000). Presenilin-1: a component of synaptic and endothelial adherens junctions. *Ann N Y Acad Sci* 920, 209-214.

Ghysen, A. & Dambly-Chaudiere, C. (1989). Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet* 5, 251-255.

Ghysen, A. & Dambly-Chaudiere, C. (1990). Early events in the development of *Drosophila* peripheral nervous system. *J Physiol (Paris)* 84, 11-20.

Ghysen, A. & Dambly-Chaudiere, C. (1993). The specification of sensory neuron identity in *Drosophila*. *Bioessays* 15, 293-298.

Ghysen, A. & Dambly-Chaudiere, C. (2003). [The development of the nervous system: from fly to fish, from fish to man.]. *Med Sci (Paris)* 19, 575-581.

Ghysen, A., & Richelle, J. (1979). Determination of sensory bristles and pattern formation in *Drosophila*. II. The achaete-scute locus. *Dev Biol* 70, 438-452.

Gierer, A., Berking, S., Bode, H., David, C. N., Flick, K., Hansmann, G., Schaller, H. und Trenkner, E. (1972). Regeneration of *hydra* from reaggregated cells. *Nat New Biol* 239, 98-101.

Gietz, R. D. (2006). Yeast two-hybrid system screening. *Methods Mol Biol* 313, 345-371.

Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. (2007a). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2, 31-34.

- Gietz, R. D. & Schiestl, R. H.** (2007b). Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2, 38-41.
- Gietz, R. D. & Schiestl, R. H.** (2007c). Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2, 35-37.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. und Woods, R. A.** (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355-360.
- Gietz, R. D. & Woods, R. A.** (2002a). Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 185, 471-486.
- Gietz, R. D. & Woods, R. A.** (2002b). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.
- Gietz, R. D. & Woods, R. A.** (2006). Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* 313, 107-120.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. und Guillemot, F.** (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1607-1611.
- Grens, A., Mason, E., Marsh, J. L. und Bode, H. R.** (1995). Evolutionary conservation of a cell fate specification gene: the Hydra achaete-scute homolog has proneural activity in Drosophila. *Development* 121, 4027-4035.
- Guder, C., Philipp, I., Lengfeld, T., Watanabe, H., Hobmayer, B. und Holstein, T. W.** (2006). The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 25, 7450-7460.
- Guillemot, F.** (1995). Analysis of the role of basic-helix-loop-helix transcription factors in the development of neural lineages in the mouse. *Biol Cell* 84, 3-6.
- Guillemot, F.** (1999). Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Exp Cell Res* 253, 357-364.
- Guillemot, F., Caspary, T., Tilghman, S. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Anderson, D. J., Joyner, A. L., Rossant, J. und Nagy, A.** (1995). Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. *Nat Genet* 9, 235-242.
- Guillemot, F., Molnar, Z., Tarabykin, V. und Stoykova, A.** (2006). Molecular mechanisms of cortical differentiation. *Eur J Neurosci* 23, 857-868.
- Haeckel, E.** (1874). Die Gastraea- Theorie: die phylogenesische Classification des Thierreichs und die Homologie der Keimblätter. *Jenaische Z Naturwiss* 8, 1-55.
- Harb, G., Heremans, Y., Heimberg, H. und Korbitt, G. S.** (2006). Ectopic expression of neurogenin 3 in neonatal pig pancreatic precursor cells induces (trans)differentiation to functional alpha cells. *Diabetologia* 49, 1855-1863.
- Hassan, B. A. & Bellen, H. J.** (2000). Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev* 14, 1852-1865.
- Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T. und Kageyama, R.** (2001). Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* 128, 1313-1322.
- Hayakawa, E., Fujisawa, C. und Fujisawa, T.** (2004). Involvement of Hydra achaete-scute gene CnASH in the differentiation pathway of sensory neurons in the tentacles. *Dev Genes Evol* 214, 486-492.
- Heeger, T.** (2004). Quallen, gefährliche Schönheiten, 1 edn (Stuttgart: S. Hierzel Verlag).
- Helms, A. W., Battiste, J., Henke, R. M., Nakada, Y., Simplicio, N., Guillemot, F. und Johnson, J. E.** (2005). Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons. *Development* 132, 2709-2719.
- Herlands, R. L. & Bode, H. R.** (1974a). The influence of tissue polarity on nematocyte migration in Hydra attenuata. *Dev Biol* 40, 323-339.
- Herlands, R. L. & Bode, H. R.** (1974b). Nematocyte migration in Hydra influenced by tissue polarity. *Nature* 248, 387-390.
- Hinz, U., Giebel, B. und Campos-Ortega, J. A.** (1994). The basic-helix-loop-helix domain of Drosophila lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* 76, 77-87.
- Hofrichter, R., ed.** (2003). Das Mittelmeer: Fauna, Flora, Ökologie (Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).

- Holstein, T. W.** (2003). Rätselhaft und spektakulär, die Cniden der Nesseltiere, In *Das Mittelmeer: Fauna, Flora, Ökologie*, R. Hofrichter, ed. (Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag), pp. 406-409.
- Holstein, T. W. & David, C. N.** (1990a). Cell cycle length, cell size, and proliferation rate in hydra stem cells. *Dev Biol* 142, 392-400.
- Holstein, T. W., & David, C. N.** (1990b). Putative intermediates in the nerve cell differentiation pathway in hydra have properties of multipotent stem cells. *Dev Biol* 142, 401-405.
- Holstein, T. W., Hobmayer, E. und Technau, U.** (2003). Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev Dyn* 226, 257-267.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. und Nakai, K.** (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35, W585-587.
- Horton, S., Meredith, A., Richardson, J. A. und Johnson, J. E.** (1999). Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1. *Mol Cell Neurosci* 14, 355-369.
- Hoshino, M.** (2006). Molecular machinery governing GABAergic neuron specification in the cerebellum. *Cerebellum* 5, 193-198.
- Hoshizaki, D. K., Hill, J. E. und Henry, S. A.** (1990). The *Saccharomyces cerevisiae* INO4 gene encodes a small, highly basic protein required for derepression of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* 265, 4736-4745.
- Huntley, G. W.** (2002). Dynamic aspects of cadherin-mediated adhesion in synapse development and plasticity. *Biol Cell* 94, 335-344.
- Huntley, G. W., Gil, O. und Bozdagi, O.** (2002). The cadherin family of cell adhesion molecules: multiple roles in synaptic plasticity. *Neuroscientist* 8, 221-233.
- Isaka, F., Ishibashi, M., Taki, W., Hashimoto, N., Nakanishi, S. und Kageyama, R.** (1999). Ectopic expression of the bHLH gene *Math1* disturbs neural development. *Eur J Neurosci* 11, 2582-2588.
- Jan, Y. N. & Jan, L. Y.** (1993). HLH Proteins, Fly Neurogenesis, and Vertebrate Myogenesis. *Cell* 75, 827-830.
- Jarman, A. P.** (2000). Developmental genetics: vertebrates and insects see eye to eye. *Curr Biol* 10, R857-859.
- Jarman, A. P.** (2002). Studies of mechanosensation using the fly. *Hum Mol Genet* 11, 1215-1218.
- Jarman, A. P. und Ahmed, I.** (1998). The specificity of proneural genes in determining *Drosophila* sense organ identity. *Mech Dev* 76, 117-125.
- Jarman, A. P., Brand, M., Jan, L. Y., und Jan, Y. N.** (1993a). The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in *Drosophila* neural precursors. *Development* 119, 19-29.
- Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1993b). *atonal* is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* 73, 1307-1321.
- Jarman, A. P., Grell, E. H., Ackerman, L., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1994). *Atonal* is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 369, 398-400.
- Jarman, A. P., Sun, Y., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1995). Role of the proneural gene, *atonal*, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* 121, 2019-2030.
- Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Keding, M. und Gradwohl, G.** (2002). *Neurogenin3* is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *Embo J* 21, 6338-6347.
- Kageyama, R., and Nakanishi, S.** (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 7, 659-665.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J. und Ohsawa, R.** (2005). Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* 306, 343-348.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T. und Tomita, K.** (2000). The bHLH gene *Hes1* regulates differentiation of multiple cell types. *Mol Cells* 10, 1-7.
- Kageyama, R., Sasai, Y., Akazawa, C., Ishibashi, M., Takebayashi, K., Shimizu, C., Tomita, K. und Nakanishi, S.** (1995). Regulation of mammalian neural development by helix-loop-helix transcription factors. *Crit Rev Neurobiol* 9, 177-188.
- Kameda, Y., Nishimaki, T., Miura, M., Jiang, S. X. und Guillemot, F.** (2007). *Mash1* regulates the development

of C cells in mouse thyroid glands. *Dev Dyn* 236, 262-270.

Kanekar, S., Perron, M., Dorsky, R., Harris, W. A., Jan, L. Y., Jan, Y. N. und Vetter, M. L. (1997). Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* 19, 981-994.

Karp, X. & Greenwald, I. (2004). Multiple roles for the E/Daughterless ortholog HLH-2 during *C. elegans* gonadogenesis. *Dev Biol* 272, 460-469.

Kasbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, C. N., Dall'armi, E., Staudigl, A., Stiening, B. und Bottger, A. (2007). The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*. *Dev Biol* 303, 376-390.

Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E. und Ang, S. L. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133, 495-505.

Khalturin, K., Anton-Erxleben, F., Milde, S., Plotz, C., Wittlieb, J., Hemmrich, G. und Bosch, T. C. (2007). Transgenic stem cells in *Hydra* reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self-renewal and differentiation. *Dev Biol* 309, 32-44.

Koizumi, O. & Bode, H. R. (1986). Plasticity in the nervous system of adult hydra. I. The position-dependent expression of FMRFamide-like immunoreactivity. *Dev Biol* 116, 407-421.

Koizumi, O., Mizumoto, H., Sugiyama, T. und Bode, H. R. (1990). Nerve net formation in the primitive nervous system of *Hydra*--an overview. *Neurosci Res Suppl* 13, S165-170.

Kokubu, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). Mash1 is required for neuroendocrine cell development in the glandular stomach. *Genes Cells* 13, 41-51.

Kondo, T. & Raff, M. (2000). Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Development* 127, 2989-2998.

Lassar, A. B. D., R.L.; Wright, W.E.; Kadesch, T.; Murre, C; Voronova, A; Baltimore, D und Weintraub, H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligodimerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305-315.

Ledent, V. & Vervoort, M. (2001). The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res* 11, 754-770.

Lee, C. S., Perreault, N., Brestelli, J. E. und Kaestner, K. H. (2002). Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes Dev* 16, 1488-1497.

Lee, J. E. (1997a). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7, 13-20.

Lee, J. E. (1997b). NeuroD and neurogenesis. *Dev Neurosci* 19, 27-32.

Lenhoff, H. M. und Brown, R. D. (1970). Mass culture of hydra: an improved method and its application to other aquatic invertebrates. *Lab Anim* 4, 139-154.

Leptin, M. (1991). twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* 5, 1568-1576.

Leptin, M. & Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73-84.

Lindgens, D., Holstein, T. W. und Technau, U. (2004). Hyzic, the *Hydra* homolog of the *zic*/odd-paired gene, is involved in the early specification of the sensory nematocytes. *Development* 131, 191-201.

Littlefield, C. L., Dunne, J. F. und Bode, H. R. (1985). Spermatogenesis in *Hydra oligactis*. I. Morphological description and characterization using a monoclonal antibody specific for cells of the spermatogenic pathway. *Dev Biol* 110, 308-320.

Littlefield, C. L., Finkemeier, C. und Bode, H. R. (1991). Spermatogenesis in *Hydra oligactis*. II. How temperature controls the reciprocity of sexual and asexual reproduction. *Dev Biol* 146, 292-300.

Lo, L., Guillemot, F., Joyner, A. L. und Anderson, D. J. (1994). MASH-1: a marker and a mutation for mammalian neural crest development. *Perspect Dev Neurobiol* 2, 191-201.

Lo, L., Sommer, L. und Anderson, D. J. (1997). MASH1 maintains competence for BMP2-induced neuronal differentiation in post-migratory neural crest cells. *Curr Biol* 7, 440-450.

Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T. und Anderson, D. J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest

cells. *Genes Dev* 5, 1524-1537.

Loomis, W. F. (1953). The cultivation of hydra under controlled conditions. *Science* 117, 565-566.

Loomis, W. F. (1954). Reversible induction of sexual differentiation in Hydra. *Science* 120, 145-146.

Lopez de Haro, M. S., Salgado, L. M., David, C. N. und Bosch, T. C. (1994). Hydra tropomyosin TROP1 is expressed in head-specific epithelial cells and is a major component of the cytoskeletal structure that anchors nematocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 6), 1403-1411.

Ma, Q., Kintner, C. und Anderson, D. J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.

Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P. und Anderson, D. J. (1997). Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J Neurosci* 17, 3644-3652.

Marambaud, P. & Robakis, N. K. (2005). Genetic and molecular aspects of Alzheimer's disease shed light on new mechanisms of transcriptional regulation. *Genes Brain Behav* 4, 134-146.

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z. et al. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J* 21, 1948-1956.

Marambaud, P., Wen, P. H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R. und Robakis, N. K. (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 114, 635-645.

Mariotti, A., Perotti, A., Sessa, C. und Ruegg, C. (2007). N-cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 451-465.

Massari, M. E. & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-440.

Meinhardt, H. (2002). The radial-symmetric hydra and the evolution of the bilateral body plan: an old body became a young brain. *Bioessays* 24, 185-191.

Meinhardt, H. (2004). Models for the generation of the embryonic body axes: ontogenetic and evolutionary aspects. *Curr Opin Genet Dev* 14, 446-454.

Meinhardt, H. (2008). Models of biological pattern formation: from elementary steps to the organization of embryonic axes. *Curr Top Dev Biol* 81, 1-63.

Mendias, C. L., Bakhurin, K. I. und Faulkner, J. A. (2008). Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 388-393.

Miller, M. A., Technau, U., Smith, K. M. und Steele, R. E. (2000). Oocyte development in Hydra involves selection from competent precursor cells. *Dev Biol* 224, 326-338.

Moore, L. B. & Campbell, R. D. (1973). Bud initiation in a non-budding strain of hydra: role of interstitial cells. *J Exp Zool* 184, 397-408.

Morrow, E. M., Furukawa, T., Lee, J. E. und Cepko, C. L. (1999). NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* 126, 23-36.

Muir, T., Sadler-Riggelman, I. und Skinner, M. K. (2005). Role of the basic helix-loop-helix transcription factor, scleraxis, in the regulation of Sertoli cell function and differentiation. *Mol Endocrinol* 19, 2164-2174.

Muller, P., Seipel, K., Yanze, N., Reber-Muller, S., Streitwolf-Engel, R., Stierwald, M., Spring, J. und Schmid, V. (2003). Evolutionary aspects of developmentally regulated helix-loop-helix transcription factors in striated muscle of jellyfish. *Dev Biol* 255, 216-229.

Murchison, N. D., Price, B. A., Conner, D. A., Keene, D. R., Olson, E. N., Tabin, C. J. und Schweitzer, R. (2007). Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development* 134, 2697-2708.

Murre, C., McCaw, P. S. und Baltimore, D. (1989a). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.

Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B. et al. (1989b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins

generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.

Mühlhardt, C. (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, Auflage 5.A. edn: Spektrum Akademischer Verlag).

Nakai, K. & Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24, 34-36.

Nakai, K. & Horton, P. (2007). Computational prediction of subcellular localization. *Methods Mol Biol* 390, 429-466.

Nguyen, L., Besson, A., Roberts, J. M. und Guillemot, F. (2006). Coupling cell cycle exit, neuronal differentiation and migration in cortical neurogenesis. *Cell Cycle* 5, 2314-2318.

Nikoloff, D. M., McGraw, P. und Henry, S. A. (1992). The INO2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a helix-loop-helix protein that is required for activation of phospholipid synthesis. *Nucleic Acids Res* 20, 3253.

Nishimiya-Fujisawa, C. & Sugiyama, T. (1993). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XX. Cloning of interstitial stem cells restricted to the sperm differentiation pathway in *Hydra magnipapillata*. *Dev Biol* 157, 1-9.

Nishimiya-Fujisawa, C. & Sugiyama, T. (1995). Genetic analysis of developmental mechanisms in Hydra. XXII. Two types of female germ stem cells are present in a male strain of *Hydra magnipapillata*. *Dev Biol* 172, 324-336.

Noda, K. (1971). Reconstruction of dissociated cells of hydra. *Zool Mag* 80, 99-101.

Noda, M., Nifuji, A., Tuji, K., Furuya, K., Ichiro, S., Asou, Y., Kawaguchi, N. und Yamachita, K. (1998). Transcription factors and osteoblasts. *Front Biosci* 3, d817-820.

Novak, P. L. & Wood, R. L. (1983). Development of the nematocyte junctional complex in hydra tentacles in relation to cellular recognition and positioning. *J Ultrastruct Res* 83, 111-121.

Ohno, S. (1970). *Evolution by Gene Duplication*: Springer Verlag.

Ohno, S. (1993). Patterns in genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* 3, 911-914.

Ohno, S. (1997). The reason for as well as the consequence of the Cambrian explosion in animal evolution. *J Mol Evol* 44 Suppl 1, S23-27.

Ohno, S. (1998). The notion of the Cambrian pananimalia genome and a genomic difference that separated vertebrates from invertebrates. *Prog Mol Subcell Biol* 21, 97-117.

Ohno, S. (1999). Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Semin Cell Dev Biol* 10, 517-522.

Ohno, S., Wolf, U. und Atkin, N. B. (1968). Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas* 59, 169-187.

Ohsawa, R., Ohtsuka, T. und Kageyama, R. (2005). Mash1 and Math3 are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. *J Neurosci* 25, 5857-5865.

Otto, J. J. & Campbell, R. D. (1977a). Budding in *Hydra attenuata*: bud stages and fate map. *J Exp Zool* 200, 417-428.

Otto, J. J. & Campbell, R. D. (1977b). Tissue economics of hydra: regulation of cell cycle, animal size and development by controlled feeding rates. *J Cell Sci* 28, 117-132.

Ozbek, S., Pokidysheva, E., Schwager, M., Schulthess, T., Tariq, N., Barth, D., Milbradt, A. G., Moroder, L., Engel, J. und Holstein, T. W. (2004). The glycoprotein NOWA and minicollagens are part of a disulfide-linked polymer that forms the cnidarian nematocyst wall. *J Biol Chem* 279, 52016-52023.

Pang, K., Matus, D. Q. und Martindale, M. Q. (2004). The ancestral role of COE genes may have been in chemoreception: evidence from the development of the sea anemone, *Nematostella vectensis* (Phylum Cnidaria; Class Anthozoa). *Dev Genes Evol* 214, 134-138.

Park, C. H., Kang, J. S., Kim, J. S., Chung, S., Koh, J. Y., Yoon, E. H., Jo, A. Y., Chang, M. Y., Koh, H. C., Hwang, S. et al. (2006). Differential actions of the proneural genes encoding Mash1 and neurogenins in Nurr1-induced dopamine neuron differentiation. *J Cell Sci* 119, 2310-2320.

Park, S. H., Yeo, S. Y., Yoo, K. W., Hong, S. K., Lee, S., Rhee, M., Chitnis, A. B. und Kim, C. H. (2003).

Zath3, a neural basic helix-loop-helix gene, regulates early neurogenesis in the zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 184-190.

Parkhurst, S. M., Lipshitz, H. D. und Ish-Horowicz, D. (1993). achaete-scute feminizing activities and *Drosophila* sex determination. *Development* 117, 737-749.

Parras, C. M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J. E., Nakafuku, M., Vescovi, A. und Guillemot, F. (2004). Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *Embo J* 23, 4495-4505.

Parras, C. M., Hunt, C., Sugimori, M., Nakafuku, M., Rowitch, D. und Guillemot, F. (2007). The proneural gene Mash1 specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes. *J Neurosci* 27, 4233-4242.

Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J. und Guillemot, F. (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16, 324-338.

Pattyn, A., Simplicio, N., van Doorninck, J. H., Goridis, C., Guillemot, F. und Brunet, J. F. (2004). Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci* 7, 589-595.

Perez, A. V., Perrine, M., Brainard, N. und Vogel, K. G. (2003). Scleraxis (Scx) directs lacZ expression in tendon of transgenic mice. *Mech Dev* 120, 1153-1163.

Ponting, C. P., Schultz, J., Milpetz, F. und Bork, P. (1999). SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res* 27, 229-232.

Quan, X. J., Denayer, T., Yan, J., Jafar-Nejad, H., Philippi, A., Lichtarge, O., Vleminckx, K. und Hassan, B. A. (2004). Evolution of neural precursor selection: functional divergence of proneural proteins. *Development* 131, 1679-1689.

Quan, X. J. & Hassan, B. A. (2005). From skin to nerve: flies, vertebrates and the first helix. *Cell Mol Life Sci* 62, 2036-2049.

Rao, V. R. & Finkbeiner, S. (2003). Secrets of a secretase: N-cadherin proteolysis regulates CBP function. *Cell* 114, 533-535.

Rodriguez, I., Hernandez, R., Modolell, J. und Ruiz-Gomez, M. (1990). Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *Embo J* 9, 3583-3592.

Ross, S. E., Greenberg, M. E. und Stiles, C. D. (2003). Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39, 13-25.

Rubin, D. I. & Bode, H. R. (1982a). Both the epithelial cells and the nerve cells are involved in the head inhibition properties in *Hydra attenuata*. *Dev Biol* 89, 332-338.

Rubin, D. I. & Bode, H. R. (1982b). Nematocyte developmental in *Hydra attenuata* is dependent on both the interstitial cells and the epithelial cells. *Dev Biol* 90, 306-314.

Sambrook, J. R., D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Lab edition (January 15, 2001 edn: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Satoh, A., Nakada, Y., Suzuki, M., Tamura, K. und Ide, H. (2006). Analysis of scleraxis and dermo-1 genes in a regenerating limb of *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* 235, 1065-1073.

Schmidt, H. A., Strimmer, K., Vingron, M. und von Haeseler, A. (2002). TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18, 502-504.

Schmidt, T. and David, C. N. (1986). Gland cells in *Hydra*: cell cycle kinetics and development. *J Cell Sci* 85, 197-215.

Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. & Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* 28, 231-234.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5857-5864.

Schwitzgebel, V. M. (2001). Programming of the pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 185, 99-108.

Seipel, K. and Schmid, V. (2005). Evolution of striated muscle: jellyfish and the origin of triploblasty. *Dev Biol* 282, 14-26.

Seipel, K., Yanze, N. und Schmid, V. (2004a). Developmental and evolutionary aspects of the basic helix-loop-

- helix transcription factors Atonal-like 1 and Achaete-scute homolog 2 in the jellyfish. *Dev Biol* 269, 331-345.
- Seipel, K., Yanze, N. und Schmid, V.** (2004b). The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Int J Dev Biol* 48, 1-7.
- Shimizu, H., Takaku, Y., Zhang, X. und Fujisawa, T.** (2007). The aboral pore of hydra: evidence that the digestive tract of hydra is a tube not a sac. *Dev Genes Evol* 217, 563-568.
- Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M. und Hiraki, Y.** (2006). Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol* 298, 234-247.
- Simionato, E., Ledent, V., Richards, G., Thomas-Chollier, M., Kerner, P., Coornaert, D., Degnan, B. M. und Vervoort, M.** (2007). Origin and diversification of the basic helix-loop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. *BMC Evol Biol* 7, 33.
- Skaer, N., Pistillo, D., Gibert, J. M., Lio, P., Wulbeck, C. und Simpson, P.** (2002). Gene duplication at the achaete-scute complex and morphological complexity of the peripheral nervous system in Diptera. *Trends Genet* 18, 399-405.
- Slautterback, D. B.** (1963). Cytoplasmic Microtubules. I. Hydra. *J Cell Biol* 18, 367-388.
- Slautterback, D. B.** (1967). The cnidoblast-musculoepithelial cell complex in the tentacles of hydra. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 79, 296-318.
- Smid, I. & Tardent, P.** (1984). Migration of I-cells from ectoderm to endoderm in *Hydra attenuata* Pall (Cnidaria, Hydrozoa) and their subsequent differentiation. *Dev Biol* 106, 469-477.
- Solnica-Krezel, L.** (2006). Gastrulation in zebrafish -- all just about adhesion? *Curr Opin Genet Dev* 16, 433-441.
- Sommer, L., Ma, Q. & Anderson, D. J.** (1996). neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 8, 221-241.
- Sommer, L., Shah, N., Rao, M. und Anderson, D. J.** (1995). The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis. *Neuron* 15, 1245-1258.
- Sproull, F. & David, C. N.** (1979). Stem cell growth and differentiation in *Hydra attenuata*. II. Regulation of nerve and nematocyte differentiation in multiclonal aggregates. *J Cell Sci* 38, 171-179.
- Srivastava, D., Cserjesi, P. und Olson, E. N.** (1995). A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* 270, 1995-1999.
- Steele, R. E.** (2002). Developmental signaling in Hydra: what does it take to build a „simple“ animal? *Dev Biol* 248, 199-219.
- Steele, R. E.** (2006). Trembley's polyps go transgenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6415-6416.
- Storch, V.** (1993). *Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum/ von Volker Storch und Ulrich Welsch, 21 edn* (Stuttgart, Jena: Gustav Fischer Verlag).
- Takahashi, T., Hatta, M., Yum, S., Gee, L., Ohtani, M., Fujisawa, T. und Bode, H. R.** (2005). Hym-301, a novel peptide, regulates the number of tentacles formed in hydra. *Development* 132, 2225-2234.
- Takahashi, T., Koizumi, O., Ariura, Y., Romanovitch, A., Bosch, T. C., Kobayakawa, Y., Mohri, S., Bode, H. R., Yum, S., Hatta, M. und Fujisawa, T.** (2000). A novel neuropeptide, Hym-355, positively regulates neuron differentiation in Hydra. *Development* 127, 997-1005.
- Takahashi, T., Muneoka, Y., Lohmann, J., Lopez de Haro, M. S., Solleder, G., Bosch, T. C., David, C. N., Bode, H. R., Koizumi, O., Shimizu, H. et al.** (1997). Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in hydra: LWamide and PW families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1241-1246.
- Takeichi, M. & Abe, K.** (2005). Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol* 15, 216-221.
- Tamai, K. K. & Nishiwaki, K.** (2007). bHLH transcription factors regulate organ morphogenesis via activation of an ADAMTS protease in *C. elegans*. *Dev Biol* 308, 562-571.
- Tardent, P. & Holstein, T.** (1982). Morphology and morphodynamics of the stenotele nematocyst of *Hydra attenuata* Pall. (Hydrozoa, Cnidaria). *Cell Tissue Res* 224, 269-290.
- Taylor, J. S. & Raes, J.** (2004). Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu*

Rev Genet 38, 615-643.

Technau, U. (2001). Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm. *Bioessays* 23, 788-794.

Technau, U. & Bode, H. R. (1999). HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in Hydra. *Development* 126, 999-1010.

Technau, U., Cramer von Laue, C., Rentzsch, F., Luft, S., Hobmayer, B., Bode, H. R. und Holstein, T. W. (2000). Parameters of self-organization in Hydra aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12127-12131.

Technau, U., Rudd, S., Maxwell, P., Gordon, P. M., Saina, M., Grasso, L. C., Hayward, D. C., Sensen, C. W., Saint, R., Holstein, T. W. et al. (2005). Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians. *Trends Genet* 21, 633-639.

Technau, U. & Scholz, C. B. (2003). Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *Int J Dev Biol* 47, 531-539.

Tepass, U. (1999). Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 11, 540-548.

Teragawa, C. K. & Bode, H. R. (1995). Migrating interstitial cells differentiate into neurons in hydra. *Dev Biol* 171, 286-293.

Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F. und Kageyama, R. (2000). Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *Embo J* 19, 5460-5472.

Tomita, K., Nakanishi, S., Guillemot, F. und Kageyama, R. (1996). Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina. *Genes Cells* 1, 765-774.

Uemura, K., Kuzuya, A. und Shimohama, S. (2004). Protein trafficking and Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 1, 1-10.

Van Doren, M., Powell, P. A., Pasternak, D., Singson, A. und Posakony, J. W. (1992). Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of achaete is antagonized by extramacrochaetae. *Genes Dev* 6, 2592-2605.

Veit, M. (2005) Charakterisierung eines PS-1 und eines APP Homologs in Hydra magnipapillata, Darmstadt.

Venugopal, G. & David, C. N. (1981a). Nerve commitment in Hydra. I. Role of morphogenetic signals. *Dev Biol* 83, 353-360.

Venugopal, G. & David, C. N. (1981b). Spatial pattern of nerve differentiation in Hydra is due to a pattern of nerve commitment. *Dev Biol* 83, 366-369.

Vervoort, M. & Ledent, V. (2001). The evolution of the neural basic Helix-Loop-Helix proteins. *ScientificWorldJournal* 1, 396-426.

Vetter, M. L. & Brown, N. L. (2001). The role of basic helix-loop-helix genes in vertebrate retinogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12, 491-498.

Wang, S. Z., Dulin, J., Wu, H., Hurlock, E., Lee, S. E., Jansson, K. und Lu, Q. R. (2006). An oligodendrocyte-specific zinc-finger transcription regulator cooperates with Olig2 to promote oligodendrocyte differentiation. *Development* 133, 3389-3398.

Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.

Wilson-Rawls, J., Rhee, J. M. und Rawls, A. (2004). Paraxis is a basic helix-loop-helix protein that positively regulates transcription through binding to specific E-box elements. *J Biol Chem* 279, 37685-37692.

Wittlieb, J., Khalturin, K., Lohmann, J. U., Anton-Erxleben, F. und Bosch, T. C. (2006). Transgenic Hydra allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6208-6211.

Wood, R. L. & Novak, P. L. (1982). The anchoring of nematocysts and nematocytes in the tentacles of hydra. *J Ultrastruct Res* 81, 104-116.

Yaross, M. S. & Bode, H. R. (1978a). Regulation of interstitial cell differentiation in Hydra attenuata. III. Effects of I-cell and nerve cell densities. *J Cell Sci* 34, 1-26.

Yaross, M. S. & Bode, H. R. (1978b). Regulation of interstitial cell differentiation in Hydra attenuata. IV. Nerve cell commitment in head regeneration is position-dependent. *J Cell Sci* 34, 27-38.

- Yaross, M. S. & Bode, H. R.** (1978c). Regulation of interstitial cell differentiation in *Hydra attenuata*. V. Inability of regenerating head to support nematocyte differentiation. *J Cell Sci* 34, 39-52.
- Yeghiazaryan, K., Turhani-Schatzmann, D., Labudova, O., Schuller, E., Olson, E. N., Cairns, N. und Lubec, G.** (1999). Downregulation of the transcription factor scleraxis in brain of patients with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 57, 305-314.
- Yoshida, S., Ohbo, K., Takakura, A., Takebayashi, H., Okada, T., Abe, K. und Nabeshima, Y.** (2001). Sgn1, a basic helix-loop-helix transcription factor delineates the salivary gland duct cell lineage in mice. *Dev Biol* 240, 517-530.
- Zhang, J. M., Chen, L., Krause, M., Fire, A. und Paterson, B. M.** (1999). Evolutionary conservation of MyoD function and differential utilization of E proteins. *Dev Biol* 208, 465-472.

Danksagung

Allen denen es gebührt: DANKE!

Ich bedanke mich bei Katja Seipel und Volker Schmid (Basel), die mich großzügig mit dem verwendeten Two Hybrid-Köderkonstrukt unterstützten sowie Angelika Böttger (München), Bert Hobmayer (Innsbruck), Toshi Fujisawa (Nishima/Heidelberg) und Ulrich Technau (Wien) für Kooperation und sämtliche Diskussionen zum Thema Hydra und Wissenschaft.

Meinen herzlicher Dank gilt den Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgruppe Holstein in Darmstadt und dem Holstein-Labor in Heidelberg (extended family), die mit mir Küche (= Seminarraum/Mensa/Brötchenbar), Wohn- und Arbeitszimmer (= Labor) und nachts manchmal auch den Schlafplatz (= Schreibtisch) teilten. Vielen lieben Dank an Andrea Busch, die mir half den Tücken der deutschen Rechtschreibung auszuweichen und immer eine Tasse Tee und ein offenes Ohr für mich übrig hatte. Letzteres gilt natürlich auch für meine Box- und Bench-Mates in Heidelberg.

Ich bin mir sicher, dass ich diese Arbeit nicht ohne die beständige Aufmunterung, Unterstützung, Fürsorge und Geduld der vier großen „T“s (in austauschbarer Reihenfolge: Thomas, Tobi, Toblerone und Tee) durchzuführen war und bedanke mich herzlich bei Suat Özbek, Gabriele Petersen, Anne Kuhn und Jutta Tennigkeit für ihre technische Hilfe und die Initiation in die „wunderbare Welt“ der Proteine und Antikörper sowie bei Hiroshi Watanabe für hilfreiche Tipps und Tricks im täglichen Laborwahnsinn.

Meinem Doktorvater danke ich für alle Herausforderungen an denen ich wachsen durfte und die meine Neugier hungrig hielten, für gute Bücher, Talisker in Barcelona und die Möglichkeit zu dieser Arbeit.

DANKE.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Bianca Bertulat
Geburtsdatum	26. Dezember 1975
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Arbeitserfahrung

01.01.2005-31.03.2008

*Universität Heidelberg
Institut für Zoologie
Molekulare Evolution & Genomik*

Wissenschaftlicher Mitarbeiter

01.04.2002- 31.12.2004

*Technische Universität Darmstadt
Institut für Zoologie
Zell- & Entwicklungsbiologie*

Wissenschaftlicher Mitarbeiter

2000-2002

*Technische Universität Darmstadt
Insitut für Zoologie*

Wissenschaftliche Hilfskraft

15.08.1996-15.03.2000

*RCC
Cytotest Cell Research GmbH
Rossdorf, Deutschland*

mikroskopische Auswertung

Ausbildung

2002-2008

*Technische Universität Darmstadt
Fachbereich Biologie*

Promotionsstudium

1995-2002

*Technische Universität Darmstadt
Fachbereich Biologie*

Diplom-Biologe

(Identifikation von HyBra1-Bindungspartnern in einem „Two-Hybrid-Screen“)

Hauptfächer

Entwicklungs- & Zellbiologie
Genetik
Tierphysiologie

1995

*Alfred-Delp-Oberstufengymnasium
Dieburg*

Abitur

Zusatzqualifikationen

**Deutsches Tauchsportabzeichen, Bronze
(CMAS *)**