

# **Identifikation und funktionelle Analyse von Genen, die den Lebenszyklus von *Aurelia aurita* kontrollieren**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

**Björn Steffen Fuchs**

Kiel, den 2. September 2010

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch  
Koreferent: PD Dr. Konstantin Khalturin  
Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Metamorphose im Tierreich .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Aurelia aurita - ein Genom mit drei verschiedenen Morphotypen: Planularlarve, Polyp und Meduse .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Die Strobilation von <i>Aurelia aurita</i> .....	7
1.2.2 Fertilisation und Embryogenese von <i>Aurelia aurita</i> .....	9
<b>1.3 Cnidaria als Modellsystem.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Lebenszyklus und epigenetische Regulation .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Zielsetzung.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Ergebnisse .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Phylogeographie der verwendeten <i>Aurelia aurita</i> Linien .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Einsicht in die differentielle Genexpression während des Lebenszyklus von <i>Aurelia aurita</i> .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 454-Sequenzierung und <i>de novo</i> Assemblierung des Transkriptoms von <i>Aurelia aurita</i> .....	17
2.2.2 Analyse der differentiellen Genexpression von verschiedenen Lebensstadien: Polyp, Strobila und Ephyra .....	19
2.2.3 Selektion weiterer Kandidatengene für die Untersuchung des Prozesses der Strobilation .....	22
2.2.4 Etablierung eines Protokolls zur <i>whole mount in situ</i> Hybridisierung an <i>Aurelia aurita</i> .....	29
2.2.5 Strobilationsspezifische Gene .....	32
2.2.6 Spezifische Gene des Polypen und der Ephyra .....	40
2.2.7 Stammzellspezifische Gene .....	44
2.2.8 Nervensystemspezifische Gene .....	45
<b>2.3 Epigenetische Inhibition der Metamorphose .....</b>	<b>47</b>
<b>2.4 Mikroarray-Hybridisierung zur weiteren Analyse der Strobilation.....</b>	<b>49</b>
2.4.1 Mikroarray-Erstellung, Hybridisierung und mRNA-Präparation.....	49
2.4.2 Auswertung der Mikroarray-Hybridisierung.....	50
<b>2.5 Generierung transgener <i>Aurelia aurita</i> .....</b>	<b>55</b>
2.5.1 454-Sequenzierung und <i>de novo</i> Assemblierung des Transkriptoms von <i>Aurelia aurita</i> aus der Ostsee .....	55
2.5.2 Identifizierung und Auswahl von konstitutiv exprimierten Genen .....	56
2.5.3 Amplifikation von Promotoren und Terminatoren von konstitutiv exprimierten Genen.....	57
2.5.4 Konstrukte .....	58
2.5.5 Injektion von Reporter-Konstrukten in Zygoten und Embryonalstadien von <i>Aurelia aurita</i> .....	60
2.5.6 Injektion linearisierter Konstrukte und genomischer DNA.....	61
2.5.7 Generierung transgener <i>Aurelia aurita</i> durch die Verwendung von Minos-Transposase .....	62
2.5.8 Injektion von GFP-mRNA .....	62
2.5.9 Transgene <i>Aurelia aurita</i> .....	62
2.5.10 KLSM-Mikroskopie der transient transgenen Polypen von <i>Aurelia aurita</i> .....	65

2.5.11 Extraktion genomischer DNA zur Überprüfung der Integration von Reporter-Konstrukten.....	66
2.5.12 Elektroporation.....	67
<b>3. Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1 Veränderungen des Nervensystems während der Strobilation .....</b>	<b>68</b>
<b>3.2 Stammzellen und deren Einfluss auf die Differenzierungsprozesse innerhalb der Metamorphose .....</b>	<b>70</b>
<b>3.3 Differentielle Genexpression innerhalb der verschiedenen Lebensstadien: Polyp, Strobila und Ephyra.....</b>	<b>72</b>
<b>3.4 Differentielle Genexpression während der Strobilation von <i>Aurelia aurita</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>3.5 Epigenetische Inhibition der Strobilation.....</b>	<b>78</b>
<b>3.6 Transgene <i>Aurelia aurita</i> .....</b>	<b>80</b>
<b>3.7 Ausblick.....</b>	<b>82</b>
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>85</b>
<b>5. Summary.....</b>	<b>86</b>
<b>6. Material .....</b>	<b>87</b>
<b>6.1 Verwendete Organismen .....</b>	<b>87</b>
<b>6.2 Chemikalien.....</b>	<b>87</b>
<b>6.3 Medien .....</b>	<b>89</b>
<b>6.4 Lösungen.....</b>	<b>89</b>
<b>6.5 Enzyme .....</b>	<b>90</b>
<b>6.6 Vektoren .....</b>	<b>91</b>
<b>6.7 Antikörper.....</b>	<b>91</b>
<b>6.8 Kits.....</b>	<b>91</b>
<b>6.9 Oligonukleotide (Primer) .....</b>	<b>92</b>
<b>6.10 Geräte.....</b>	<b>92</b>
6.10.1 PCR-Maschinen (Thermocycler) .....	92
6.10.2 Gelelektrophorese-Kammern und Netzgeräte .....	92
6.10.3 Inkubatoren.....	92
6.10.4 UV-Geräte .....	92
6.10.5 Elektroporation.....	93
6.10.6 Zentrifugen.....	93
6.10.7 Mikroskope .....	93
6.10.8 Weitere Geräte .....	93
<b>6.11 Weitere Materialien .....</b>	<b>94</b>
<b>6.12 Computerprogramme und Datenbanken .....</b>	<b>94</b>
6.12.1 Datenbanken .....	94
6.12.2 Sequenzanalyse-Software .....	94
6.12.3 Weitere Software.....	95
<b>7. Methoden.....</b>	<b>96</b>
<b>7.1 Hälterung von <i>Aurelia aurita</i> .....</b>	<b>96</b>



7.1.1 Induktion der Strobilation von <i>Aurelia aurita</i> .....	96
7.1.2 Induktion der Fertilisation von <i>Aurelia aurita</i> .....	96
7.1.3 Inhibition der Strobilation mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-2- Deoxycytidin .....	97
<b>7.2 Isolation von Nukleinsäuren.....</b>	<b>97</b>
7.2.1 Isolation von mRNA aus Polypen, Strobilae und Ephyrae von <i>Aurelia aurita</i> .....	97
7.2.2 Isolation von gDNA aus Polypen von <i>Aurelia aurita</i> .....	97
7.2.3 Isolation von Plasmid-DNA.....	98
7.2.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	98
7.2.5 Synthese einzelsträngiger cDNA .....	98
7.2.6 Synthese doppelsträngiger cDNA .....	99
7.2.7 Splinkerettensynthese und -ligation .....	99
<b>7.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....</b>	<b>100</b>
7.3.1 Standard-PCR .....	100
7.3.2 PCR zur Reamplifikation spezifischer Produkte .....	101
7.3.3 Splinkeretten-PCR .....	101
7.3.4 Insert-Check-PCR.....	103
<b>7.4 Agarose-Gelelektrophorese .....</b>	<b>103</b>
7.4.1 Aufreinigung und Exktraktion von PCR-Amplifikaten .....	103
<b>7.5 Elektrokompente Zellen.....</b>	<b>103</b>
<b>7.6 Klonierung .....</b>	<b>104</b>
<b>7.7 Lagerung von Bakterien-Kulturen.....</b>	<b>104</b>
<b>7.8 Sequenzierung von DNA und mRNA.....</b>	<b>104</b>
7.8.1 454-Sequenzierung des Transkriptoms .....	104
7.8.2 Sequenzierung von DNA .....	105
<b>7.9 Generierung transgener <i>Aurelia aurita</i> .....</b>	<b>105</b>
7.9.1 Konstrukte .....	105
7.9.2 Injektionsabfolge und Injektionstechnik.....	106
7.9.3 Elektroporation von <i>Aurelia aurita</i> .....	107
<b>7.10 Expressionsanalyse mit der <i>whole mount in situ</i> Hybridisierung .....</b>	<b>107</b>
7.10.1 Präparation der DIG-markierten Sonden .....	107
7.10.2 <i>Whole mount in situ</i> Hybridisierung .....	107
7.10.3 Präparation doppelsträngiger RNA.....	109
<b>7.11 Mikroarray .....</b>	<b>109</b>
7.11.1 mRNA-Extraktion.....	109
7.11.2 Mikroarray-Erstellung und -Hybridisierung.....	109
<b>7.12 Histologische Methoden .....</b>	<b>110</b>
7.12.1 Vorbereitung von Polypen für das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM) .	110
7.12.2 Immunmarkierung für das KLSM.....	110
<b>8. Referenzen .....</b>	<b>112</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>117</b>
9.1 Gene und Sonden der <i>in situ</i> Hybridisierung .....	117
9.2 Sequenzen der potentielle Promotoren und Terminatoren .....	140
9.3 Reporter-Konstrukte.....	148
9.4 Inhibition der Strobilation mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-CdR .....	163
9.5 Übersicht über die Injektionen der Reporter-Konstrukte .....	165

<b>9.6 16S rDNA Sequenzen der <i>Aurelia aurita</i> Linien .....</b>	<b>166</b>
<b>9.7 Oligonucleotide (Primer).....</b>	<b>168</b>
<b>9.8 Elektronische Daten .....</b>	<b>170</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>171</b>
<b>11. Erklärung.....</b>	<b>172</b>

## Abkürzungen

Aufgeführt sind die, in dieser Arbeit verwendeten, Abkürzungen, außer der in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten. Nukleinbasen wurden in dem gebräuchlichen Ein-Buchstaben-Code abgekürzt.

A	Arginin
5-Aza-CdR	5-Aza-2-Deoxycytidine
AA	engl.: <i>amino acid</i>
AB	engl.: <i>antibody</i>
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ASW	engl.: <i>artificial sea water</i>
bc	engl.: <i>baltic sea</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
blastn	engl.: <i>basic local alignment search tool for nucleotides</i>
blastx	engl.: <i>basic local alignment search tool for ranslated nucleotides</i>
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
DIG	Digoxygenin
Cl	engl.: <i>cluster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	engl.: <i>deoxynucleotide triphosphate</i>
Ep	Ephyra
EST(s)	engl.: <i>Expressed Sequence Tag(s)</i>
ISH	<i>whole mount in situ</i> Hybridisierung
MAB	Maleinsäure-Puffer
Minos ITRs	engl.: <i>Minos inverted terminal repeats</i>

mRNA	engl.: <i>messenger</i> RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	engl.: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD600	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	engl.: <i>open reading frame</i>
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
Po	Polyp
RACE	engl.: <i>rapid amplification of cDNA-ends</i>
Rc	Roscoff (Atlantik)
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i>
RNAi	engl.: <i>double-stranded RNA-mediated interference</i>
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SMART	engl.: <i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
St	Strobila
T <sub>A</sub>	Annealing Temperatur der Primer
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGICL	engl.: <i>TIGR Gene Indices clustering tools</i>
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur des Primers
tRNA	engl.: <i>transfer</i> RNA
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X	beliebige Aminosäure

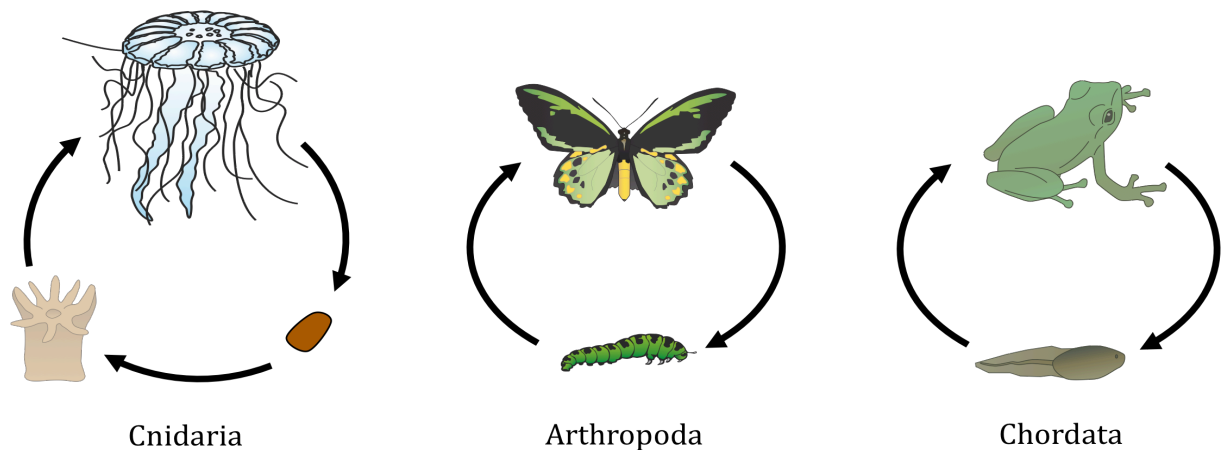
## 1. Einleitung

### 1.1 Metamorphose im Tierreich

Die Metamorphose beschreibt den markanten Gestaltwandel einer Larve in ein morphologisch und ökologisch stark abweichendes, meist geschlechtsreifes Adultstadium. Die ursprüngliche Metamorphose innerhalb der Eumetazoa stellt die Umwandlung der Planularlarve basaler Cnidaria zum Polypen dar. Während die Anthozoen lediglich eine Metamorphose zum Polypen vollziehen, existiert bei den Hydrozoen, den Scyphozoen und den Cubozoen noch eine weitere Metamorphose zur geschlechtlichen Meduse (Gilbert & Raunio, 1997). Polyp und Meduse bilden bei den Hydrozoen und den Scyphozoen die aufeinanderfolgenden Stadien der Metagenese. Die Medusen entstehen dabei ungeschlechtlich durch Strobilation (Scyphozoa) oder durch Knospung (Hydrozoa). Bei den Cubozoa wird der komplette Polyp zur Meduse umgestaltet. Ein Generationswechsel findet dabei nicht statt (Wehner & Gering, 1995). Eine weitere Ausnahme bildet die Ordnung Trachylina (Hydrozoa), die kein Polypenstadium ausbildet und deren Planularlarven direkt oder über das Actinularven-Stadium zu Medusen metamorphosieren. Tentakeltragende Actinularlarven kommen auch als Übergangsstadium zwischen der Planularlarve und dem Polypen bei den Hydrozoa (Hydrozoa) vor (Gilbert & Raunio, 1997). Die Reduktion einzelner Stadien während der Metagenese kann nicht nur den Polypen, sondern auch die Meduse betreffen, welche dann in Form sessiler, stark reduzierter Medusoide auftritt. Bei der Gattung *Hydra* (Hydrozoa) werden sogar keine Medusoide oder Gonophoren mehr gebildet, die Keimzellen entwickeln sich stattdessen in Vorwölbungen der Körperwand (Wehner & Gering 1995). Süßwasserpolyphen repräsentieren sowohl die geschlechtliche, als auch die ungeschlechtliche Generation. Interessant ist zudem, dass die Embryogenese von *Hydra* nicht in einem Planularlarven-Stadium mündet. Nach der Gastrulation wird der Embryo von einer dicken, schützenden Membran umhüllt, aus der nach 2-24 Wochen der Polyp schlüpft (Martin *et al.*, 1997).

Die morphologischen Aspekte der Metamorphosen der Cnidaria (Abb. 1.1) wurden bereits vielfach veröffentlicht, aber über die molekularen Mechanismen zur Induktion und Steuerung der Metamorphose ist bislang nichts bekannt. Die nächsten phylogenetischen Gruppen, in denen eine ausführlich studierte Metamorphose auftritt,

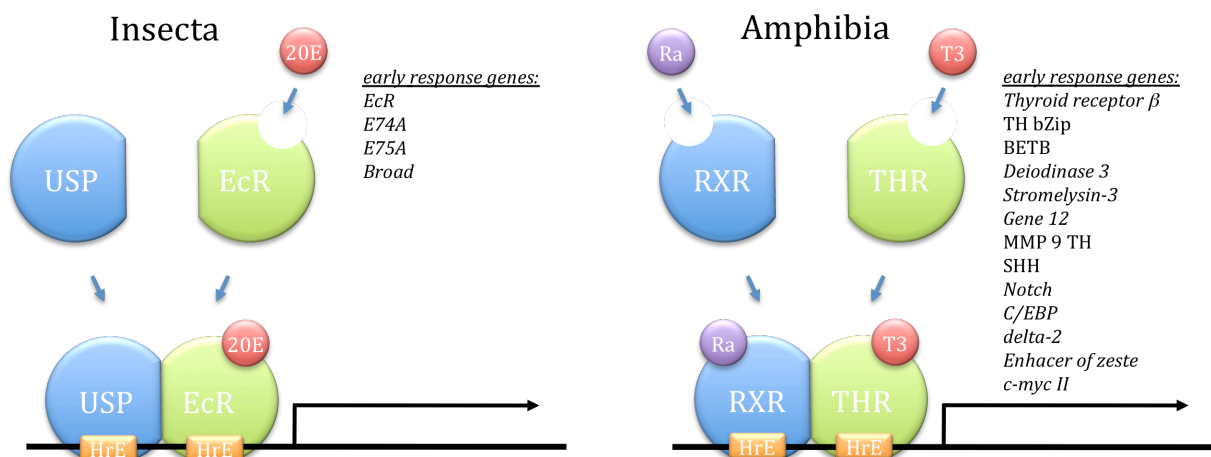
sind die Insekten und Amphibien (Abb. 1.1). Im Gegensatz zu der Metamorphose der Cnidaria, sind die molekularen Prozesse zur Induzierung und Steuerung der Metamorphose bei den Insekten und Amphibien sehr gut untersucht.



**Abb. 1.1:** Formen der Metamorphose bei Cnidaria, Arthropoda und Chordata mit den jeweiligen Lebensstadien. Cnidaria: Meduse, Planula, Polyp; Arthropoda: Schmetterling, Raupe; Chordata: Frosch, Kaulquappe.

Bei den Insekten werden die Metamorphose und das Häuten durch zwei Hormone kontrolliert: das Steroidhormon 20-Hydroxyecdyson (20E) aus der Prothoracaldrüse und das Juvenilhormon (JH) aus den *Corpora allata*. 20E initiiert und koordiniert jede Häutung und reguliert die Genexpression während der Metamorphose. Das Juvenilhormon hemmt hingegen die von 20-Hydroxyecdyson induzierten Veränderungen der Genexpression im Verlauf der Metamorphose. Der Gehalt des Juvenilhormons nimmt mit jeder Metamorphose ab und determiniert dadurch das nächstgrößere Larvenstadium. Ist von dem Juvenilhormon nur noch eine geringe Menge vorhanden, setzt die finale Metamorphose zur Imago ein. Der Zeitpunkt der Häutungen wird durch ein weiteres Hormon induziert, das neurosekretorische Zellen des Gehirns freisetzen. Dieses prothorakotrope Hormon (PTTH) stimuliert die Produktion von Ecdyson, das anschließend im peripheren Gewebe zur aktiven Form 20E modifiziert wird. Bei *Drosophila melanogaster* (Arthropoda) treten zwei große Pulse von 20E während der Metamorphose auf. 20E bindet dabei an den Ecdysonrezeptor (EcR), welcher ein Dimer mit Ultraspiracle (USP) bildet. Das Heterodimer initiiert daraufhin die Transkription von Zielgenen für die Metamorphose durch die Bindung an *hormone responsive elements* (HrE) in der DNA. Ist kein 20E vorhanden, bindet das USP Protein an

die von Ecdyson induzierten Gene und verhindert auf diese Weise ihre Transkription. Der erste Puls von 20E während des dritten Larvenstadiums löst die Morphogenese der Imaginalscheiben aus. Durch die Aktivierung des EcR/USP-Rezeptorkomplexes wird die Expression der *early response genes* *E74A*, *E75A*, *Broad* und auch des *EcRs* aktiviert (Abb. 1.2). Die Transkriptionsfaktoren dieser Gene initiieren die Aktivierung einer zweiten Serie von Genen: *E75B*, *DHR4* und *DHR3*. Zusammen veranlassen sie die Transkription von  $\beta$ -*FTZ-F1*, einem Transkriptionsfaktor, der das Chromatin modifiziert und die Expression weiterer Gene nach dem zweiten Puls von 20E ermöglicht. Darüber hinaus inaktivieren sie die Expression der *early response genes*, sodass diese nicht weiter in der darauf folgenden Entwicklung interferieren. Der zweite Puls von 20E erfolgt 10-12 Stunden nach dem ersten und initiiert die Verpuppung. Mit jedem der Pulse von 20E wird die Transkription zusätzlicher *late genes* aktiviert (zusammengefasst aus Gilbert, 2002 und Gilbert & Singer 2006).



**Abb. 1.2:** Die Aktivierung des Ecdyson- und des Thyroidhormonrezeptors und die dadurch initiierte Genexpression. Der Ecdysonrezeptor der Insecta wird durch 20-Hydroxyecdysol aktiviert und dimerisiert daraufhin mit Ultraspiracle. Das Heterodimer bindet an die *hormone responsive elements* der Zielgene (*early response genes*) und aktiviert deren Transkription. Der Thyroidhormonrezeptor der Amphibia wird durch Triiodthyronin aktiviert und dimerisiert mit einem zuvor mit Retinsäure aktivierten Retinoic-X-Rezeptor. Das Heterodimer bindet daraufhin an die *hormone responsive elements* der Zielgene (*early response genes*) und aktiviert deren Transkription. EcR: Ecdysonrezeptor, USP: Ultraspiracle, 20E: 20-Hydroxyecdysol, THR: Thyroidhormonrezeptor, RXR: Retinoic-X-Rezeptor, Ra: Retinsäure, T3: Triiodthyronin, HrE: *hormone responsive element*.

Interessanterweise ist die Metamorphose der Amphibien über eine ähnlich molekulare Kaskade reguliert wie die der Insekten. Bei Amphibien sind die Schilddrüsenhormone L-

Thyroxin (T4) und 3,5,3'-L-Triiodthyronin (T3) für die Metamorphose der Kaulquappe zum Frosch verantwortlich. Sie beeinflussen die Entwicklung des zentralen Nervensystems, des Skeletts, des Herzes, des Darms, der Skelettmuskulatur und der sensorischen Organe. T3 aktiviert den Thyroidhormonrezeptor (THR), der mit dem durch Retinsäure (engl. Ra) aktivierten Retinoic-X-Rezeptor (RXR) heterodimerisiert. Dieses Dimer bindet anschließend mit Co-Aktivatorproteinen an die *hormone responsive elements* (HrE) in den Promotor-Regionen der Zielgene für die Metamorphose. Ist kein T3 vorhanden, interagiert der Thyroidhormonrezeptor mit Co-Repressorproteinen, welche daraufhin die Transkription inhibieren (zusammengefasst aus Übersichtsartikel Kress *et al.*, 2009). Die Metamorphose von Fröschen kann aktiv durch die Zugabe von T3 initiiert werden oder durch die Zugabe von Methimazol, einem Inhibitor, der die Synthese von Schilddrüsenhormonen blockiert, verhindert werden (Brown & Cai, 2007). Im natürlichen Entwicklungsverlauf wird durch Prolactin aus der Hypophyse die Metamorphose der Kaulquappe verhindert. Veränderungen der Umwelt, wie eine Zunahme des Nahrungsangebots, führen zur Freisetzung des Thyreotropin-Realising-Hormons durch den Hypothalamus, das die Hypophyse zur Sekretion von Thyreotropin anregt. Dieses wiederum stimuliert die Schilddrüse zur Sekretion von T3 und T4, wodurch die Metamorphose initiiert wird. Einige der direkt durch T3 aktivierten Gene sind: der *Thyroid receptor  $\beta$* , *TH bZip*, *BETB*, *deiodinase 3*, *stromelysin-3*, *gene 12*, *MMP 9*, *TH*, *SHH*, *notch*, *C/EBP delta-2*, *enhancer of zeste* und *c-myc II* (Abb. 1.2) (Brown & Cai, 2007). Zudem halten T3 und T4 über eine positive Rückkopplung auf den Hypothalamus und die Hypophyse die Synthese des Thyreotropin-Realising-Hormons und des Thyreotropins aufrecht (Wolpert, 1999).

Aber wie wird die Metamorphose an der evolutionären Basis der Eumetazoa bei den Cnidaria molekular induziert und gesteuert? Interessanterweise gehört der EcR der Insekten zur selben Gruppe von Hormonrezeptoren wie der Thyroidhormonrezeptor der Amphibien, zudem stellt USP ein Homolog des Retinoic-X-Rezeptors dar (Gilbert & Singer, 2006). Ist es möglich, dass dieser konservierte Signalweg aus Hormonrezeptoren bereits bei den Cnidaria vorhanden ist? Und sollte das der Fall sein, welche Hormone werden für die Steuerung der Rezeptoren verwendet?

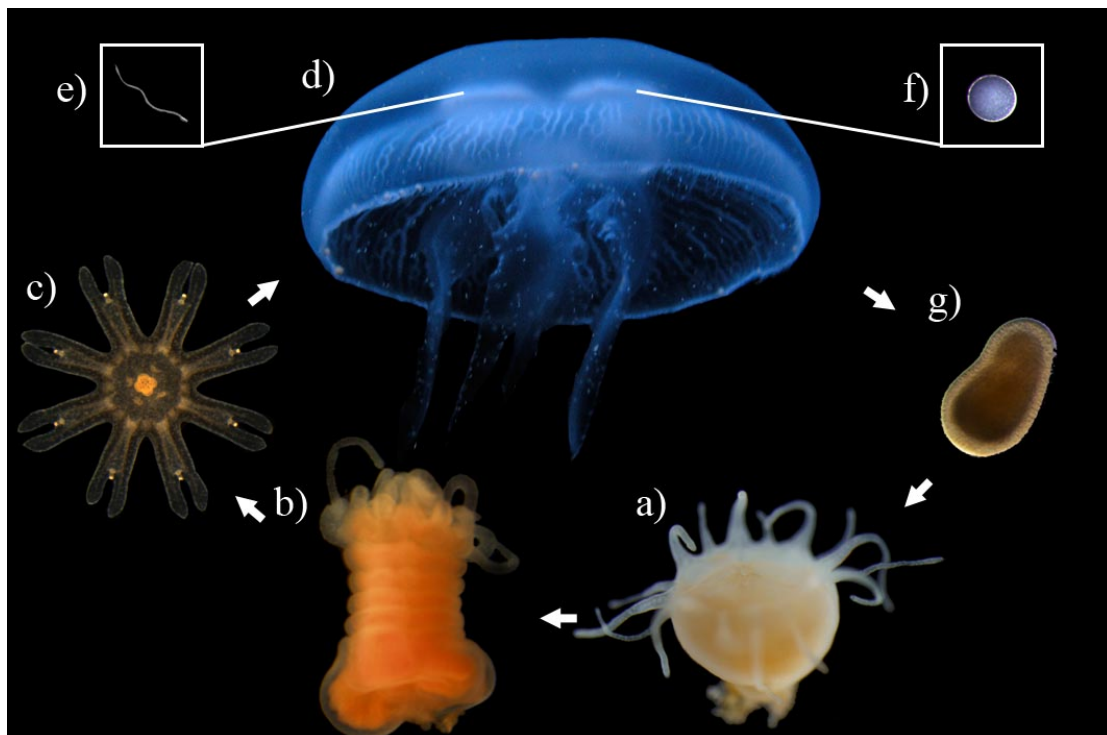


## **1.2 *Aurelia aurita* - ein Genom mit drei verschiedenen Morphotypen: Planularlarve, Polyp und Meduse**

Der basale Stamm der Cnidaria hat sich an nahezu jede aquatische Nische angepasst. Der Ozean bietet viele verschiedene Habitate, die durch spezielle Modifikationen eines Organismus besiedelt werden können. *Aurelia aurita* gehört innerhalb der Cnidaria zu der Klasse der Scyphozoa und wurde erstmals 1758 von Carl von Linné beschrieben. In ihrem Lebensraum, dem Ozean, tritt sie in Form von drei Morphotypen auf: als Planularlarve, Polyp und Meduse. Es ist anzunehmen, dass die Fähigkeit eines Organismus, mit verschiedenen Morphotypen, zwei stark voneinander unterscheidende Habitate zu besiedeln einen großen evolutionären Vorteil darstellt. Aus der Zygote entwickelt sich die Planularlarve, dieses Stadium existiert allerdings nur für wenige Wochen. Die Planula wird sessil und absolviert eine Metamorphose zum Polypenstadium. Der sessile Polyp vollzieht saisonal eine weitere Metamorphose, die Strobilation genannt wird. Der Polyp durchläuft dabei starke morphologische und funktionelle Veränderungen und metamorphosiert zu pelagischen Ephyrae, die im Laufe ihrer Entwicklung zu Medusen heranreifen.

Jedes Lebensstadium von *Aurelia aurita* ist morphologisch und physiologisch stark unterschiedlich. Der sessile Polyp (Abb. 1.3 a) weist ein enormes Regenerationspotential auf. Separierte ektodermale Fragmente des Polypen entwickelten sich innerhalb von 6-7 Tagen erneut zu einem morphologisch intakten Polypen (Steinberg, 1963). Zudem vollzieht der Polyp drei verschiedene Formen der asexuellen Reproduktion: die Fragmentation, die Ausbildung von Stolonen an denen neue Polypen knospen und die Strobilation. Die polydiske Strobila (Abb. 1.3 b) ist das Metamorphosestadium des Polypen aus dem mehrere Ephyrae entstehen. Im Verlauf der Strobilation wurde bereits eine erhöhte Zellproliferation in bestimmten Arealen der Strobila nachgewiesen (Balcer & Black, 1991); zudem zeigt sie starke morphologische Veränderungen (siehe Kapitel 1.2.1). Nach der Vollendung der Metamorphose beginnt das Abschnüren der einzelnen Ephyrae (Abb. 1.3 c). Diese entwickeln sich innerhalb mehrerer Monate zu geschlechtsreifen Medusen (Abb. 1.3 d). Die ausgewachsene Meduse (Abb. 1.3 d) stellt das getrennt-geschlechtliche Reproduktionsstadium dar. Sie verfügt entweder über weibliche Gonaden mit Eizellen (Abb. 1.3 f) oder männliche Gonaden mit Spermien (Abb. 1.3 e). Im Gegensatz zum Polypen ist sie sterblich und weist nur ein geringes

Regenerationspotential auf. Sie verfügt jedoch über ein strukturiertes Nervensystem, sensorische Organe und quergestreifte Muskulatur (Wehner & Gering, 1995). Die Fertilisation und Embryogenese wird in Kapitel 1.2.2 ausführlich beschrieben. Aus der Zygote entwickelt sich über das Blastulastadium, gefolgt von dem Gastrulastadium, die Planularlarve (Abb. 1.3 g), die sich nach dem Verlassen der Bruttasche der weiblichen Meduse auf einem geeigneten Substrat festsetzt und zu dem Polypen (Abb. 1.3 a) metamorphosiert.



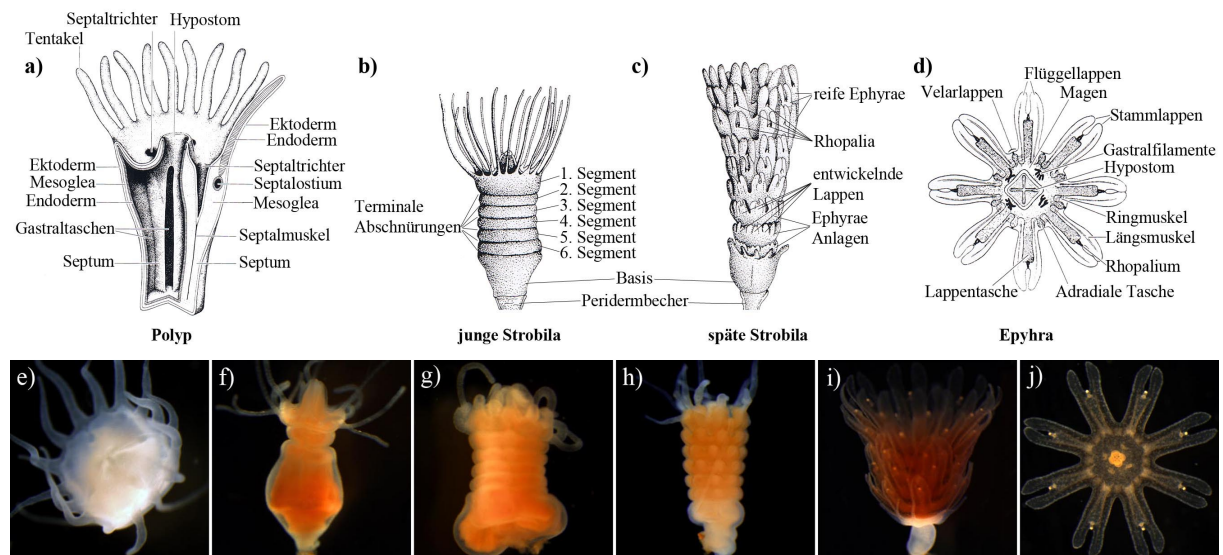
**Abb. 1.3:** Lebenszyklus von *Aurelia aurita*. Der Polyp (a) metamorphosiert zur Strobila (b), die anschließend mehrere Ephyrae (c) abschnürt. Die Ephyrae entwickeln sich zu geschlechtsreifen getrenntgeschlechtlichen Medusen (d), in denen Eizellen (f) oder Spermien (e) heranreifen. Aus den Embryonen entstehen Planularlarven (g), die sessil werden und zu Polypen metamorphosieren.

Das Genom von *Aurelia aurita* sollte dementsprechend drei Gruppen von Genen enthalten, die jeweils eines der drei morphologisch vollkommen unterschiedlichen Stadien Planula, Polyp und Meduse determinieren. Zusätzlich sollte es noch zwei weitere Gruppen von Genen geben, welche die jeweilige Metamorphose zum Polypen oder zur Ephyra initiieren und steuern.

### 1.2.1 Die Strobilation von *Aurelia aurita*

Einer der morphologisch am meist erforschten Prozesse innerhalb der Scyphozoa ist die Metamorphose, die Transformation des Polypen von *Aurelia aurita* zur Ephyra. Dieser Prozess wird Strobilation genannt (Abb. 1.4). Über die molekularen Mechanismen zur Induktion und Steuerung der Strobilation bei *Aurelia aurita* ist aber bisher noch nichts bekannt. Die Initiierung der Metamorphose von Polypen kann mit zwei verschiedenen Methoden angeregt werden: erstens durch die Zugabe von Iod in geringen Konzentrationen in das Seewasser, in dem die Polypen gehältert werden (Spangenberg, 1967); Zweitens durch die Reduktion der Temperatur des Mediums, in dem die Tiere gehältert werden. (Berking *et al.*, 2005).

Innerhalb Europas kann *Aurelia aurita* in eine boreale und eine ubiquitäre, genetisch isolierte Population unterteilt werden, wobei die ubiquitäre Population im Gegensatz zur borealen, sehr leicht und mehrfach im Jahr zur Strobilation angeregt werden kann (Schroth *et al.*, 2002). Weltweit existieren mindestens sieben genetisch und geographisch unterscheidbare Populationen, die wahrscheinlich eine kryptische Spezies repräsentieren (Schroth *et al.*, 2002). Für meine Arbeit habe ich zwei Populationen von *Aurelia aurita* verwendet. Zum einen waren dies Polypen aus Roscoff, entnommen aus dem Atlantik in Frankreich. Sie gehören zu der ubiquitären Population und bieten ideale Voraussetzungen, um die Prozesse der Strobilation genauer untersuchen zu können. Für die Generierung transgener Polypen wurden hingegen Eizellen, aus Medusen der Ostsee präpariert und GFP-Reporter-Konstrukte injiziert. Die daraus resultierenden Polypen gehören zu der borealen Population.



**Abb. 1.4:** Die Strobilation des Polypen zu Ephyra von *Aurelia aurita* mit Angaben zur Morphologie. Nach der Induktion des Polypen (a, e) zur Strobilation, finden Abschnürungen unterhalb des Tentakelrings statt (f). Die Strobila (b, g) unterteilt sich durch mehrere Abschnürungen in Segmente von apikal nach basal. Im Verlauf der Strobilation entwickelt sich jedes Segment zu einer Ephyra. Die ersten Anzeichen dafür sind die entstehenden Lappen, die Tentakel werden resorbiert (h). Nach einer Woche ist die Metamorphose der Strobila (c, i) weitgehend abgeschlossen und die Ephyrae (d, j) werden abgeschnürt. Abbildung a, b, c, d modifiziert nach Storch & Welsch, 1999. Abbildung e-j zeigen das beschriebene Lebensstadium der Roscoff Linie.

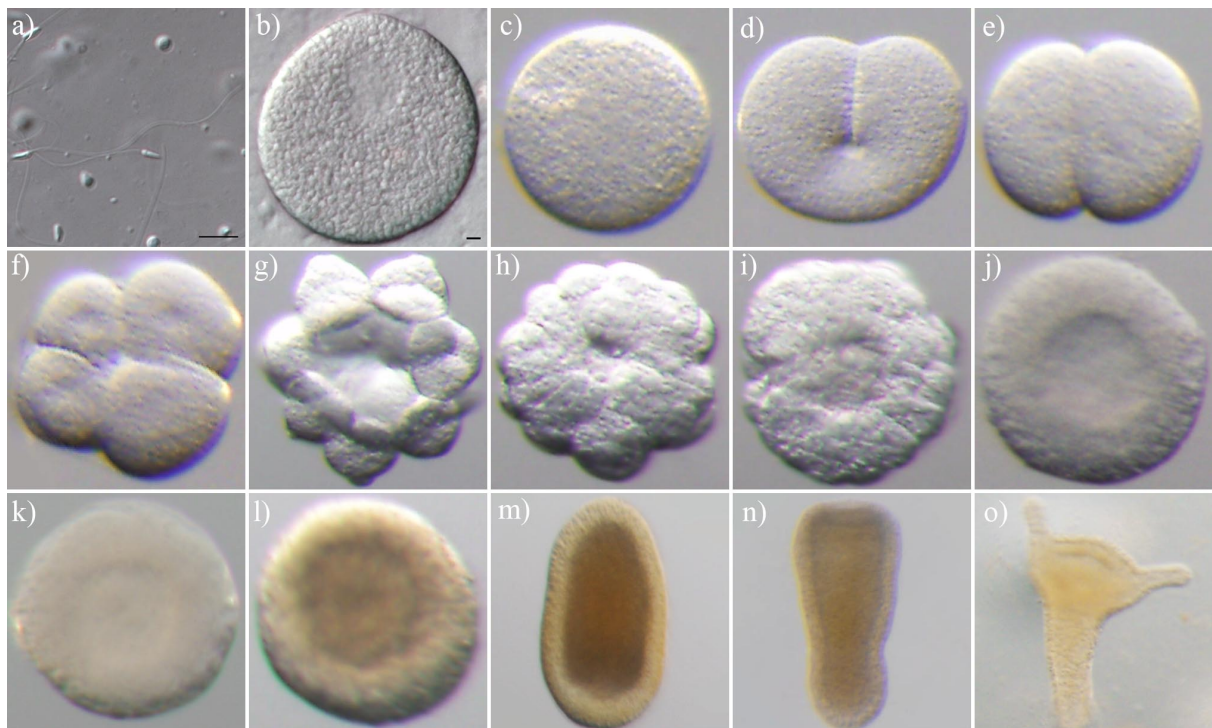
Die Strobilation der Roscoff-Polypen (Abb. 1.4 a, e) beginnt 2-3 Wochen nach der Induzierung der Polypen durch die Reduktion der Temperatur des Umgebungsmediums. Durch eine Abschnürung direkt unterhalb des Tentakelrings wird das erste Segment, das aus der Mundscheibe gebildet wird, festgelegt (Stoch & Welsch, 1999). Durch eine weitere Abschnürung unterhalb der ersten wird das zweite Segment der polydisken Strobila determiniert (Abb. 1.4 f). Es folgen weitere terminale Abschnürungen von apikal nach basal, wobei die einzelnen Ephyrae-Anlagen, unabhängig von der Größe des Polypen, immer die gleiche Höhe aufweisen (Kroiher *et al.*, 2000). Nach drei Tagen ist die Strobila vollständig segmentiert (Abb. 1.4 b, g). Weitere morphologische Veränderungen wie die Reduktion der Tentakeln und die Entwicklung der zukünftigen Lappen der Ephyrae sind nach fünf Tagen festzustellen (Abb. 1.4 h). Nach einer Woche ist die Metamorphose des Polypen zu den Ephyrae (Abb. 1.4 c, i) abgeschlossen. Die Rhopalien an den Enden jeder der acht Lappentaschen sind deutlich zu erkennen (Abb. 1.4 c, i). Die Ephyrae (Abb. 1.4 d, j) beginnen mit rhythmischen Kontraktionen und werden nacheinander innerhalb von zwei Tagen abgeschnürt. Der basale Teil, die Basis der Strobila, bleibt erhalten und bildet im Anschluss an die Metamorphose wieder einen vollständigen Polypen aus.

### 1.2.2 Fertilisation und Embryogenese von *Aurelia aurita*

Der zweite Teil meiner Arbeit bestand aus der Generierung transgener *Aurelia aurita*, um die zellulären Veränderungen und Differenzierungsprozesse während der Metamorphose beobachten zu können. Innerhalb der Cnidaria wurden bereits drei transgene Arten *Hydra* (Hydrozoa) (Wittlieb *et al.*, 2005), *Nematostella* (Anthozoa) (Renfer *et al.*, 2010) und *Hydractinia* (Hydrozoa) (Plickert, persönliche Kommunikation) generiert. Beide wurden durch embryonale Mikroinjektion von Reporter-Konstrukten erzeugt. Für die Mikroinjektion von Reporter-Konstrukten in Zygoten war es essentiell die Embryogenese von *Aurelia aurita* zu verstehen. Sie beginnt mit der Fertilisation der Oocyte innerhalb der weiblichen Meduse (Storch & Welsch, 1999). Durch die Schwimmbewegung der Meduse wird ständig Umgebungswasser in das Gastrovaskularsystem gepumpt. Das Wasser passiert dabei zuerst die Gonaden und tritt dann durch das Hypostom, der zentralen Öffnung am Entstehungspunkt der Oralarme, wieder aus, wobei die Spermien (Abb. 1.5 a) der männlichen Medusen in das Umgebungswasser entlassen werden. Die reifen Oocyten (Abb. 1.5 b) werden in den Zentralmagen entlassen und dort von den Spermien, die mittels Perfusion aufgenommen werden, befruchtet. Durch die Sekretion von Mucus innerhalb des Gastrovaskularsystems, der die Zygoten (Abb. 1.5 c) umhüllt, werden die Embryonen aktiv durch das Hypostom in die Bruttaschen der Oralarme entlassen (Storch & Welsch, 1999).

Die Furchungsteilungen von *Aurelia aurita* erfolgen radial und holoblastisch (Ishii & Takagi, 2003). Die erste Furchung der Zygote (Abb. 1.5 d) verläuft unidirektional vom vegetativen zum animalen Pol, drei Stunden nach der Befruchtung. Das Zweizellstadium (Abb. 1.5 e) absolviert weitere äquale Furchungsteilungen über das Vier- (Abb. 1.5 f), Acht-, 16-, 32- (Abb. 1.5 g) zum 64-Zellstadium, das die Form einer Coeloblastula (Abb. 1.5 h) ausbildet (Ishii & Takagi, 2003). Hat das Blastoderm des Embryos nach weiteren Furchungen eine Anzahl von 700 bis 1000 Zellen erreicht, beginnt die Gastrulation durch die Invagination von Zellen in das Blastocoel (Abb. 1.5 i) (Yuan *et al.*, 2008). Die Entwicklung von der Zygote zum mit Cilien besetztem Gastrula-Stadium (Abb. 1.5 j) dauert 50 Stunden bei 22 °C (Ishii & Takagi, 2003). Die vier Tage alte Gastrula (Abb. 1.5 k) verfügt über ein schwach gelblich gefärbtes Blastocoel, das nach zwei weiteren Tagen durch die Ausbildung von weiteren Cilien im Endoderm

zunehmend dunkler wird (Abb. 1.5 l) (Yuan *et al.*, 2008). Die Entwicklung der Planularlarve (Abb. 1.5 m) ist 7-11 Tage nach der Befruchtung abgeschlossen und die Larve verlässt aktiv die Bruttaschen der Oralarme (Ishii & Takagi, 2003). In den darauffolgenden zwei Tagen bildet die Planularlarve ein Hypostom aus und wird sessil (Abb. 1.5 n). Nach dem Festsetzen auf dem Substrat vollzieht die Larve die Metamorphose zum Polypen (Abb. 1.5 o). Die komplette Entwicklung von der Zygote zum Polypen dauert bei 18 °C circa 18 Tage.



**Abb. 1.5:** Der Entwicklungszyklus von der Oocyte bis zum Polypen bei *Aurelia aurita*. Aus dem Spermium (a) und der Oocyte (b) entsteht durch die Fertilisation die Zygote (c), die unmittelbar mit radialen holoblastischen Furchungen beginnt. Die erste Furchung (d) erfolgt äquatorial unidirektional zum 2-Zellstadium. Durch weitere äquale Furchungsteilungen entsteht das Vier- (f), das Acht-, das 16-, das 32- (g) und das 64-Zellstadium (h), das die Form einer Coeloblastula aufweist. Durch Invagination von Zellen in das Blastocoel entwickelt sich das Gastrulastadium (i). Die bewimperte frühe Gastrula (k) entwickelt sich über das Stadium der späten Gastrula (l) weiter zur Planularlarve (m), die anschließend zum Polypen (o) metamorphosiert. Größenmaßstab in a und b je 10 µm.

### 1.3 Cnidaria als Modellsystem

Die ersten Cnidaria entstanden vor circa 600 Millionen Jahren und gehören somit zu den basalen Eumetazoa. Sie verfügen erstmals über eine Morphologie mit zwei Keimblättern, dem Endoderm und dem Ektoderm (Westheide & Rieger, 2007). Das synapomorphe



Merkmal der Cnidaria ist die hoch differenzierte Nematocyte, die aus einer modifizierten Nervenzelle entstanden ist. Zudem sind sie die ersten Metazoa mit einem Nervensystem. (Lindgens *et al.*, 2003) Cnidaria treten in zwei Hauptformen auf, dem sessilen Polypen und der pelagischen Meduse (Westheide & Rieger, 2007). Bei den Hydrozoen und den Scyphozoen wechseln sich beide Stadien in einem Lebenszyklus ab. Die Anthozoen verfügen hingegen nur über ein Polypen-Stadium (Storch & Welsch, 1999).

Innerhalb des Stamms der Cnidaria wurden bereits fünf Modellorganismen etabliert:

*Hydra* aus der Klasse der Hydrozoa verfügt ausschließlich über ein Polypen-Stadium, das sich sexuell und asexuell durch Knospung vermehren kann. Das sequenzierte Genom von *Hydra magnipapillata* wurde bereits veröffentlicht (Chapman *et al.*, 2010) und ist unter <http://hydrasome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/> verfügbar. Vier Transkriptome von verschiedenen *Hydra* Spezies wurden bereits sequenziert (Bosch *et al.*, unveröffentlicht). Darüber hinaus wurden stabile transgene *Hydra vulgaris* AEP generiert. Dies gelang durch die Mikroinjektion eines hoT G (engl. *homologous transformation vector GFP*) GFP-Reporter-Vektors in Embryonen, der über einen  $\beta$ -Actin-Promotor, einen zelltypspezifischen oder einen positionsabhängigen Promotor verfügte (Wittlieb *et al.*, 2006, Siebert *et al.*, 2007, Bosch *et al.*, unveröffentlicht).

*Hydractinia echinata*, ebenfalls aus der Klasse der Hydrozoa, bildet zusammenhängende Kolonien aus Gastrozoiden, Gonozoiden, Tentaculozoiden und Spiralzoiden. Die Gonozoiden produzieren Eizellen und Spermien, ein Medusen-Stadium wird nicht gebildet. Aus der Zygote entwickelt sich eine Planularlarve, die nach der Metamorphose den Primärpolypen einer neuen Kolonie bildet (Müller, 1963). Ein Teil des Transkriptom aus verschiedenen Lebensstadien von *Hydractinia echinata* wurde bereits sequenziert und eine Bibliothek aus 9000 ESTs erstellt (Soza-Ried *et al.*, 2010). Stabile transgene *Hydractinia echinata* konnten durch Mikroinjektion generiert werden (Plickert, persönliche Kommunikation), jedoch wurde bisher nicht über ein sequenziertes Genom berichtet.

*Clytia hemisphaerica* aus der Klasse der Hydrozoa verfügt über einen Generationswechsel aus Polyp und Meduse. Aus der sexuellen Fortpflanzung der Medusen geht eine Planularlarve hervor, die den Primärpolypen bildet. Dieser Polyp bildet dann eine Kolonie aus Gonozoiden und Gastrozoiden aus. Ein Drittel des vorhergesagten Transkriptom von *Clytia hemisphaerica* wurde bereits sequenziert

(Houliston *et al.*, 2010). Die Bibliothek besteht aus 90.000 ESTs (engl. *expressed sequence tags*) und 8000 *full-length* cDNA- (engl. *complementary DNA*) Sequenzen, die aus Embryonen, Larven und Medusen isoliert wurden. An der Vervollständigung des Transkriptoms und der Sequenzierung des Genoms von *Clytia hemisphaerica* wird im Genoscope Center (Evry, Frankreich) gearbeitet (zusammengefasst aus Houliston *et al.*, 2010).

*Nematostella vectensis*, aus der Klasse der Anthozoa, verfügt ausschließlich über ein Polypen-Stadium, das sich sexuell und asexuell vermehren kann. Eizellen und Spermien werden in das Wasser entlassen und aus den befruchteten Eizellen entstehen Planularlarven, die zu Polypen metamorphosieren (Hand & Uhlinger, 1992). Für *Nematostella vectensis* existiert ein sequenziertes Genom (Putnam *et al.*, 2007) und auch ein 166.596 EST umfassendes Transkriptom, das unter <http://www.jgi.doe.gov/> verfügbar ist. Keimbahnstabile transgene *Nematostella vectensis* wurden durch Mikroinjektion eines pCRII-TOPO Vektors mit einem mCherry-Reporter-Konstrukt unter der Kontrolle eines spezifischen *myosin heavy chain* Promotors generiert (Renfer *et al.*, 2010).

Ebenfalls in die Klasse der Anthozoa ist die Koralle *Acropora millepora* einzuordnen. Die Reproduktion erfolgt durch das synchronisierte Entlassen der Oocyten und Spermien in das Wasser. Aus den Embryonen entwickeln sich Planularlarven, die zu Polypen metamorphosieren. Das Transkriptom der Larven von *Acropora millepora* wurde bereits sequenziert und enthält 44.444 Contigs (zusammenhängende Sequenzen) und 62.657 Singletons (einzelne Sequenzen) (Meyer *et al.*, 2009). Bisher wurde jedoch weder über transgene *Acropora millepora* berichtet noch ein sequenziertes Genom veröffentlicht.

### **1.4 Lebenszyklus und epigenetische Regulation**

*Aurelia aurita* und viele andere Cnidaria verfügen über einen Lebenszyklus aus Polyp und Meduse. Aber wie können aus einem Genom mehrere divergente Morphotypen entstehen? Im Tierreich gibt es mehrere Beispiele, die beschreiben, dass verschiedene Morphologien eines Lebewesens auf eine epigenetische Regulation zurückzuführen sind. Die Epigenetik beschreibt somit die Modulierung der Genexpression ohne eine



Veränderung der Gensequenz. Ein etablierter Organismus für die Untersuchungen der Epigenetik und der damit einhergehenden Methylierung von Genen ist *Apis mellifera* (Arthropoda). Der Mechanismus der Methylierung von Genen zur Steuerung der differentiellen Expression und der damit einhergehenden epigenetischen Determination der Entwicklung wurde z. B. an den Larven von *Apis mellifera* ergründet. Durch die Injektion von *Dnmt3 small interfering RNA* wurde die Expression der Methyltransferase Dnmt3 stark herunter reguliert. Das Ergebnis dieser Behandlung war, dass aus Larven, die sich ursprünglich zu Arbeiterinnen entwickeln sollten, Königinnen mit vollständigen Ovarien entstanden (Kucharski *et al.*, 2008).

Die bisher bekannten epigenetischen Mechanismen der Genregulation sind die DNA-Methylierung, die Histonmodifizierung und die Polycomb-Trithorax-Genregulation (Strachan & Read, 2005). Eine Verhinderung der Methylierung der DNA kann durch den Einsatz von Methyltransferase-Inhibitoren erfolgen. Während der S-Phase der Mitose findet die Replikation der DNA statt, im Anschluss daran wird die DNA je nach Funktion der Zelle wieder im selben oder einem angepassten Muster methyliert (Gorfin & Eisenhauer, 2002). Durch die Verwendung des Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-2-Deoxycytidin (5-Aza-CdR), der eine Modifikation an der fünften Position des Pyrimidin-Rings aufweist, wird die *de novo*-Methyltransferase (DNMT) gebunden und kann keine weiteren Cytosine der Cytidin-Phosphorsäure-Guanosin-Dinukleotide mehr methylieren (Gorfin & Eisenhauer, 2002). Mit der Behandlung von 5-Aza-CdR konnte bereits bewiesen werden, dass zuvor ausgeschaltete Gene in menschlichen Tumorzelllinien wieder exprimiert wurden (Bender *et al.*, 1998). Der Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2-Deoxycytidin stellt somit ein effizientes Werkzeug dar, ausgeschaltete Gene eines Organismus unabhängig vom Lebensstadium wieder zu aktivieren.

### 1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen zu identifizieren, die den Lebenszyklus von *Aurelia aurita* (Scyphozoa) regulieren. Wie können aus einem Genom drei verschiedene Morphotypen - Planularlarve, Polyp und Meduse - entstehen? Wird die Metamorphose an der evolutionären Basis der Eumetazoa mit Hilfe von Mechanismen, die denen der Insekten oder Amphibien ähnlich sind, gesteuert? Welche Gene und Signalkaskaden kontrollieren den Verlauf der

Metamorphose? Um diese Fragen aufzuklären, ist der Fokus dieser Arbeit auf die Identifizierung und die funktionelle Analyse von Genen, die den Lebenszyklus von *Aurelia aurita* regulieren, gerichtet.

Der Modellorganismus *Aurelia aurita* ist ideal für die Untersuchungen der Metamorphose, da Polypen leicht zur Strobilation zu induzieren sind und damit alle benötigten Lebensstadien jederzeit zur Verfügung stehen. Durch die 454-Sequenzierung des Transkriptoms des Polypen, der Strobila und der Ephyra, soll die differentielle Genexpression während der Strobilation eingehend analysiert und es sollen strobilationspezifische bzw. stadienspezifische Kandidatengene identifiziert werden. Um die Lokalisation der Kandidatengene zu untersuchen, soll anschließend eine *whole mount in situ* Hybridisierung an den verschiedenen Lebensstadien Polyp, Strobila und Ephyra etabliert werden. Die daran anschließende Mikroarray-Hybridisierung unter Verwendung von mRNA aus strobilationsspezifischen Stadien, soll es ermöglichen, Einsicht in die Regulation der Metamorphose des Polypen zur Ephyra zu gewinnen, indem umfassendere Expressionsprofile der Kandidatengene erstellt werden.

Die epigenetische Kontrolle der Genregulation ist ein wichtiger Mechanismus der differentiellen Genexpression, gekennzeichnet durch spezifische Methylierungsmuster an regulativen Elementen. Aus diesem Grund soll zusätzlich untersucht werden, in wie weit sich die Beeinflussung der Methylierung des genetischen Materials unter Zuhilfenahme eines Methyltransferase-Inhibitors auf die Strobilation auswirkt.

Der zweite Teil meiner Arbeit befasst sich mit der Generierung transgener *Aurelia aurita*. Durch die Etablierung transgener Tiere sollen die zellulären Veränderungen und Differenzierungsprozesse während des gesamten Entwicklungszyklus und im Besonderen während der Metamorphose zur Meduse eingehender analysiert werden. Dafür sollen die Promotoren und Terminatoren von konstitutiv stark exprimierten Genen von *Aurelia aurita* isoliert und in GFP-Reporter-Konstrukte kloniert werden. Durch die anschließende Mikroinjektion der GFP-Reporter-Konstrukte in Embryonen können Zellen so markiert werden, dass das Zellschicksal *in vivo* verfolgt werden kann.

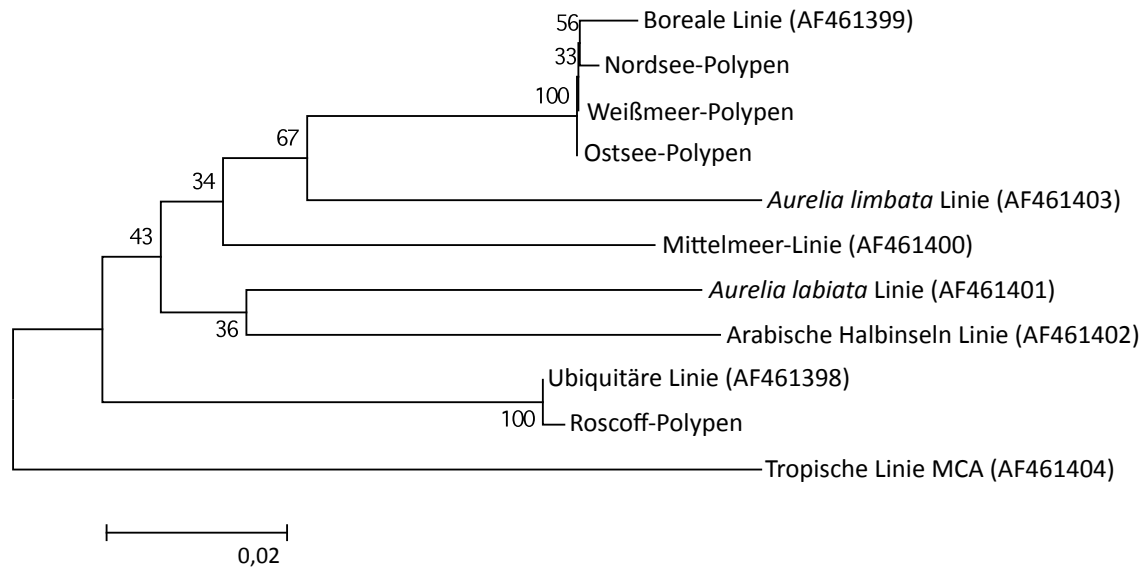
## 2. Ergebnisse

### 2.1 Phylogeographie der verwendeten *Aurelia aurita* Linien

Zu Beginn meiner Arbeit musste eine geeignete Tierlinie von *Aurelia aurita* für alle weiteren Analysen bestimmt werden. Für die molekulare Untersuchung der Strobilation sollten die Polypen einfach zur Strobilation induziert werden können und eine hohe asexuelle Reproduktion aufweisen, damit immer ausreichend Polypen vorhanden sind. Im Labor wurden bereits zwei Linien von Polypen aus der Ostsee und dem Weißmeer gehältert. Zusätzlich wurden mir von Dr. Gerhard Jarms, Uni Hamburg, Deutschland, Polypen der Roscoff-Linie, sowie Polypen aus der Nordsee bereitgestellt von dem Multimar Wattforum, Tönning, Deutschland zur Verfügung gestellt.

Für den zweiten Teil meiner Arbeit, die Generierung transgener *Aurelia aurita* durch Mikroinjektion von Reporterkonstrukten, wurden junge Embryonalstadien an Stelle von Polypen benötigt (K. 2.5). Für die Präparationen von Embryonen wurden, aufgrund der Nähe des Labors zur Ostsee Medusen aus dieser verwendet.

Um die vier verschiedenen Linien, der im Labor gehälterten Polypen Ostsee, Weißmeer, Nordsee und Roscoff der Spezies *Aurelia aurita* zuzuordnen, wurde eine Sequenzierung der 16S ribosomalen DNA (rDNA) durchgeführt und die Sequenzen den festgelegten Linien (Anhang 9.6) zugeordnet (nach Schroth *et al.*, 2002). Das Alignment der 16S rDNA-Sequenzen wurde mit der Clustal W Methode (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt. Anschließend wurde mit der MEGA Software (Kumar *et al.*, 2008) unter Benutzung des *Substitution Maximum Composite Likelihood* Modells ein phylogenetischer Baum mit dem *Neighbor-Joining* Algorithmus (Saitou & Nei, 1987) mit einem Bootstrap von 100.000 Replikaten erstellt (Abb. 2.1). Dieser Baum belegt, dass die 16S rDNA-Sequenzen der Polypen aus dem Weißmeer, der Ostsee und der Nordsee über eine große Homologie zu den Sequenzen der von Schroth *et al.* beschriebenen, borealen Linie verfügen (Abb. 2.1). Die 16S rDNA Sequenzen der Roscoff-Linie hingegen weist eine starke Homologie zu den Sequenzen der ubiquitären Linie auf (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Phylogeographischer Baum, der im Labor gehälterten Polypen, die den verschiedenen Linien von *Aurelia aurita* zugeordnet wurden (nach Schroth *et al.*, 2002). Die angegebenen Linien (Boreale, *Aurelia limbata*, Mittelmeer-, *Aurelia labiata*, Arabische Halbinseln, Ubiquitäre und die Tropicale Linie MCA) verfügen zusätzlich über ihre *accession number* in der NCBI *library*. Vor Verzweigungen sind die jeweiligen *bootstrap* Werte angegeben. Der Masstab gibt die genetische Distanz an.

Um die Induktionsfähigkeit zur Strobilation, für die molekulare Analyse der Metamorphose, der vier verschiedenen Linien von *Aurelia aurita* zu überprüfen, wurden sie einer Temperaturreduzierung ausgesetzt (K. 7.1.1). Ein Großteil der Polypen der Roscoff-Linie begann 2-3 Wochen nach der Reduzierung der Temperatur mit der Strobilation. Die Polypen der anderen drei Linien aus der Ostsee, der Nordsee und dem Weißmeer hingegen strobilierten nur gering oder überhaupt nicht. Die Polypen der Roscoff-Linie waren somit durch ihre leichte Indizierbarkeit zur Strobilation ideal für die molekularen Untersuchungen des Lebenszyklus von *Aurelia Aurita*. Zudem verfügten sie auch über eine besonders hohe asexuelle Reproduktion im Vergleich zu den anderen drei Linien.

Alle analysierten Sequenzen, der im Labor gehälterten Polypen, entstammen der Spezies *Aurelia aurita*. Die für die molekulare Untersuchung der Strobilation festgelegte Roscoff-Linie, gehört zu der ubiquitären Linie von *Aurelia aurita*. Die für die Mikroinjektion verwendeten Embryonen aus der Ostsee hingegen, gehören zu der borealen Linie von *Aurelia aurita* (nach Schroth *et al.*, 2002).

## **2.2 Einsicht in die differentielle Genexpression während des Lebenszyklus von *Aurelia aurita***

Innerhalb der Cnidaria findet bei vielen Scyphozoen und Hydrozoen ein Generationswechsel zwischen den Polypen- und den Medusen-Stadien statt. Die molekularen Mechanismen zur Regulation der Lebenszyklen sind bislang ungeklärt. *Aurelia aurita* aus der Klasse der Scyphozoa ist einer der am besten studierten Organismen und ideal zur Analyse der Strobilationsprozesse. Polypen von *Aurelia aurita* sind leicht zur Strobilation anzuregen und alle benötigten Lebensstadien sind einfach zu halten. Durch die 454-Sequenzierung des Transkriptoms der drei Lebensstadien Polyp, Strobila und Ephyra sollte eine vergleichende Genexpressionsanalyse Einblicke in die molekularen Prozesse der Strobilation gewähren. Der Hauptfokus lag dabei speziell auf den Genen, die ausschließlich während des Verlaufs der Strobilation exprimiert werden. Mit dieser Vorgehensweise sollten Transkripte aufgespürt werden, welche die Strobilation von *Aurelia aurita* induzieren und steuern. Darüber hinaus sollten Gene, die spezifisch für das Polypen- oder das Ephyra-Stadium sind identifiziert werden.

### **2.2.1 454-Sequenzierung und *de novo* Assemblierung des Transkriptoms von *Aurelia aurita***

Zu Beginn meiner Arbeit existierten diverse sequenzierte Transkriptome verschiedener Cnidaria. Ein Transkriptom eines Cnidaria mit einem metagenetischen Lebenszyklus war aber nicht darunter. Um jedoch die molekularen Veränderungen innerhalb eines solchen Lebenszyklus, wie er bei *Aurelia aurita* vorkommt, zu analysieren, wurde ein sequenziertes Transkriptom verschiedener Lebensstadien benötigt. Die 454-Sequenzierung mit dem Roche Genome Sequenzer FLX System bot die Möglichkeit einer *ultra-high-throughput* DNA-Sequenzierung.

Für die vergleichende Analyse der Transkriptome mit der 454-Sequenzierung wurden die drei Lebensstadien Polyp, Strobila und Ephyra ausgewählt. Die verwendete mRNA wurde aus Organismen der Roscoff-Linie (rc) extrahiert. Insgesamt wurden 4,5 FLX-Chips für die Sequenzierung des Transkriptoms mit dem Roche Genome Sequenzer FLX System verwendet - jeweils 1,5 Chips pro Lebensstadium. Für das Polypenstadium konnten 115,86 Mb, bestehend aus 498.676 Reads, für das Strobilastadium 118,79 Mb, bestehend aus 521.839 Reads und für das Ephyrastadium 105,34 Mb, bestehend aus

457.957 Reads, sequenziert werden (Tab. 2.1). Für die Analyse der Transkripte wurden drei stadienspezifische Assemblys mit dem TGICL Assembler, einer Software zum Clustern von EST-Datensätzen, assembliert. Das Ergebnis waren drei verschiedene Transkriptome: *aur\_rc\_polyp\_final* mit 20.479 Contigs und 76.991 Singletons, *aur\_rc\_strobila\_final* mit 30.378 Contigs und 50.859 Singletons und *aur\_rc\_ephyra\_final* mit 26.272 Contigs und 48.029 Singletons (Tab. 2.2, siehe Anhang 9.8). Die vergleichende Auswertung dieser stadienspezifischen Transkriptome ergab, dass die Datensätze zu stark fragmentiert waren, um fundierte Aussagen über strobilations- und stadienspezifische Gene zu treffen. Eine Alternative dazu stellte die Assemblierung der gesamten sequenzierten Transkripte zu einem stadienunabhängigen Transkriptom dar.

Dieses Transkriptom (*db454\_aur\_rc\_final*) wurde ebenfalls mit dem TGICL Assembler erstellt und umfasste 62.632 Contigs und 134.139 Singletons (Tab. 2.2, siehe Anhang 9.8). Aber der TGICL Assembler ließ keine Rückschlüsse über die Anzahl und die stadienspezifische Herkunft der verwendeten Reads für die Erstellung eines Contigs zu. Dementsprechend konnte die TGICL Assembly nicht für die Analyse von strobilations- oder stadienspezifischen exprimierten Genen verwendet werden.

Deshalb wurden mit dem Celera Assembler, der normalerweise für *de novo whole-genome shotgun DNA sequence* Assemblierungen verwendet wird, zwei weitere Assemblys erstellt. Der Celera Assembler besitzt gegenüber dem TGICL Assembler den Vorteil, dass er die Anzahl der zusammengefassten Reads eines Contigs nach Datensätzen getrennt dokumentiert. Somit konnte rückgeschlossen werden, aus welchen der drei Datensätze, Polyp, Strobila oder Ephyra, die Reads für ein Contig bezogen wurden. Die erste sehr stringente Celera Assembly (98 % *identity*), *aurelia\_celera\_v01*, enthielt 50.580 Contigs und 179.129 Singletons (Tab. 2.2, siehe Anhang 9.8). Eine zweite weniger stringente Assembly (95 % *identity*), *aurelia\_celera\_v02*, umfasste nur noch 40.595 Contigs. Sie wurde erstellt aus 384.969 Reads des Polypen, 404.628 Reads der Strobila und 457.957 Reads der Ephyra (Tab. 2.1). Reads von geringer Qualität wurden aus dieser Assembly ausgeschlossen. Die manuelle Überprüfung der *aurelia\_celera\_v02* Assembly ergab jedoch eine hohe Redundanz des Transkriptoms. So konnten z. B. Allele eines Gens gefunden werden, die durch zwei Contigs repräsentiert wurden. Durch einen weiteren Genome Assembler ‚Minimus‘ (Sommer *et al.*, 2007) wurden redundante Contigs ausgeschlossen und die Assembly auf insgesamt 29.608 Contigs reduziert. Auf Grund ihres Umfangs an Contigs

und der geringen Redundanz war diese Assembly optimal für die weitere Analyse der differentiellen Genexpression.

**Tab. 2.1:** Übersicht der Sequenzen aus den 454-Sequenzierungen des Transkriptoms der verschiedenen Lebensstadien: Polyp, Strobila und Ephyra von *Aurelia aurita*. Es wurden je Lebensstadium 1,5 GS FLX-Chips sequenziert. Die Ausbeute der Sequenzierung kann aus der Anzahl der Reads und den sequenzierten Basen abgelesen werden. Zudem wird der Datensatz angegeben, der für die celera\_v02 Assembly verwendet wurde.

Lebensstadium	Anzahl der verwendeten GS FLX-Chips	Reads	Sequenzierte Basen
Polyp	1,5	498.676	115,86 Mb
Strobila	1,5	521.839	118,79 Mb
Ephyra	1,5	457.957	105,34 Mb
Total	4,5	1.478.472	339,99 Mb
Verwendete Reads für die Celera_v02 Assembly			
Polyp	1,5	384.969	
Strobila	1,5	404.628	
Ephyra	1,5	363.584	
Total	4,5	1.153.181	

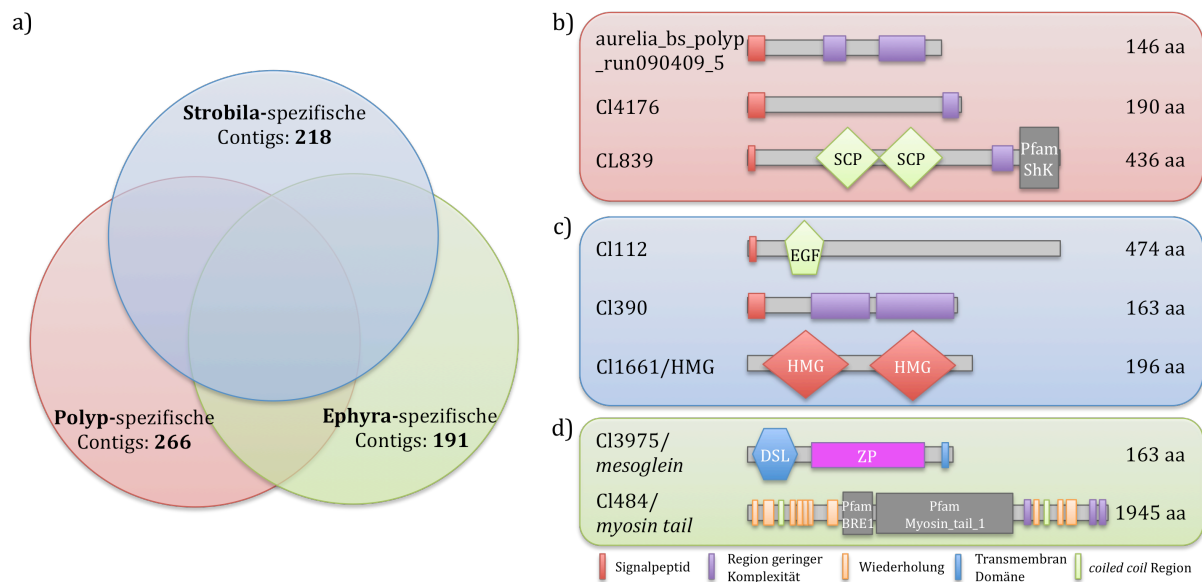
**Tab. 2.2:** Übersicht über die spezifischen Transkriptome aus Polyp, Strobila und Ephyra. Neben dem Lebensstadium ist der Name der Assembly mit der Angabe zur Anzahl der darin enthalten Contigs und Singletons angegeben.

Lebensstadium	Name des Transkriptoms	Assembler	Contigs	Singletons
Polyp	aur_rc_polyp_final	TGICL	20.479	76.991
Strobila	aur_rc_strobila_final	TGICL	30.378	50.859
Ephyra	aur_rc_ephyra_final	TGICL	26.373	48.029
Polyp, Strobila, Ephyra	db454_aur_rc_final	TGICL	62.632	134.139
Polyp, Strobila, Ephyra	aurelia_celera_v01	Celera	50.580	179.129
Polyp, Strobila, Ephyra	aurelia_celera_v02	Celera/Minimus	29.608	-

### 2.2.2 Analyse der differentiellen Genexpression von verschiedenen Lebensstadien: Polyp, Strobila und Ephyra

Um zu ermitteln, welche Transkripte stadienspezifisch für den Polypen, die Stobila und die Ephyra exprimiert werden, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Aus dem Gesamt-Transkriptom aurelia\_celera\_v02, bestehend aus 29608 Contigs, wurden differentiell exprimierte Gene des Polypen, der Strobila und der Epyhra selektiert. Ein Contig galt als stadienspezifisch, wenn 80 % (+/- 10 %) der Reads, aus denen es zusammensetzt war, alleinig in einem Lebensstadium vorhanden waren. Zudem musste das Contig mindestens 15 Reads im Gesamt-Transkriptom aufweisen. Diese Limitation

der Expression (auf ein Lebensstadium) ergab 266 polypenspezifische, 218 strobilaspezifische und 191 ephyraspezifische Transkripte (Abb. 2.2 a). Diese 675 Sequenzen wurden mit einem *basic local alignment search tool for translated nucleotides* (blastx) Algorithmus auf ihre Homologie zu bereits bekannten Proteinen analysiert. Anschließend wurden aus den untersuchten Genen Kandidatengene ausgewählt, die eine Auswirkung auf das jeweilige Lebensstadium haben könnten. Die selektierten Gene wurden zudem mit der *simple modular architecture research tool* (SMART) Analyse auf ihre Protein-Domänen hin untersucht.



**Abb. 2.2:** Übersicht der spezifischen Transkripte der Lebensstadien Polyp (rot), Strobila (blau) und Ephyra (grün). a: Auswahl stadienspezifischer Contigs aus dem Gesamt-Transkriptom aurelia\_celera\_v02. Die Auswahl beinhaltet Gene deren Reads, zu 80 % (+/- 10 %) alleinig in einem Lebensstadium vorhanden waren, zudem musste das Gen über mindestens 15 Reads verfügen. b: smart Protein-Vorhersage für drei polypenspezifische Gene aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_5, Cl4176 und Cl839; c: smart Protein-Vorhersage für drei strobilaspezifische Gene Cl112, Cl390 und Cl1661/HMG; d: smart Protein-Vorhersage für zwei ephyraspezifische Gene Cl3975/*mesoglein* und Cl484/*myosin tail*.

In der Gruppe der weiter zu untersuchenden polypenspezifischen Gene wurden drei Kandidatengene ausgewählt (Abb. 2.2 b, Tab. 2.3 rot markiert). Dazu gehörte das Gen aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_5, das für ein sezerniertes Protein mit Signalpeptid und mehreren Arginin-Wiederholungen ( $X_{82}R_8(X_2R_4)_3X_3R_2X_2RX_2RX_4RX_2RX_9R$ ) kodiert. Es weist keine Homologie zu einem bekannten Protein in der blastx Analyse auf und wurde deswegen als *taxonomically restricted gene* (TRG) klassifiziert. Ein weiteres ausgewähltes TRG Cl4176, das auch für ein sezerniertes Protein kodiert, beginnt



ebenfalls mit einem Signalpeptid gefolgt von mehreren Arginin-Wiederholungen ( $X_{136}RX_2RX_{11}RX_7RX_7(RX)_5X_2R_{11}$ ). Das dritte polypenspezifische Gen Cl839 kodiert für ein sezerniertes Protein mit einem Signalpeptid, zwei SCP-Domänen mit einem e-Wert von  $2e^{-36}$  und  $2e^{-31}$  und eine ShK Toxin-Domäne mit einem e-Wert von  $1e^{-2}$ . Es weist in der blastx Analyse eine hohe Homologie zu einem Protein PREDICTED: GLI pathogenesis-related 2 [XP\_690132.3] von *Danio rerio* (Osteichthyes) mit einem e-Wert von  $2e^{-49}$  auf.

Die Gruppe der ausgewählten strobilaspezifischen Gene umfasst ebenfalls drei Contigs (Abb. 2.2 c, Tab. 2.3 blau markiert): das TRG Cl112, das für ein sezerniertes Protein mit einem Signalpeptid und einer *epidermal growth factor-like* (EGF) Domäne mit einem geringen e-Wert von  $8e^{-2}$  kodiert, sowie das TRG Cl390, das ein Peptid mit einem Signalpeptid und mehreren Arginin-Wiederholungen ( $X_{87}R_3X_2R_3X_4(R_3X_3)_2(R_3X_2)_2R_3X_3(R_3X_2)_2R_3X_3(R_3X_2)_2R_3X_3R_3$ ) kodiert; zusätzlich wurde das Gen Cl1661, das zwei *high mobility group* (HMG) Domänen mit einem e-Wert von  $7e^{-13}$  und  $9e^{-25}$  kodiert, ausgewählt. Dieses Gen weist in der blastx Analyse eine hohe Homologie zu dem *putative HMG-like protein* [AA092280.1] von *Dermacentor variabilis* (Arachnida) mit einem e-Wert von  $7e^{-26}$  auf.

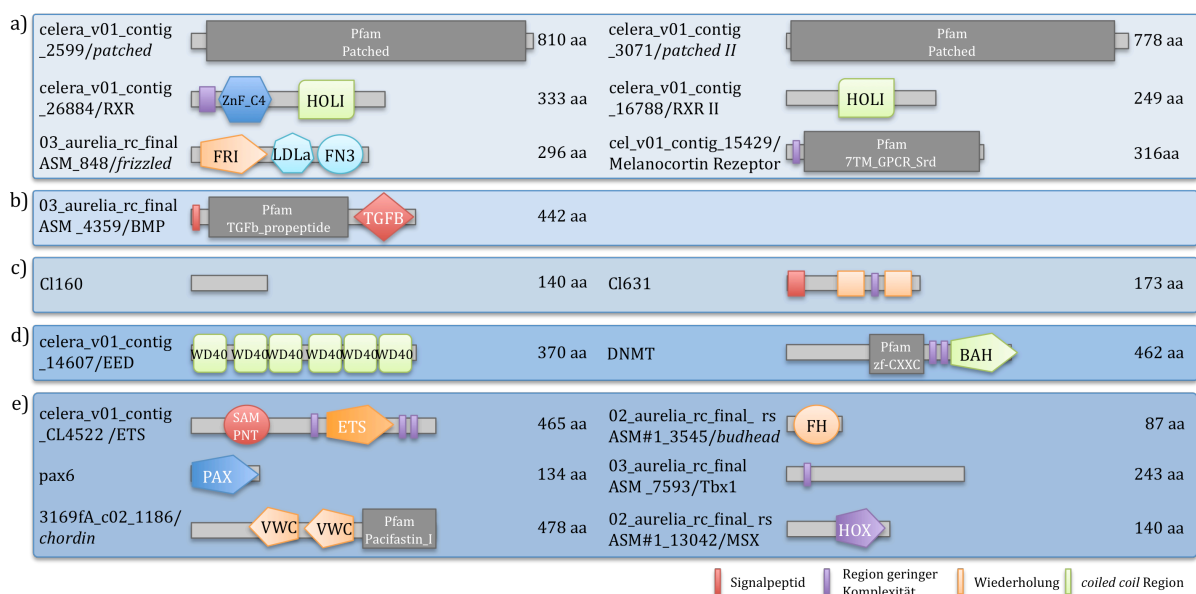
Die ausgewählten polypenspezifischen Transkripte bilden mit zwei Genen die dritte Gruppe (Abb. 2.2 d, Tab. 2.3 grün markiert). Dazu gehört das Gen Cl3975, das für ein Transmembranprotein mit einem *Delta/Serrate* Liganden mit einem e-Wert von  $5e^{-3}$ , einer *Zona Pellucida* Domäne mit einem e-Wert von  $2e^{-35}$  und einer Transmembrandomäne kodiert. In der blastx Analyse weist es eine starke Sequenzähnlichkeit zu der *mesoglein variant 1* von *Aurelia aurita* mit einem e-Wert von  $1e^{-177}$  auf. Allerdings verfügt die von Matveev *et al.*, 2007 beschriebene *mesoglein variant 1* nicht über eine Transmembrandomäne. Somit ist Mesoglein kein sezerniertes Protein, wie ursprünglich von Matveev postuliert, sondern ein Transmembranprotein. Das zweite spezifische Gen der Ephyra ist Cl484, das für ein Protein mit einer E3 Ubiquitin-Ligase (BRE1) Domäne mit einem e-Wert von  $6e^{-2}$  und der Endregion der schweren Kette von Myosin (Myosin\_tail\_1) mit einem e-Wert von  $1e^{-2}$ , kodiert. Flankiert werden diese beiden Domänen von mehreren Wiederholungen und zwei *coiled coil* Regionen. In der blastx Analyse weist Cl484 eine starke Homologie zu *kinesin K39* [XP\_001464299.1] von *Leishmania infantum* (Euglenozoa), mit einem e-Wert von  $4e^{-62}$ , auf.

Interessanterweise gehören mehrere der ausgewählten TRGs wie Cl112, Cl390 und aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_5 zu den am stärksten exprimierten Genen im jeweiligen Lebensstadium. Um weitere zum Teil nur gering und nicht stadienspezifisch exprimierte Gene und ihren Einfluss auf die Strobilation zu untersuchen wurden weitere interessante Kandidatengene ausgewählt.

### 2.2.3 Selektion weiterer Kandidatengene für die Untersuchung des Prozesses der Strobilation

Aus den verschiedenen Transkriptom Assemblierungen (K. 2.2.1) wurden weitere Gene, die auf Grund Ihrer potentiellen Funktion Einsicht in den Verlauf der Metamorphose versprochen, ausgewählt. Sie wurden mit der SMART Analyse auf ihre Proteindomänen und mit der blastx Analyse auf ihre Homologie zu bereits bekannten Proteinen untersucht.

Es wurden 17 weitere Gene, die einen möglichen direkten Einfluss auf der Strobilation haben könnten, selektiert. Diese Gene können in fünf Gruppen gegliedert werden: Rezeptoren, sezernierte Morphogene, TRGs, transkriptions-regulierende Proteine und Transkriptionsfaktoren.



**Abb. 2.3:** Übersicht über die SMART Protein-Vorhersage strobilationsspezifischer Gene, die einen direkten Einfluss als Rezeptoren (a), sezernierte Morphogene (b), TRGs (c), transkriptions-regulierende Proteine (d) und Transkriptionsfaktoren (e) auf die Strobilation haben könnten. a: Rezeptoren:

celera\_v01\_contig\_2599/*patched*, celera\_v01\_contig\_3071/*patched II*, celera\_v01\_contig\_26884/RXR, celera\_v01\_contig\_16788/RXR II, 03\_aurelia\_rc\_final ASM\_848/*frizzled*, celera\_v01\_contig\_15429/Melanocortin Rezeptor; b: sezernierte Morphogene: 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_4359/BMP; c: TRGs: Cl160 und Cl361; d: transkriptions-regulierende Proteine: celera\_v01\_contig\_14607/EED und DNMT; e: Transkriptionsfaktoren: celera\_v01\_contig\_CL4522/ETS, 02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_3545/*budhead*, *pax6*, 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_7593/*Tbx1*, 3169fA\_c02\_1186/*chordin* und 02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_13042/MSX.

In der Gruppe der Rezeptoren sind vier verschiedene Signaltransduktionswege mit sechs Genen vertreten (Abb. 2.3 a, Tab. 2.3 blau markiert). Dazu gehört der *Sonic Hedgehog*-Signalweg und die *Wingless*-Signalkaskade, die bei *Drosophila* (Arthropoda) für die Segmentierung des Embryos und die anschließende Determinierung der Zellschicksale verantwortlich sind (Gilbert & Singer, 2006), sowie der Retinoic-X-Rezeptor, der bei den Insekten und Amphibien für die Induktion der Metamorphose zuständig ist (Gilbert & Singer, 2006) sowie der Melanocortin-Rezeptor. Die ersten beiden Gene dieser Gruppe kodieren für Rezeptoren des *Sonic Hedgehog*-Signalwegs. Das Gen celera\_v01\_contig\_2599 (im weiteren *patched* genannt) kodiert für eine Patched-Domäne mit einem e-Wert von  $3e^{-12}$ . Es weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu dem PREDICTED: similar to Patched domain-containing protein 3 [XP\_002162641.1] von *Hydra magnipapillata* (Hydrozoa) mit einem e-Wert von  $3e^{-97}$  auf. Das Gen celera\_v01\_contig\_3071 (im weiteren *patched II* genannt) kodiert ebenfalls eine für Patched-Domäne mit einem e-Wert von  $2e^{-7}$ . In der blastx Analyse weist das Gen eine starke Homologie zu dem hedgehog Rezeptor [NP\_195548.5] von *Arabidopsis thaliana* (Magnoliopsida) mit einem e-Wert von  $5e^{-151}$  auf. Das dritte ausgewählte Gen kodiert einen Rezeptor des Wnt-Signalweges. Das Gen 03\_aurelia\_rc\_final ASM\_848 (im weiteren *frizzled* genannt) kodiert für eine Frizzled-Domäne mit einem e-Wert von  $2e^{-44}$ , gefolgt von einer *low-density* Lipoprotein Rezeptor-Domäne Klasse A (LDL<sub>A</sub>) mit einem e-Wert von  $6e^{-12}$  und einer Fibronectin Typ 3 Domäne (FN3) mit einem e-Wert von  $5e^{-5}$ . Zudem verfügt das Gen mit einem e-Wert von  $5e^{-32}$  über eine starke Homologie zu „[XP\_002748106.1] PREDICTED: frizzled-2-like“ von *Callithrix jacchus* (Chordata). Die nächsten beiden Gene dieser Gruppe kodieren für die Retinoic-X-Rezeptoren, die bei den Amphibien und den Insekten in der Form des Homologs Ultraspiracle für die Induktion der Metamorphose verantwortlich sind (Gilbert & Singer, 2006). Celera\_v01\_contig\_26884 (im weiteren RXR genannt) kodiert eine c4 Zink-Finger (ZnF\_C4) Domäne mit einem e-Wert von  $1e^{-38}$  und eine Hormonrezeptor Ligand-Bindedomäne (HOLI) mit einem e-Wert von  $1e^{-1}$ . Das Gen weist eine Sequenzähnlichkeit,

mit einem e-Wert von  $1e^{-152}$ , zu dem retinoic acid X receptor [AAC80008.1] von *Tripedalia cystophora* (Cubozoa) auf. Das zweite Gen mit dem Namen RXR II, celera\_v01\_contig\_16788, kodiert ausschließlich für eine HOLI Domäne mit einem e-Wert von  $1e^{-5}$  und verfügt in der blastx Analyse über eine hohe Homologie, mit einem e-Wert von  $2e^{-68}$ , zu dem COUP-TF1 nuclear orphan receptor [AAU11312.1] von *Hydra vulgaris* (Hydrozoa). Das letzte Gen dieser Gruppe gehört zu der Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie beinhaltet unter anderem die Melanocortin-Rezeptoren, die für die Pigmentierung und Appetit-Regulation zuständig sind (Cooray & Clark, 2010). Nach dem Beginn der Strobilation nimmt die Strobila keine Nahrung mehr auf und ihre Pigmentierung nimmt stark zu. Das Gen für den Melanocortin-Rezeptor, celera\_v01\_contig\_15429, kodiert für einen Sieben-Transmembran-G-Proteingekoppelten-Rezeptor (7TM\_GPCR\_Srd) mit einem e-Wert von  $3e^{-2}$ . In der blastx Analyse weist es eine Homologie, mit einem e-Wert von  $2e^{-8}$ , zu dem *melanocortin 1 receptor* [ACB11585.1] von *Crotalus tigris* (Reptilia) auf (Tab. 2.3, blau markiert).

Zu den sezernierten Morphogenen zählt ein Gen aus der *Transforming Growth Factor  $\beta$*  Familie, deren Proteine Prozesse wie Zellmigration, Differenzierung, Zellteilung und Apoptose regulieren (Gilbert & Singer, 2006). Das bekannte Gen 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_4359 (im weiteren BMP genannt) (Tab. 2.3 blau markiert), wurde durch eine *rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction* (RACE-PCR) erweitert. Es kodiert für ein sezerniertes Protein mit einem Signalpeptid, gefolgt von einem TGF- $\beta$  Propeptid mit einem e-Wert von  $1e^{-22}$  und einer *Transforming growth factor- $\beta$  family* (TGFB) Domäne mit einem e-Wert von  $2e^{-54}$  (Abb. 2.3 b). In der blastx Analyse weist es eine starke Homologie zu BMP5-8 [ABA42602.1] von *Podocoryna carnea* (Hydrozoa), mit einem e-Wert von  $7e^{-81}$ , auf.

Zwei weitere spannende TRGs, die zu den insgesamt am stärksten exprimierten Genen gehören, bilden die dritte Gruppe der zu untersuchenden Gene (Abb. 2.3 c, Tab. 2.3 blau markiert). Das TRG Cl160 kodiert ein Protein von 140 Aminosäuren (aa) ohne Domänen. Das zweite TRG Cl631 kodiert ein sezerniertes Protein mit Signalpeptid und mehreren Arginin-Wiederholungen (XRX<sub>37</sub>RX<sub>8</sub>RXR<sub>17</sub>RX<sub>15</sub>R<sub>5</sub>X<sub>13</sub>RX<sub>15</sub>R<sub>5</sub>X<sub>13</sub>RX<sub>15</sub>R<sub>5</sub>X<sub>13</sub>RX<sub>2</sub>). Bei *Hydra* (Hydrozoa) wurde bereits bewiesen, dass TRGs einen Einfluss auf die Musterbildung und die Morphogenese haben können (Khalturin *et al.*, 2008).

Zudem wurden zwei Gene ausgewählt, die für transkriptions-regulierende Proteine kodieren. Ihre veränderte Expression sollte epigenetische Prozesse während der Strobilation aufdecken (Abb. 2.3 d, Tab. 2.3 blau markiert). Dazu gehörte das Gen *celera\_v01\_contig\_14607*, das ein Protein mit sechs *beta-transducin repeats* (WD40) mit e-Werten von  $9e^{-0}$ ,  $7e^{-8}$ ,  $6e^{-6}$ ,  $5e^{-0}$ ,  $5e^{-0}$ ,  $4e^{-1}$  kodiert. In der blastx Analyse hat es eine große Homologie zu *embryonic ectoderm development* (EED) [AAR06604.1] von *Hydra vulgaris* (Hydrozoa) mit einem e-Wert von  $3e^{-140}$ . Das EED Protein gehörte zu dem Polycomb Repressions-Komplex 2, der speziell das Histon H3 methyliert und so über eine epigenetische Chromatin-Modifikation Gene ausschaltet (Genikhovich *et al.*, 2005). Das zweite Gen, *de novo*-Methyltransferase (DNMT) genannt, wurde aus mehreren Singletons zusammengesetzt und kodiert für eine Zink-Finger-Domäne (zf-CXXC) mit einem e-Wert von  $3e^{-17}$  und eine *Bromo adjacent homology* Domäne (BAH), die in eukaryotischen DNA-Methyltransferasen vorkommt, mit einem e-Wert von  $5e^{-2}$ . Zudem weist das Gen eine starke Homologie zu der DNA-Methyltransferase 1c [CAD43079.1] von *Paracentrotus lividus* (Echinodermata) mit einem e-Wert von  $1e^{-138}$  auf.

Die letzte Gruppe umfasst sechs Gene, die für Transkriptionsfaktoren (TF) kodieren (Abb. 2.3 e, Tab 2.3 blau markiert). Diese binden spezifisch an die DNA und induzieren oder inhibieren die Transkription weiterer Gene. Dazu gehörte das Gen *celera\_v01\_contig\_CL4522* (im weiteren ETS genannt), das eine SAM/Pointed (SAMPNT) Domäne mit einem e-Wert  $1e^{-28}$  und eine *erythroblast transformation specific* (ETS) Domäne mit einem e-Wert von  $3e^{-59}$  aufweist. In der blastx Analyse verfügt das Gen über eine starke Homologie mit einem e-Wert von  $6e^{-139}$  zu dem „PREDICTED: similar to *Ets domain transcription factor* [XP\_002163608.1]“ von *Hydra magnipapillata* (Hydrozoa). Während der Metamorphose von *Drosophila* konnte bereits gezeigt werden, dass der TF *E74A*, der für eine ETS-Domäne kodiert und zu den „*early response genes*“ gehört, im Verlauf der Metamorphose weitere „*secondary response*“ Promotoren aktiviert (Urness & Thummel, 1995). Ein anderes interessantes Gen, *02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_3545*, *budhead* genannt, kodiert für eine Forkhead (FH) Domäne mit einem e-Wert von  $9e^{-44}$ . Zudem weist es eine große Homologie zu dem „PREDICTED: similar to *forkhead protein/forkhead protein domain* [XP\_001812698.1]“ von *Tribolium castaneum* (Insecta) mit einem e-Wert von  $6e^{-42}$  auf. Die Expression von *forkhead* (*budhead*) während der Strobilation könnte sehr interessant sein, da es in *Hydra* eine kritische Rolle in der Kopf- und damit bei der Achsenbildung spielt (Martinez *et al.*, 1997). Ein weiteres

interessantes Gen für die Entwicklung der Augen und sensorischen Organe war *paired-box-gene* (PAX) 6, zusammengesetzt aus mehreren *Singletons*. Es kodiert für eine PAX Domäne mit einem e-Wert von  $1e^{-89}$  und verfügt über eine Sequenzähnlichkeit mit dem Pax-B [AAB58294.1] von *Chrysaora quinquecirrha* (Scyphozoa) von  $3e^{-55}$ . Ein anderes Gen 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_7593 kodiert für eine T-Box/Brachyury (TBOX) Domäne mit einem e-Wert von  $3e^{-103}$ . Das *brachyury* Homolog *HyBra1* verfügt über eine wichtige Rolle in der frühen Formation des Hypostoms bei *Hydra* (Bielen *et al.*, 2007). Die blastx Analyse des Gens ergibt eine starke Homologie zu *tbx1* [AAQ23383.1] von *Nematostella vectensis* (Anthozoa) von  $4e^{-80}$ . Ein BMP-regulierender TF stellte das Gen 3169fA\_c02\_1186 dar. Es kodiert für zwei von Willebrand Faktor Typ C (VWC) Domänen mit e-Werten von  $8e^{-2}$  und  $2e^{-3}$ , sowie eine Pacifastin I Domäne mit einem e-Wert von  $5e^{-4}$ . Zudem verfügt es über eine hohe Sequenzähnlichkeit zu dem *chordin-like protein* [AA060428.1] von *Hydra magnipapillata* (Hydrozoa) mit einem e-Wert von  $4e^{-24}$ . Das letzte Gen dieser Gruppe 02\_aurelia\_rc\_final\_rs ASM#1\_13042 kodiert für eine Homeodomain (HOX) mit einem e-Wert von  $5e^{-20}$  und wies in der blastx Analyse eine Sequenzähnlichkeit von  $2e^{-32}$  zu dem homeodomain protein *Msx* [AAX58756.1] von *Podocoryna carnea* (Hydrozoa) auf. Bei *Podocoryna carnea* konnte *PcMsx* schon im Entocodon und in der sich differenzierenden Muskulatur der Meduse festgestellt werden (Seipel & Schmid, 2005).

Diese 16 strobilationsspezifischen Gene wurden mit der ISH auf ihre Expression in den vier verschiedenen Lebensstadien, Polyp, junge Strobila, alte Strobila und Ephyra - beschrieben in Kapitel 2.2.5 - untersucht.

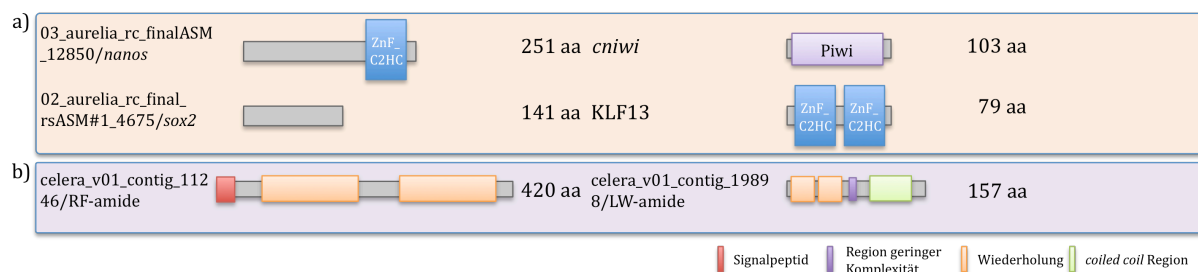
**Tab. 2.3:** Übersicht der verwendeten Gene in der *whole mount in situ* Hybridisierung, unterteilt in die verschiedenen Ansätze der Hybridisierungen mit Kapitelnummer: 2.2.4 Gene für die Etablierung der *whole mount in situ* Hybridisierung, 2.2.5 Strobilationsspezifische Gene, 2.2.6 Spezifische Gene des Polypen und der Ephyra, 2.2.7 Stammzellspezifische Gene, 2.2.8 Nervensystemspezifische Gene. Die Spalten der Tabelle beziehen sich auf die verwendete Assembly, den Sequenz-Namen innerhalb der Assembly, den festgelegten Gen-Namen, die Länge des Gens in bp und die Länge der verwendeten Sonden für die *whole mount in situ* Hybridisierung in bp. Durch eine *basic local alignment search tool for nucleotides* (blastn) Analyse wurden alle Transkripte, die nicht aus einer Celera Assemblierung stammten, der identischen Sequenz in der Assemblierung aurelia\_celera\_v01 oder aurelia\_celera\_v02 zugeordnet. Dadurch konnte die Expression eines Transkripts, angegeben in Reads aus dem ein Contig zusammengesetzt wurde, bezogen auf die Lebensstadien Polyp (Po), Strobila (St) und Ephyra (Ep), abgeleitet werden. In der Spalte *in situ* Hybridisierung werden die Zellen oder Lebensstadien angegeben, die ein deutliches Signal aufwiesen. Farbcode: braun: Gene für die Etablierung der *whole mount in situ* Hybridisierung, blau: strobilationsspezifische Gene, rot: polypenspezifische Gene, grün: ephyraspezifische Gene, orange: stammzellspezifische Gene, violett: Präkursor-Neuropeptid-Gene.

## Kapitel 2: Ergebnisse

Assem- bly	Sequenz-Name	Gen Name	Sequenz- Länge	Sonden- Länge	Celera Assembly Übereinstimmung	Po Reads	St Reads	Ep Reads	<i>in situ</i> Hybridisierung
2.2.4 Gene für die Etablierung der <i>whole mount in situ</i> Hybridisierung									
bs_pol yp	aurelia_bs_polyp_run 090409_87	zebra	1330 bp	1188 bp	celera_v02_CI107	996	204	872	Drüsenzellen
rc_fina l	03_aurelia_rc_finalASM_3407	Minicollagen CI3407	851 bp	356 bp	celera_v01_CI4068	59	166	111	Nematoblasten
rc_fina l	01_aurelia_rc_strobila_ run090409_1764	Minicollagen CI1764	608 bp	504 bp	celera_v01_CI7797	1	14	4	Nematoblasten
rc_fina l	03_aurelia_rc_finalASM_1900	Minicollagen CI1900	1170 bp	514 bp	celera_v01_CL13738	20	51	14	Nematoblasten
rc_fina l	03_aurelia_rc_finalASM_7145	Minicollagen CI7145	1109 bp	427 bp	celera_v01_CI11588	51	90	74	Nematoblasten
rc_fina l	03_aurelia_rc_finalASM _12648	Minicollagen CI12648	872 bp	583 bp	celera_v01CI5962	7	73	20	Nematoblasten
2.2.5 Strobilationspezifische Gene									
celera v02	112 rA_c02_112	EFG	1693 bp	879 bp	celera_v02_CI112	2	995	257	frühe Strobila
celera v02	390 rA_c02_390	Rx Gene	711 bp	515 bp	celera_v02_CI390	0	2002	9	frühe Strobila
celera v02	1661 rA_c02_1661	HMG	1450 bp	525 bp	celera_v02_CI1661	18	335	34	Proliferations- zone Ropalien
celera v01	celera_v01_contig_2599	<i>patched</i>	2483 bp	826 bp	celera_v02_CI3211	0	151	207	Segmente der Strobila
celera v01	celera_v01_contig_3071	<i>patched II</i>	2402 bp	1018 bp	celera_v02_CI295	117	28	131	Endoderm jedes Stadium
celera v01	celera_v01_contig_26884	RXR	452 bp	391 bp	celera_v02_CI10669	1	7	0	Rhopalien, Strobila
celera v01	celera_v01_contig_16788	RXR II	958 bp	831 bp	celera_v02_CI6704	2	15	4	kein Signal
rc_fina l	03_aurelia_rc_final ASM_848	<i>frizzled</i>	961 bp	867 bp	celera_v02_CI1828	4	39	28	kein Signal
celera v01	celera_v01_contig_15429	Melanocortin Rezeptor	1106 bp	934 bp	celera_v01_CI15429	16	5	8	kein Signal
rc_fina l	03_aurelia_rc_finalASM_4359	BMP	1328 bp	422 bp	celera_v02_CI8094&1 1138	2	8	8	Proliferationsz- one Rhopalien
celera v02	160 rA_c02_160	<i>heme binding</i>	650 bp	512 bp	celera_v02_CI160	0	283	1227	Gastrovaskular- system
celera v02	631 rA_c02_631	Rx Gene	791 bp	581 bp	celera_v02_CI631	0	2458	1617	frühe Strobila
celera v01	celera_v01_contig_14607	EED	1360 bp	1057 bp	celera_v02_CI5371	3	29	1	kein Signal
rc_fina l	F30U4RL01CQ9OZ	DNMT	1393 bp	1300 bp	keine Übereinstimmung	-	-	-	kein Signal
celera v01	celera_v01_contig_CL4522	ETS	1515 bp	1130 bp	celera_v01_CL4522	2	19	44	Polyp, Strobila
rc_fina l	02_aurelia_rc_final_ rsASM#1_3545	<i>budhead</i>	265 bp	267 bp	celera_v02_CI25476	1	1	0	kein Signal
rc_fina l	F30U4RL02GHCJ6	<i>pax 6</i>	403 bp	403 bp	keine Übereinstimmung	-	-	-	kein Signal
rc_fina l	03_aurelia_rc_finalASM_7593	<i>Tbx1</i>	814 bp	591 bp	celera_v02_CI9908	0	4	7	kein Signal
celera v02	3169 fA_c02_1186	<i>chordin</i>	2077 bp	1235 bp	celera_v02_CI1186	17	16	302	kein Signal
rc_fina l	02_aurelia_rc_final_rs ASM#1_13042	MSX	451 bp	395 bp	celera_v02_CI20359	0	2	1	kein Signal
2.2.6 Spezifische Gene des Polypen und der Ephyra									
bs_pol yp	aurelia_ bs_polyp_run090409_5	Rx Gene	677 bp	523 bp	celera_v02_1655	1409	38	0	Tentakeln
celera v01	db454_aurelia_celera_v01_ contig_4176 (CL2)	Rx Gene	822 bp	508 bp	celera_v01_CI4176	488	13	4	Endoderm Polyp
rc_pol yp	03_aurelia_rc_polyp_ finalASM_1549	Toxin	1466 bp	1282 bp	celera_v02_CI839	78	1	4	Drüsenzellen
rc_pol yp	03_aurelia_rc_polyp_ finalASM_1270	Toxin	1445 bp	1007 bp	celera_v02_CI896	63	0	113	Drüsenzellen
celera v02	CI3975 fA_c02_5805	<i>mesoglein</i>	1534 bp	610 bp	celera_v02_CI3975	1	10	238	Hypostom & Mesogleazellen
rc_eph yra	03_aurelia_rc_ephyra_ finalASM_3300	<i>myosin tail</i>	5900 bp	905 bp	celera_v02_CI484	2	0	291	Ring- & Längs- muskulatur
2.2.7 Stammzellenspezifische Gene									
rc_fina l	03_aurelia_rc_finalASM _12850	<i>nanos</i>	1428 bp	697 bp	celera_v02_CI8933&9 532	0	19	2	Rhopalien, Strobila
rc_fina l	F2X1FZH02JK691& F2X1FZH02H0IRU	<i>cniwi</i>	454 bp	424 bp	keine Übereinstimmung	-	-	-	kein Signal
rc_fina l	02_aurelia_rc_final_ rsASM#1_4675	<i>sox2</i>	1075 bp	980 bp	celera_v02_CI21935	1	0	2	kein Signal
rc_fina l	F2K13CN02GKLV	KLF13	239 bp	222 bp	celera_v02_CI27914	0	3	0	kein Signal
2.2.8 Nervensystemspezifische Gene									
celera v01	celera_v01_contig_11246	RF-amide	2686 bp	1178 bp	celera_v02_CI4387	11	6	112	Nervenzellen
celera v01	celera_v01_contig_19898	LW-amide	583 bp	501 bp	celera_v02_CI8707	4	2	8	Nervenzellen

Zusätzlich wurden vier stammzellspezifische Transkriptionsfaktoren ausgewählt, um Stammzellen in den verschiedenen Lebensstadien von *Aurelia aurita* zu detektieren (Abb. 2.4 a, Tab. 2.3 orange markiert). Ihr Nachweis sollte etwas über ihre Morphologie und ihr Vorkommen in Erfahrung bringen. Das Gen 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_12850 (im weiteren *nanos* genannt) wurde durch eine RACE erweitert und kodiert für eine Zink-Finger-Domäne (ZnF\_C2HC) mit einem e-Wert von  $1e^{-0}$ . In der blastx Analyse verfügt es über eine große Homologie zu *nanos 1* [AAU11513.1] von *Podocoryna carnea* (Hydrozoa) mit einem e-Wert von  $3e^{-42}$ . Ein weiteres spannendes Gen ist *cniwi*. Zusammengesetzt aus mehreren Singletons, kodiert es für eine Piwi-Domäne mit einem e-Wert von  $1e^{-12}$ . Es weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *piwi* [BAJ07609.1] von *Ephydatia fluviatilis* (Anthozoa) mit einem e-Wert von  $4e^{-43}$  auf. Das dritte ausgewählte Gen 02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_4675 (im Folgenden *sox2* genannt) weist keine Protein-Domänen auf. In der blastx Analyse verfügt es aber über eine hohe Homologie zu SoxBb [ACF33140.1] von *Acropora millepora* (Anthozoa) mit einem e-Wert von  $4e^{-30}$ . Das letzte Gen dieser Gruppe, der *Krüppel-like faktor* (KLF) 13, wurde zusammengesetzt aus mehreren Singletons und kodiert für zwei Zink-Finger Domänen (ZnF\_C2HC) mit e-Werten von  $1e^{-2}$  und  $10e^{-5}$ . Es verfügt in der blastx Analyse über eine hohe Sequenzähnlichkeit zu dem PREDICTED: *krueppel-like factor 13-like* [XP\_002749103.1] von *Callithrix jacchus* (Chordata) mit einem e-Wert von  $7e^{-37}$ .

Die Expression dieser stammzellspezifischen Gene wurde ebenfalls in der ISH an den vier verschiedenen Lebensstadien (s.o.) untersucht (K. 2.2.7).



**Abb. 2.4:** Übersicht über die SMART Protein-Vorhersage stammzellspezifischer Gene (a) und Präkursor-Neuropeptid-Gene (b). a: 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_12850/nanos, *cniwi*, 02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_4675/sox2, KLF13; b: celera\_v01\_contig\_11246/RF-amid, celera\_v01\_contig\_19898/LW-amid.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Metamorphose ist die Veränderung des diffusen Nervensystems des Polypen zu dem organisierten Nervensystem der Meduse mit



Sinnesorganen. Um die neuronalen Zellen zu detektieren, wurden zwei Gene verwendet, die über eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Präkursor-Neuropeptiden verfügen (Abb. 2.4 b, Tab. 2.3 violett markiert). Das Gen *celera\_v01\_contig\_11246* (im weiteren Arginin-Phenylalanin-Amid (RFamid)) genannt, kodiert für ein sezerniertes Protein mit Signalpeptid und zwei Wiederholungen. Es verfügt über eine hohe Sequenzähnlichkeit zu dem precursor protein for RFamide [CAA66062.1] von *Hydractinia echinata* (Hydrozoa) mit einem e-Wert von  $9e^{-105}$ . Das zweite Gen (im folgenden *Leucin-Tryptophan-amid* (LWamid) genannt) kodiert für zwei Wiederholungen und eine *coiled coil* Region. In der blastx Analyse verfügt es über eine starke Homologie zu dem „Full=LWamide neuropeptid [Q16992.1]“ von *Anthopleura elegantissima* (Anthozoa) mit einem e-Wert von  $2e^{-07}$ .

Die Expression der beiden Präkursor-Neuropeptid-Gene wurde in Kapitel 2.2.8 ebenfalls mit der ISH an vier verschiedenen Lebensstadien (s.o.) überprüft.

Der nächste Schritt bestand darin, die ausgewählten Gene mit der *whole mount in situ* Hybridisierung zu verifizieren. Dieser Nachweis bot zudem die Möglichkeit näheres über den Zelltyp, in dem das Transkript exprimiert wird, und über dessen Lokalisation im Tier zu erfahren.

### **2.2.4 Etablierung eines Protokolls zur *whole mount in situ* Hybridisierung an *Aurelia aurita***

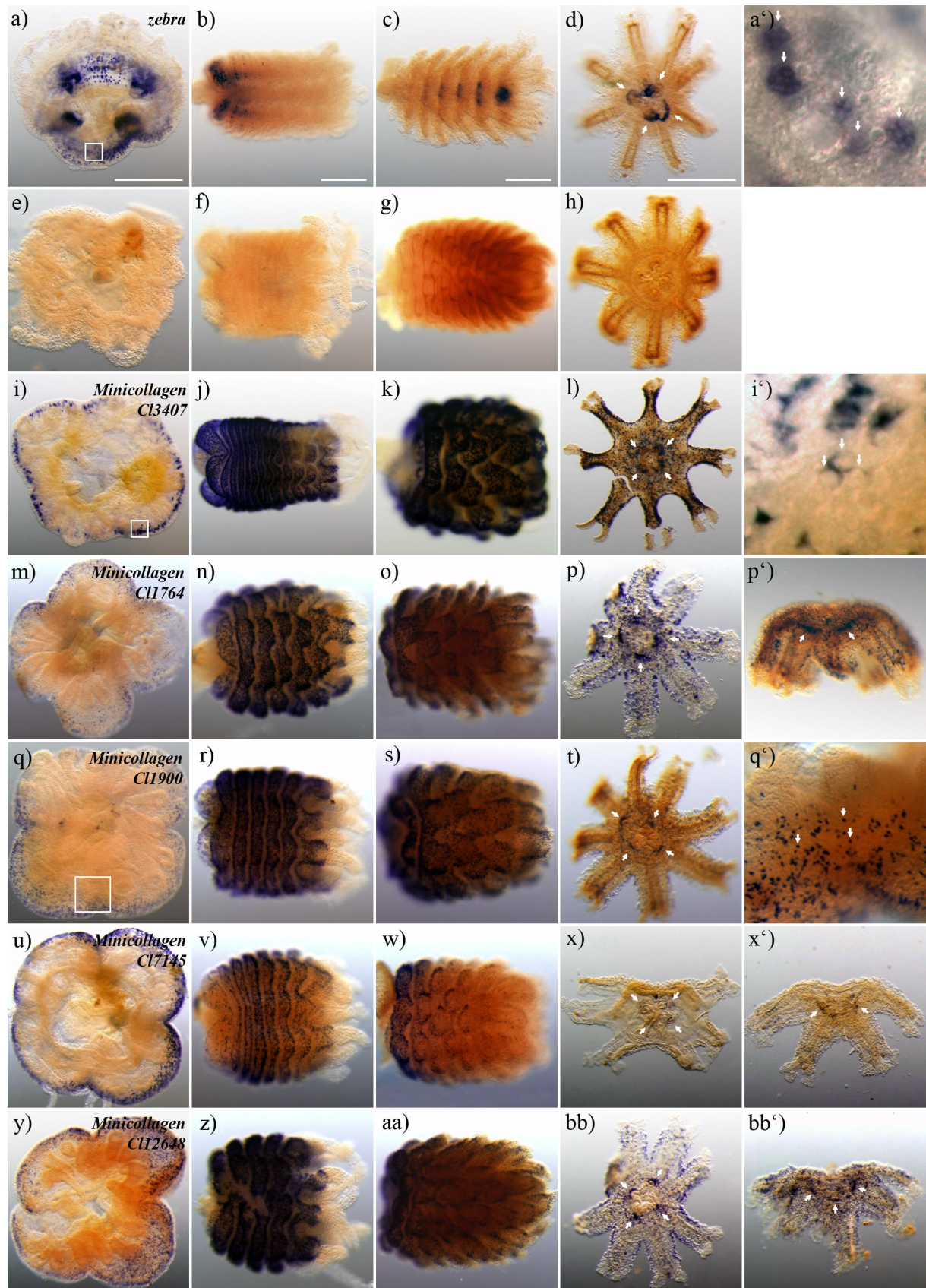
Um die stadienspezifische Expression der ausgewählten Transkripte zu belegen, wurde für *Aurelia aurita* das Protokoll der *whole mount in situ* Hybridisierung (ISH) für die Lebensstadien - Polyp, Strobila und Ephyra - etabliert. Dafür wurden Sonden zunächst einmal gegen einzelne stark exprimierte Gene von *Aurelia aurita*, die bereits bei anderen Cnidaria mit der ISH untersucht worden waren, erstellt. Diese *Aurelia aurita* spezifischen Gene stammten aus der aurelia\_bs\_polyp\_run090409- (K. 2.5.1) und der db454\_aaur\_rc\_final-Assemblierung (K. 2.2.1).

Für die Herstellung der *in situ* Sonden wurden folgenden Gene verwendet: aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_87, das in der blastx Analyse mit dem TRG *zebra precursor* [AAR31143.1] von *Hydra vulgaris* eine Ähnlichkeit  $1e^{-27}$  aufweist und in endodermalen Drüsenzellen exprimiert wird (Tab. 2.3 braun markiert), sowie zusätzliche Gene

(Cl3407, Cl1764, Cl1900, Cl7145 und Cl12648), die hohe Sequenzähnlichkeiten zu den von David *et al.*, 2008 beschriebenen Minicollagen-Protein-Gruppen 1-3 aufweisen (Tab. 2.3 braun markiert). Minicollagen-Gene werden spezifisch in ektodermalen Nematoblasten der verschiedenen Cnidaria exprimiert (David *et al.*, 2008).

Die Modifikationen des Protokolls der *whole mount in situ* Hybridisierung (K. 7.10.2) umfassten die Präinkubation des Antikörpers in zerstoßenen Lebensstadien für 24 Stunden, die Inkubation der Lebensstadien in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Beginn der ISH, sowie die Blockierung unspezifischer Bindungen mit doppelsträngiger RNA während der Hybridisierung. Diese Modifikationen ermöglichten die Detektion der Transkripte von *zebra* und *aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_87*, im Endoderm (Abb. 2.5 a-d) und der Minicollagene Cl3407, Cl1764, Cl1900, Cl7145, Cl12648 im Ektoderm (Abb. 2.5 i-bb).

In Drüsenzellen des Endoderms konnte die Expression von *zebra*, vor allem im Gastralbereich des Polypen und der Ephyra, nachgewiesen werden (Abb. 2.5 a, d). Während der Strobilation und der damit einhergehenden Entstehung des Gastrovaskularsystems der Ephyra ändert sich die Lokalisation der *zebra*-exprimierenden Zellen. In der frühen Strobila konnten *zebra*-positive Zellen in der Basis und in den Arealen der zukünftigen Gastralfilamente der Ephyra-Anlagen festgestellt werden (Abb. 2.5 b). In der späten Strobila waren *Zebra-positive* Zellen nur noch in den bereits entwickelten Gastralfilamenten der zukünftigen Ephyrae nachzuweisen (Abb. 2.5 c) Die Vergrößerung in Abb. 2.5 a' zeigt gefärbte Drüsenzellen - jede mit mehreren kleinen sekretorischen Vesikeln.



**Abb. 2.5:** whole mount in situ Hybridisierung an Polypen, Stobilae und Ephyrae von *Aurelia aurita*. Die verwendeten Sonden wurden gegen das *zebra* Transkript *aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_87* und gegen mehrere Minicollagen-Transkripte erstellt. a-d: *zebra*, antisense-Sonden-Hybridisierung; e-h: *zebra*, sense-Sonden-Hybridisierung; i-l: Minicollagen C13407, antisense-Sonden-Hybridisierung; m-p: Minicollagen C11764, antisense-Sonden-Hybridisierung; q-t: Minicollagen C11900, antisense-Sonden-

Hybridisierung; u-x: Minicollagen Cl7145, antisense-Sonden-Hybridisierung; y-bb: Minicollagen Cl12648, antisense-Sonden-Hybridisierung. a,e,i,m,q,u,y: Polypen, apikal; b, f, j, n, r, v, z: junge Strobilae, lateral; c, g, k, o, s, w, aa: späte Strobilae, lateral; d, h, l, p, t, x, bb: Ephyrae, oral. a': Drüsenzellen, Ausschnitt von a in 40 x Vergrößerung; i': Nematoblasten, Ausschnitt von i in 40 x Vergrößerung; p', x', bb': Ephyrae lateral; q': Polyp lateral. Größenmaßstab in a, b, c und d je 1 mm.

Die Expression der verschiedenen Minicollagen-Transkripte Cl3407, Cl1764, Cl1900, Cl7145 und Cl12648 konnte in kleinen Zellen oder Zellengruppen im Ektoderm detektiert werden. Diese Zellen sehen den Nematoblasten und den Nematocyten von *Hydra* sehr ähnlich. Die markierten Zellen kommen ubiquitär in allen Lebensstadien, außer in den Tentakeln des Polypen, verteilt vor (Abb. 2.5 i-bb). Die Vergrößerung in Abb. 2.5 i' zeigt gefärbte Nematoblasten, die bereits deutliche Nematocyten entwickelt haben. Die laterale Ansicht des Polypen weist im Ektoderm verteilte Nematoblasten auf (Abb. 2.5 q'). Bei den Ephyrae konnten auffällig viele Nematoblasten in vier Bereichen um das Manubrium, jeweils zu den Flügellappen ausgerichtet, festgestellt werden (Abb. 2.5 e, p, t, x, bb). Abb. 2.5 p', x' und bb belegen diese Aussage (Pfeile) und zeigen zudem weitere Nematoblasten in der Exumbrella der Ephyra auf. Die *sense*-Kontrollen des Transkripts von aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_87, *zebra* (Abb. 2.5 e-h), wiesen kein Signal auf. Die *sense*-Kontrollen der Minicollagene waren ebenfalls frei von Expressionen (nicht gezeigt). Die unspezifische Färbung (Hintergrund) war in allen Lebensstadien durch die Modifikation des Protokolls sehr gering.

Somit konnte ich erfolgreich eine funktionierende ISH für die Lebensstadien Polyp, Strobila und Ephyra etablieren, mit der es möglich war weitere interessante Gene zu untersuchen.

### 2.2.5 Strobilationspezifische Gene

Um die Strobilation genauer zu verstehen, wurden stark exprimierte Gene sowie Gene mit speziellen Fähigkeiten wie Gene kodierend für Rezeptoren, sezernierte Morphogene, TRGs, transkriptions-regulierende Proteine und Transkriptionsfaktoren ausgewählt (K. 2.2.2 & 2.2.3). Insgesamt wurden die Expressionsmuster von 19 verschiedenen Genen mit der *whole mount in situ* Hybridisierung in den vier Lebensstadien Polyp, frühe und späte Strobila und Ephyra untersucht (Abb. 2.3 a-e, Tab. 2.3 blau markiert). Die elf Gene, deren Expression mit der ISH nachgewiesen werden

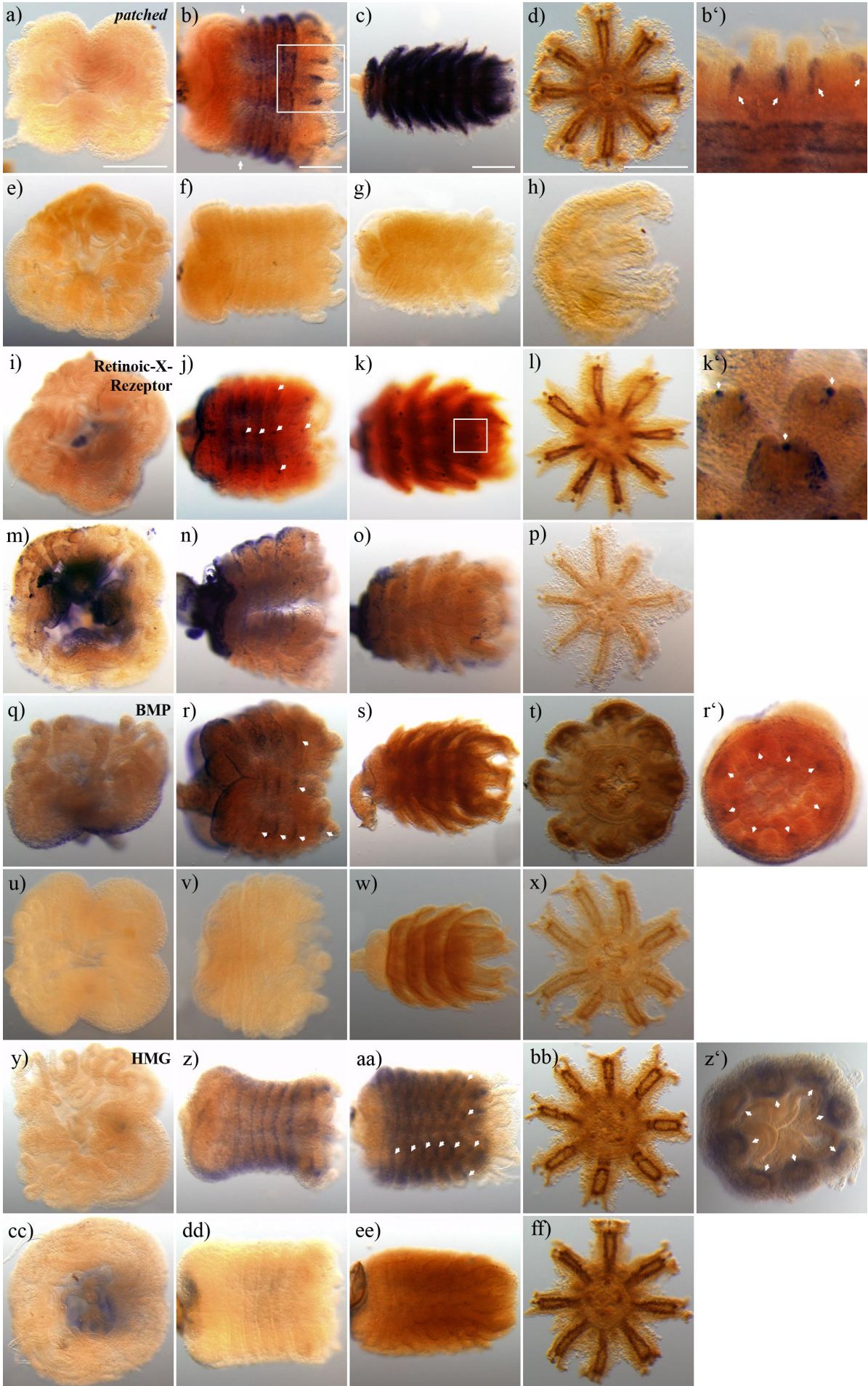
konnte, bilden zwei große Gruppen: Gene, die Homologien zu bereits bekannten Genen aufweisen und die *taxonomically restricted genes*.

Die erste Gruppe umfasst sieben Gene, die über starke Homologien zu bekannten Genen verfügen. Eines der interessantesten Muster hat das Gen *celera\_v01\_contig\_2599*, das für den *patched* Rezeptor des SHH Signaltransduktionswegs kodiert. Die Auswertung der 454-Sequenzierung ergab, dass es nicht im Polypen exprimiert wird, dafür aber in der Strobila (151 Reads) und in der Ephyra (207 Reads) (Tab. 2.3). Die Expression von *patched* konnte durch die ISH in ektodermalen Zellen jedes vollendeten Segments der frühen Strobila (Abb. 2.6 b) detektiert werden. Zellen, die das nächste Segment ausbilden, sind ebenfalls gefärbt (Abb. 2.6 b, Pfeile). Zudem war ein deutliches Signal in den Entstehungsorten der Lappen und an den Ansatzpunkten jedes zweiten Tentakels erkennbar (Abb. 2.6 b', Pfeile). Während des Verlaufs der Strobilation nimmt das Transkript in jedem ephyra-bildenden Segment stark zu. Die Basis der Strobila hingegen zeigt kein Signal (Abb. 2.6 c). Junge Ephyrae weisen noch eine schwache ektodermale Expression auf (Abb. 2.6 d), die bei älteren Ephyrae nicht mehr detektiert werden konnte (nicht gezeigt). Die untersuchten Polypenstadien weisen keine Expression auf (Abb. 2.6 a). Das Transkript des zweiten *patched II* Rezeptors, kodiert von dem Gen *celera\_v01\_contig\_3071*, konnte in jedem Lebensstadium gefunden werden. Die ISH detektierte *patched II*, konstitutiv exprimiert im Endoderm des Polypen, der jungen Strobila, der späten Strobila und in der Ephyra (nicht gezeigt). Diese Beobachtung wurde durch die Zusammensetzung des Contigs aus den Daten der 454-Sequenzierung aus 24 Reads des Polypen, 5 Reads der Strobila und 28 Reads der Ephyra bestätigt (Tab. 2.3). Die ISH gegen die Transkripte der beiden Retinoic-X-Rezeptoren zeigt nur in einem Fall ein positives Ergebnis. Das Transkript des Retinoic-X-Rezeptor (*celera\_v01\_contig\_26884*) konnte in der jungen, wie auch in der späten Strobila in ektodermalen Zellen, welche die Rhopalien ausbilden, detektiert werden (Abb. 2.6 j, Pfeile, k, k', Pfeile). Der Polyp und die Ephyra weisen keine Expression auf (Abb. 2.6 i, l). Die Zusammensetzung des Contigs aus der 454-Sequenzierung bestätigte die Expression in der Strobila (7 Reads), allerdings konnte die Expression im Polypen, mit einem Read, nicht verifiziert werden (Tab. 2.3). Der nach der 454-Sequenzierung insgesamt circa dreimal stärker exprimierte zweite Retinoic-X-Rezeptor (RXR II, *celera\_v01\_contig\_16788*), mit zwei Reads im Polypen, 15 Reads in der Strobila und vier Reads in der Ephyra, konnte mit der ISH nicht detektiert werden. Beide Retinoic-X-

Rezeptoren wurden zusätzlich mit einer RT-PCR auf ihre Expression in den in der ISH verwendeten Lebensstadien untersucht. Das Ergebnis der RT-PCR weist eine hohe Expression beider Retinoic-X-Rezeptoren während der Strobilation auf, in den anderen beiden Lebensstadien Polyp und Ephyra ist die Expression hingegen sehr schwach (nicht gezeigt). Dieses Expressionsprofil entspricht wesentlich besser den erhaltenen Daten aus der 454-Sequenzierung der beiden Retinoic-X-Rezeptoren, als den Ergebnissen der ISH. Ein weiteres spannendes Muster konnte mit Sonden gegen das Transkript von BMP (03\_aurelia\_rc\_finalASM\_4359) aus der TGF- $\beta$  Familie detektiert werden. In der frühen Strobila weisen an jedem vollendeten Segment ektodermale Zellen das Transkript an den Entstehungsorten der Lappen, beziehungsweise der Rhopalien, auf (Abb. 2.6 r, Pfeile, r', Pfeile). Im Polyp, der späten Strobila und der Ephyra konnte hingegen keine Expression belegt werden (Abb. 2.6 q, s, t). Im Gegensatz zu der durch die ISH detektierten Expression in der Strobila, sind aber bei der 454-Sequenzierung auch Transkripte von BMP im Polypen (2 Reads) und der Ephyra (8 Reads) neben den acht Reads der Strobila vorhanden (Tab. 2.3).

Ein sehr viel ausgeprägteres Muster während der Strobilation hat das Gen HMG (Cl1661). Im Vergleich zu den anderen bisher vorgestellten Transkripten wird es auch wesentlich stärker exprimiert. Das Contig wurde aus 18 Reads des Polypen, 335 Reads der Strobila und 34 Reads der Ephyra zusammengesetzt (Tab. 2.3). In der jungen Strobila exprimiert ein Ring aus ektodermalen Zellen an der apikalen Grenze eines jeden Segments das Transkript (Abb. 2.6 z). Das erste Segment der Strobila weist zudem eine Färbung der inneren ektodermalen Zellen jedes zweiten, sich in der Metamorphose befindenden, Ansatzes der Tentakeln auf (Abb. 2.6 z'). Im Verlauf der Strobilation entstehen in jedem Segment an den gemeinsamen Entstehungspunkten der Lappen und der Rhopalien acht Zentren aus HMG-exprimierenden Zellen (Abb. 2.6 aa, Pfeile). In der Ephyra und dem Polyp konnte, entgegen der 454-Sequenzierung, keine Expression festgestellt werden (Abb. 2.6 y, bb). Das letzte Gen dieser Gruppe wird bereits vor der Strobilation im Polypen exprimiert. Die Expression des Gens ETS (celera\_v01\_contig\_CL4522) konnte im Endoderm des Polypen und der Strobila detektiert werden. Die Ephyra hingegen weist keine Expression auf (nicht gezeigt). Die 454-Sequenzierung weist eine entgegengesetzte Expression im Vergleich zu den Ergebnissen der ISH auf, denn der ETS-codierende Contig wurde zusammengesetzt aus 2 Reads des Polypen, 19 Reads der Strobila und 44 Reads der Ephyra (Tab. 2.3).



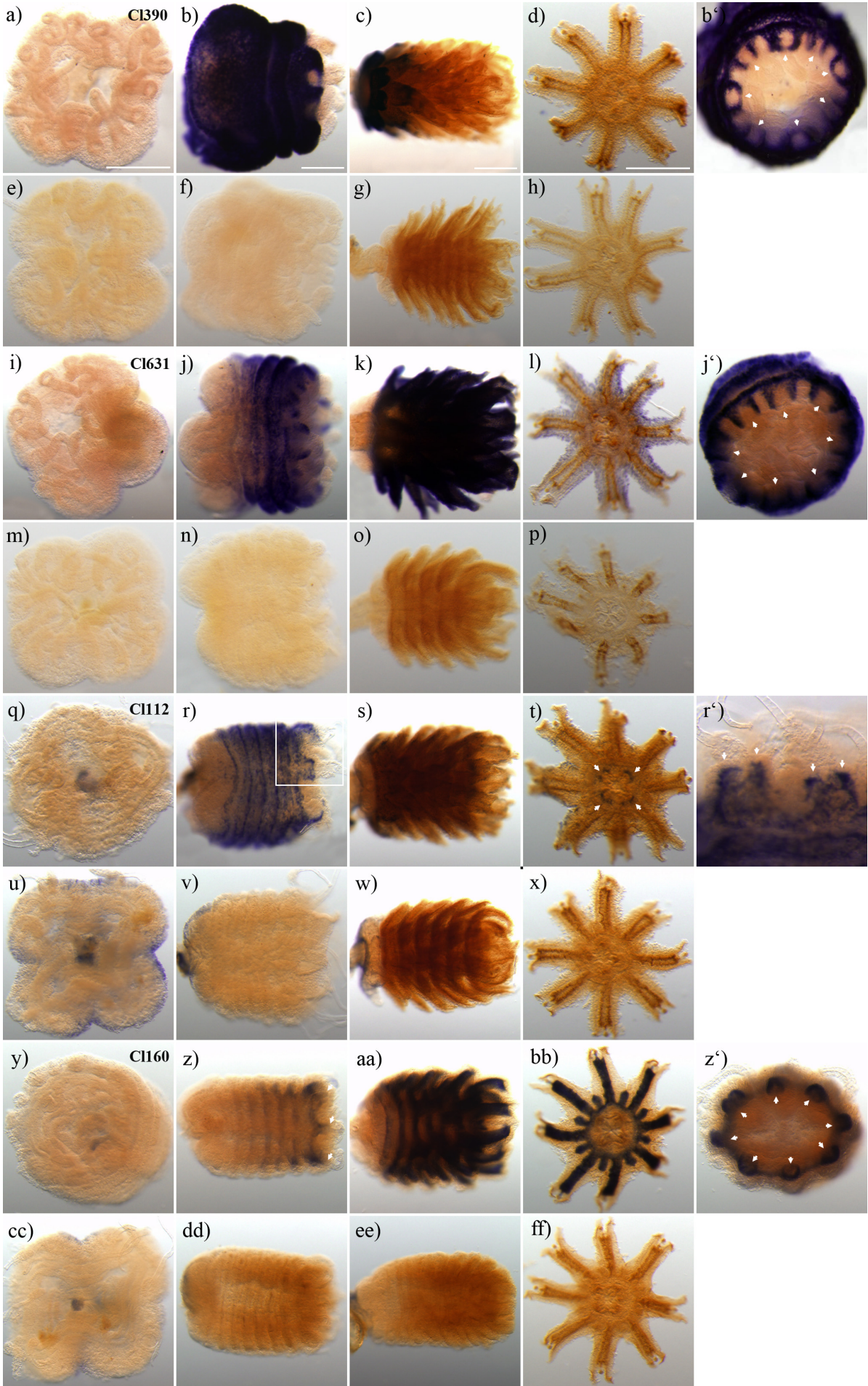


**Abb. 2.6:** *whole mount in situ* Hybridisierung gegen strobilationspezifische Transkripte von *Aurelia aurita*. a-d: *patched* (celera\_v01\_contig\_2599), antisense-Sonden-Hybridisierung; e-h: *patched* (celera\_v01\_contig\_2599), sense-Sonden-Hybridisierung; i-l: Retinoic-X-Rezeptor (celera\_v01\_contig\_26884), antisense-Sonden-Hybridisierung; m-p: Retinoic-X-Rezeptor (celera\_v01\_contig\_26884), sense-Sonden-Hybridisierung; q-t: BMP (03\_aurelia\_rc\_finalASM\_4359), antisense-Sonden-Hybridisierung; u-x: BMP (03\_aurelia\_rc\_finalASM\_4359), sense-Sonden-Hybridisierung; y-bb: HMG (Cl1661), antisense-Sonden-Hybridisierung; cc-ff: HMG (Cl1661), sense-Sonden-Hybridisierung; b': junge Strobila die *patched* in ektodermalen Zellen exprimiert - jeweils die Entstehungsorte der Lappen flankierend, lateral, Ausschnitt von b, 90 ° gegen den UZS gedreht; k': späte Strobila mit der Expression des Retinoic-X-Rezeptor Transkripts in ektodermalen Zellen an den Entstehungspunkten der Rhopalia, Ausschnitt von k; r': junge Strobila die in ektodermalen Zellen an den Entstehungsorten der Lappen bzw. der Rhopalien BMP exprimiert, apikal; z': junge Strobila die in innenliegenden ektodermalen Zellen an den Entstehungsorten der Lappen HMG exprimiert, apikal. a, e, i, m, q, u, y, cc: Polypen, apikal; b, f, j, n, r, v, z, dd: junge Strobilae, lateral; c, g, k, o, s, w, aa, ee: späte Strobilae, lateral; d, h, l, p, t, x, bb, ff: Ephyrae, oral. Größenmaßstab in a, b, c und d je 1 mm.

Die zweite Gruppe umfasst vier *taxonomically restricted genes*. Das Gen Cl390 stellt aufgrund der Ergebnisse der ISH den interessantesten Kandidaten für die Induktion der Strobilation dar. Zudem gehört Cl390 nach der 454-Sequenzierung zu den am stärksten exprimierten Genen des Strobilastadiums (2002 Reads). Im Polypen dagegen wird es nicht exprimiert und in der Ephyra (9 Reads) nur sehr schwach (Tab. 2.3). Die ISH belegt die Transkription von Cl390 in allen ektodermalen Zellen sobald die Strobilation einsetzt. Die frühe Strobila mit nur einem Segment weist bereits eine sehr starke Expression auf, ausgenommen sind dabei die Tentakel (Abb. 2.7 b). Die Zellen im ersten Segment am Ansatzpunkt jeder zweiten Tentakel verfügen in der Strobila, die sich noch in der Segmentierung befindet, bereits über eine deutliche Expression (Abb. 2.7 b' Pfeile). Mit fortschreitender Metamorphose nimmt die ektodermale Expression ab und lässt einen ausgeprägten sichtbaren Gradienten zwischen jüngeren, basalen Segmenten und den reiferen, apikalen Segmenten entstehen (Abb. 2.7 c). Die Polypen- und Ephyraestadien weisen keine Expression auf (Abb. 2.7 a, d). Ein weiteres mit Beginn der Strobilation (2458 Reads) stark exprimiertes Gen Cl631 wird im Gegensatz zu Cl390, auch über die Strobilation hinaus, in der Ephyra (1617 Reads) exprimiert (Tab. 2.3). In der ISH konnte die Expression von Cl631 in ektodermalen Zellen, jedes vollendeten Segments der jungen Strobila detektiert werden (Abb. 2.7 j). Wie bei Cl390 exprimieren bei Cl631 die Zellen im ersten Segment an acht Tentakelanlagen das Transkript (Abb. 2.7 j' Pfeile). Die jeweils dazwischen liegenden Tentakelanlagen weisen keine Expression auf. Mit fortschreitender Entwicklung nahm das Signal in den Zellen stark zu und war auch noch deutlich im Ektoderm der Ephyra sichtbar (Abb. 2.7 k, l). Im Polypen konnte wie in der 454-Sequenzierung keine Expression detektiert werden (Abb 2.7 i). Zwei



weitere TRGs werden ausschließlich im Endoderm exprimiert. Dazu gehört das Gen EGF (Cl112), das in endodermalen Zellen in jedem vollendeten Segment der jungen Strobila exprimiert wird (Abb. 2.7 r). Das erste Segment der jungen Strobila, das noch die Form des Hypostoms des Polypen aufweist, verfügt in den acht Tentakelanlagen, aus denen die Lappen der Ephyra entstehen, über eine ausgeprägte Expression (Abb. 2.7 r', Pfeile). In der späten Strobila war keine ausgeprägte Expression wahrzunehmen (Abb. 2.7 s). Die Ephyra hingegen weist das Transkript, in vier Bereichen von Zellen um das Hypostom, jeweils zu den Flügellappen hin ausgerichtet, auf (Abb. 2.7 t). Der Polyp weist keine Anzeichen einer Expression von EGF auf. (Abb. 2.7 q). Die 454-Sequenzierung bestätigte die Expression von EGF in den einzelnen Lebensstadien. Die Strobila verfügt über 995 Reads, die Ephyra über 257 Reads und im Polypen, in dem keine Expression detektiert werden konnte, sind nur 2 Reads vorhanden (Tab. 2.3). Das zweite in endodermalen Zellen exprimierte Gen ist Cl160. Die Expression von Cl160 beginnt mit der Entstehung des Gastrovaskularsystems des Ephyrastadiums während der Strobilation (Abb. 2.7 z). Die späteren Lappentaschen des Gastrovaskularsystems der Ephyra weisen bereits im ersten Segment der frühen Strobila eine ausgeprägte Expression auf (Abb. 2.7 z, z', Pfeile). Mit fortschreitender Strobilation exprimiert jedes Segment Cl160 in den Zellen des stark pigmentierten Gastrovaskularsystems (Abb. 2.7 aa). Auch in der Ephyra exprimieren die Zellen des kompletten Gastrovaskularsystems, ausgenommen der Bereich um das Hypostom, das Transkript (Abb. 2.7 bb). Das Polypenstadium zeigt keine Expression (Abb. 2.7 y). Verifiziert wurde die Expression von Cl160 durch die 454-Sequenzierung, die keine Reads im Polypen aufweist, dafür aber 283 Reads in der Strobila und 1227 Reads in der Ephyra (Tab. 2.3).



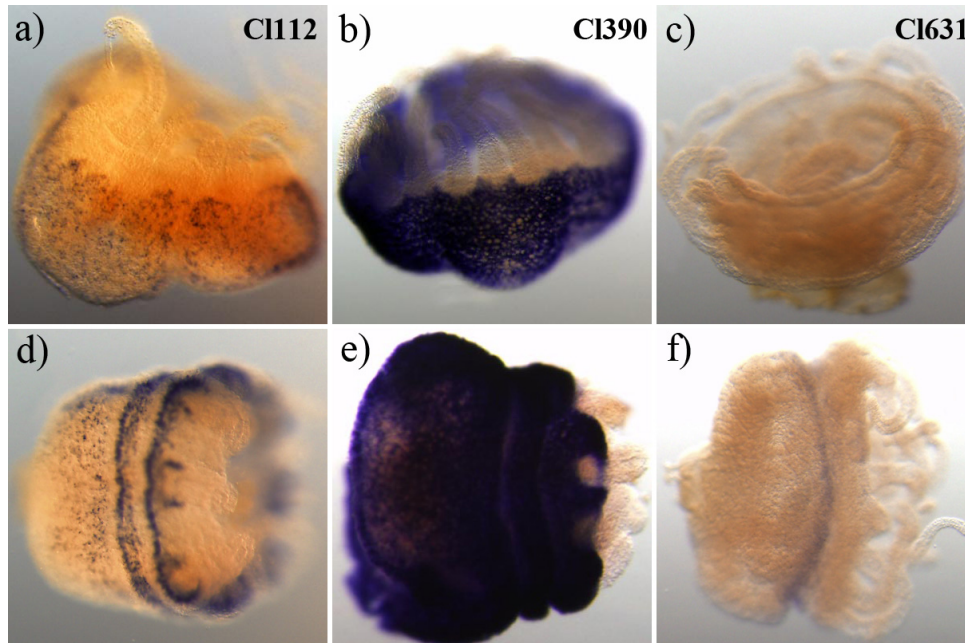
**Abb. 2.7:** *whole mount in situ* Hybridisierung gegen strobilationspezifische Transkripte von *Aurelia aurita*. a-d: Cl390, antisense-Sonden-Hybridisierung; e-h: Cl390, sense-Sonden-Hybridisierung; i-l: Cl631, antisense-Sonden-Hybridisierung; m-p: Cl631, sense-Sonden-Hybridisierung; q-t: Cl112, antisense-Sonden-Hybridisierung; u-x: Cl112, sense-Sonden-Hybridisierung; y-bb: Cl160, antisense-Sonden-Hybridisierung; cc-ff: Cl160, sense-Sonden-Hybridisierung. a, e, i, m, q, u, y, cc: Polypen, apikal; b, f, j, n, r, v, z, dd: junge Strobilae, lateral; c, g, k, o, s, w, aa, ee: späte Strobilae, lateral; d, h, l, p, t, x, bb, ff: Ephyrae, oral. b': Expression von Cl390 in ektodermalen Zellen der jungen Strobila, apikal; j': Expression von Cl631 in ektodermalen Zellen der jungen Strobila, apikal; r': endodermale Expression von Cl112 im ersten Segment der jungen Strobila, lateral, Ausschnitt von r, 90° gegen den UZS gedreht; z': endodermale Expression von Cl160 in der jungen Strobila, apikal. Größenmaßstab in a, b, c und d je 1 mm.

Für neun weitere Gene, die für Rezeptoren (03\_aurelia\_rc\_finalASM\_848, *frizzled*; celera\_v01\_contig\_15429, Melanocortin-Rezeptor), transkriptions-regulierende Proteine (celera\_v01\_contig\_14607, EED; F30U4RL01CQ9OZ, DNMT) oder Transkriptionsfaktoren (02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_3545, *budhead*; F30U4RL02GHCJ6, *pax 6*; 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_7593, *Tbx*; 3169fA\_c02\_1186, *chordin*; 02\_aurelia\_rc\_final\_rs\_ASM#1\_13042, *MSX*) kodieren, konnte keine Expression in der ISH detektiert werden (Tab. 2.3). Die Transkripte der untersuchten Gene sind möglicherweise zu schwach exprimiert und konnten deswegen nicht von einer unspezifischen Färbung unterschieden werden.

Um mögliche Induktoren für die Strobilation zu kategorisieren, sollten mit den drei Genen Cl112, Cl390 und Cl631, die nach den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung unmittelbar nach dem Beginn der Segmentierung exprimiert wurden, weitere Hybridisierungen durchgeführt werden. Dabei sollte ihre Expression noch vor dem Beginn der Strobilation überprüft werden. Dafür wurde die Strobilation mit einer Temperaturreduzierung induziert. Nachdem 10 % der Tiere in der Kultur strobilierten, wurden Polypen ohne Anzeichen der Metamorphose fixiert. Zudem wurden Strobilae mit nur einem Segment für diese Hybridisierung verwendet. Für das Gen Cl112 konnte die Expression in endodermalen Zellen in induzierten Polypen ohne morphologische Anzeichen der Strobilation detektiert werden (Abb. 2.8 a). Im bereits segmentierten Teil der Strobila wurde eine merklich erhöhte Expression detektiert (Abb. 2.8 d). Das zweite untersuchte Gen, Cl390, ist ausgeprägt in allen ektodermalen Zellen des induzierten Polypenstadiums, außer in den Zellen der Tentakel, exprimiert (Abb. 2.8 b). In der untersuchten Strobila ist das Transkript weiterhin hochgradig exprimiert vorhanden (Abb. 2.8 e). In der ISH mit dem dritten Gen, Cl631, konnte keine Expression in den induzierten Polypen festgestellt werden (Abb. 2.8 c). Das Gen Cl631 wird erst in der Strobila, an der apikalen Grenze des zweiten entstehenden Segments im Ektoderm,



exprimiert (Abb. 2.8 f). In den Kontrollen konnte keine Expression detektiert werden (nicht gezeigt).



**Abb. 2.8:** whole mount *in situ* Hybridisierung gegen strobilationspezifische Transkripte von *Aurelia aurita*. a, d: Cl112, antisense-Sonden-Hybridisierung; b, e: Cl390, antisense-Sonden-Hybridisierung; c, e: Cl631, antisense-Sonden-Hybridisierung. a, b, c: zur Strobilation induzierte Polypen, lateral; d, e, f: junge Strobilae mit einem Segment, lateral.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zwei Gene – Cl390 im Ektoderm und Cl112 im Endoderm - unmittelbar vor der Strobilation des Polypen exprimiert werden. Sie sind mögliche Induktoren der Strobilation. Zudem konnte belegt werden, dass der SHH Signaltransduktionsweg am Prozess der Segmentierung während der Strobilation beteiligt ist. Weitere Gene, wie das sezernierte Morphogen BMP und der Transkriptionsfaktor HMG, scheinen eine Rolle für die Entwicklung der Lappen und der Rhopalien zu spielen. Der Retinoic-X-Rezeptor hingegen konnte nur in den Rhopalien gefunden werden.

### 2.2.6 Spezifische Gene des Polypen und der Ephyra

Die verschiedenen, sich morphologisch stark voneinander unterscheidenden, Lebensstadien innerhalb des Lebenszyklus von *Aurelia aurita* benötigen offensichtlich

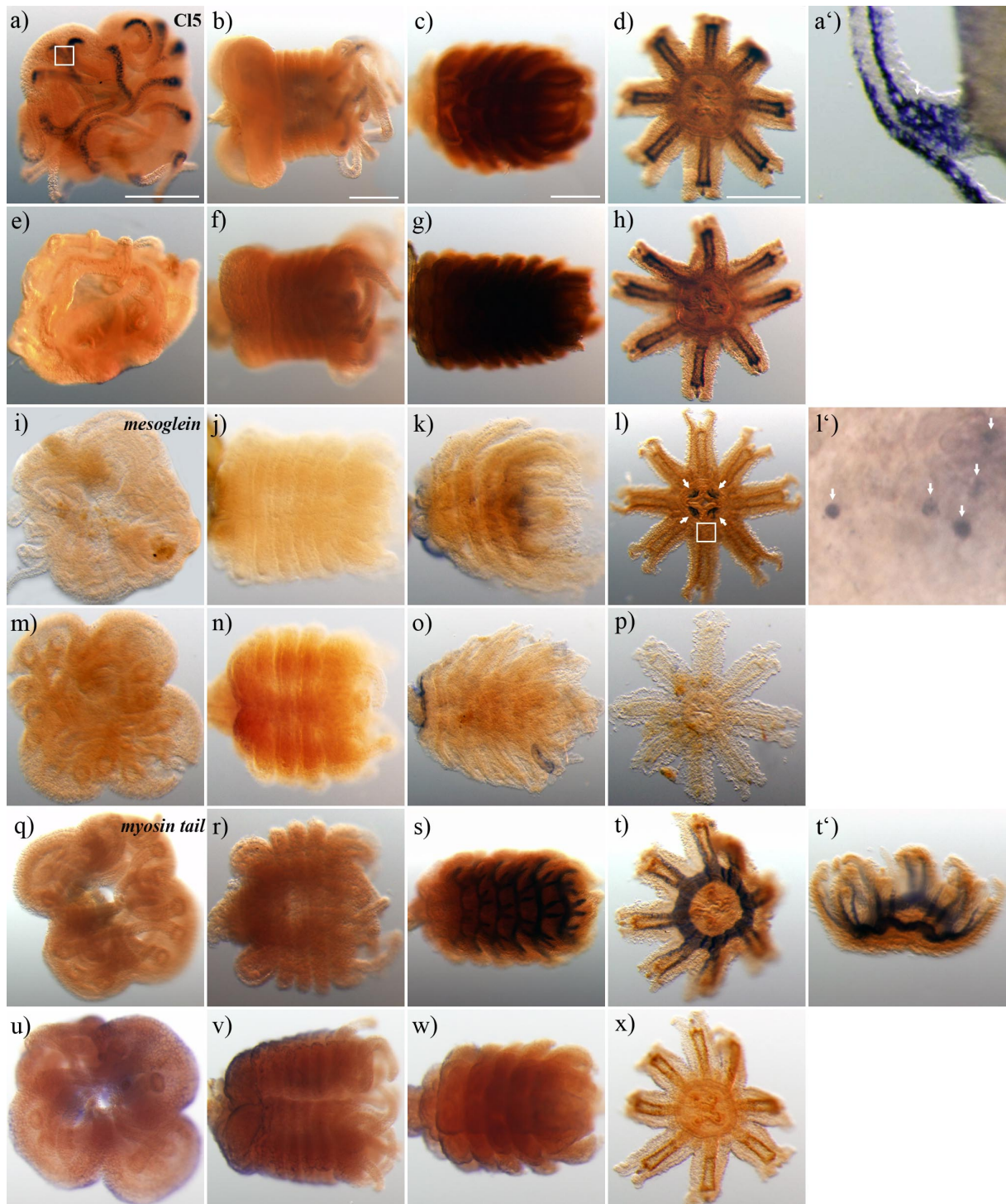
stadienspezifisch exprimierte Gene. Um diese genauer zu untersuchen, wurden Gene ausgewählt, die vorwiegend im Polypen oder in der Ephyra exprimiert werden (K. 2.2.2, Abb. 2.2 c-d, Tab. 2.3 grün & rot markiert). Diese und weitere andere Gene sind höchstwahrscheinlich für die Funktionen und die morphologischen Strukturen des Polypen oder der Ephyra verantwortlich. Um die Expressionsdomänen der einzelnen Gene genauer zu untersuchen, wurde die ISH mit den vier verschiedenen Lebensstadien - Polyp, frühe Strobila, späte Strobila und Ephyra - durchgeführt. Insgesamt wurden sechs verschiedene Gene mit der *whole mount in situ* Hybridisierung auf ihre Expression in den einzelnen Lebensstadien untersucht.

Es konnten zwei polypenspezifische Gene detektiert werden - beide gehören zu der Gruppe der *taxonomically restricted genes* (K. 2.2.2, Tab. 2.3 rot markiert). Das Gen, aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_5, Cl5 genannt, kodiert für ein sezerniertes Protein mit mehreren Arginin-Wiederholungen. Die Expression von Cl5 findet ausschließlich in einem schmalen Streifen von ektodermalen Zellen an der Außenseite jeder Tentakel des Polypenstadiums statt (Abb. 2.9 a, a', Pfeil). In der jungen Strobila war noch eine Expression in den Tentakeln erkennbar (Abb. 2.9 b), die mit fortschreitender Metamorphose endete (Abb. 2.9 c). Auch in der Ephyra konnte kein Transkript nachgewiesen werden (Abb. 2.9 d). Die Ergebnisse der 454-Sequenzierung weisen eine identische Expressions-Charakteristik auf. Cl5 wurde ausschließlich aus 1409 Reads des Polypen und 38 Reads der Strobila zusammengefügt (Tab. 2.3). Das zweite Gen dieser Gruppe, db454\_aurelia\_celera\_v01\_contig\_4176, Cl2 genannt, kodiert ebenfalls für ein sezerniertes Protein mit mehreren Arginin-Wiederholungen. Es wird sehr stark im Polypen (488 Reads) und nur noch gering in der Strobila (13 Reads) und der Ephyra (4 Reads) exprimiert (Tab. 2.3). Die ISH gegen das Transkript von Cl2 detektierte ausschließlich eine starke Expression in allen endodermalen Zellen des Polypen, alle weiteren Lebensstadien waren signalfrei (nicht gezeigt).

Die zwei untersuchten ephyraspezifischen Gene weisen Homologien zu bereits bekannten Genen auf (K. 2.2.2, Tab. 2.3 grün markiert). *Mesoglein* (Cl3975) wurde bereits als sezernierte *mesoglein variante 1*, die in Mesogleazellen exprimiert wird, beschrieben (Matveev *et al.*, 2007). Allerdings verfügt Cl3975 über eine zusätzliche Transmembrandomäne, somit ist *mesoglein* kein sezerniertes Protein, sondern ein Transmembranprotein. Die Auswertung der ISH von *mesoglein* wies, wie zu erwarten, transkript-exprimierende Zellen in der extrazellulären Matrix der Ephyra auf (Abb. 2.9 l,

l', Pfeil). Zudem konnte eine Expression in endodermalen Zellen am Hypostom in vier Arealen, jeweils zu den Stammlappen ausgerichtet, detektiert werden (Abb. 2.9 k, l). Im Polypen und in der frühen Strobila war keine Expression detektierbar (Abb. 2.9 i, j). Die 454-Sequenzierung belegt, dass strobilaspezifische Expressionsprofil des Transkripts mit einem Read im Polypen, zehn Reads in der Strobila und 238 Reads in der Ephyra (Tab. 2.3). Das zweite untersuchte Gen, 03\_aurelia\_rc\_ephyra\_finalASM\_3300, kodiert unter anderem die Endregion der schweren Kette von Myosin. Die ISH gegen das Transkript 03\_aurelia\_rc\_ephyra\_finalASM\_3300 (im Weiteren *myosin tail* genannt) weist eine endodermale Expression in den Längsmuskeln und im Ringmuskel der Ephyra auf (Abb. 2.9 t, t'). In der späten Strobila ist die Expression des *myosin tail* in den Muskeln jedes einzelnen Segments bereits ausgeprägt vorhanden (Abb. 2.9 s). Im Polypen und der frühen Strobila konnte keine Expression nachgewiesen werden (Abb. 2.9 q, r). Die Ergebnisse der 454-Sequenzierung entsprechen der ISH. Das Contig wurde zusammengesetzt aus zwei Reads des Polypen und 291 Reads der Ephyra (Tab 2.3). Aus dem Strobilastadium war kein Read vorhanden, da für die 454-Sequenzierung des Strobilastadiums größtenteils junge Strobilae verwendet wurden und das *myosin tail* Transkript erst in der späten Strobila exprimiert wird.

Zwei weitere untersuchte Gene werden sowohl im Polypen als auch in der Ephyra exprimiert (Tab. 2.3). Beide kodieren vermutlich Toxine. Die Expression des Gens 03\_aurelia\_rc\_polyp\_finalASM\_1549 wurde in Drüsenzellen des Polypen und der Ephyra in einem, mit der Expression von *zebra* vergleichbaren Muster, detektiert (nicht gezeigt). Das widerspricht den Ergebnissen der 454-Sequenzierung, da dieses Gen mit nur einem Read in der Strobila und vier Reads in der Ephyra, im Vergleich zu 78 Reads im Polypen, als polypenspezifisch klassifiziert worden war. Das zweite untersuchte Gen, 03\_aurelia\_rc\_polyp\_finalASM\_1270, enthält die Information für ein sezerniertes Protein, das in der blastx Analyse eine Sequenzähnlichkeit von  $3e^{-18}$  für ein Toxin [Q9GV72.1] von *Carybdea rastonii* (Cubozoa) aufweist. Die 454-Sequenzierung weist das Transkript im Polypen mit 63 Reads und der Ephyra mit 113 Reads nach. Die Ergebnisse der ISH entsprechen der 454-Sequenzierung. Die Expression des Gens konnte in endodermalen Drüsenzellen im Polypen und in der Ephyra in einem vergleichbaren Muster wie 03\_aurelia\_rc\_polyp\_finalASM\_1549 detektiert werden (nicht gezeigt).



**Abb. 2.9:** whole mount *in situ* Hybridisierung gegen stadienspezifische Gene in Polyp, Strobila und Ephyra von *Aurelia aurita*. a-d: Cl5 (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_5), antisense-Sonden-Hybridisierung; e-h: Cl5 (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_5), sense-Sonden-Hybridisierung; i-l: *mesoglein* (Cl3975), antisense-Sonden-Hybridisierung; m-p: *mesoglein* (Cl3975), sense-Sonden-Hybridisierung; q-t *myosin tail* (03\_aurelia\_rc\_ephyra\_finalASM\_3300), antisense-Sonden-Hybridisierung; u-x: *myosin tail* (03\_aurelia\_rc\_ephyra\_finalASM\_3300), sense-Sonden-Hybridisierung. a, e, i, m, q, u: Polypen, apikal; b, f, j, n, r, v: junge Strobilae, lateral; c, g, k, o, s, w: späte Strobilae, lateral; d, h, l, p, t, x: Ephyrae, oral. a': Tentakel, apikal, Ausschnitt von a vergrößert; l': Mesogleazellen, apikal, Ausschnitt von l in 63 x Vergrößerung; t': Ephyra, sagittal. Größenmaßstab in a, b, c und d je 1 mm.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass spezifisch exprimierte Gene, die nur in einem Lebensstadium exprimiert werden, existieren. Für das Polypstadium konnten Cl5 und Cl2, die beide für Proteine mit Arginin-Wiederholungen kodieren, mit der ISH als stadienspezifisch verifiziert werden. Im Ephyrastadium wurde durch die ISH die Expression der beiden Gene *mesoglein* und *myosin tail* als stadienspezifisch bestätigt.

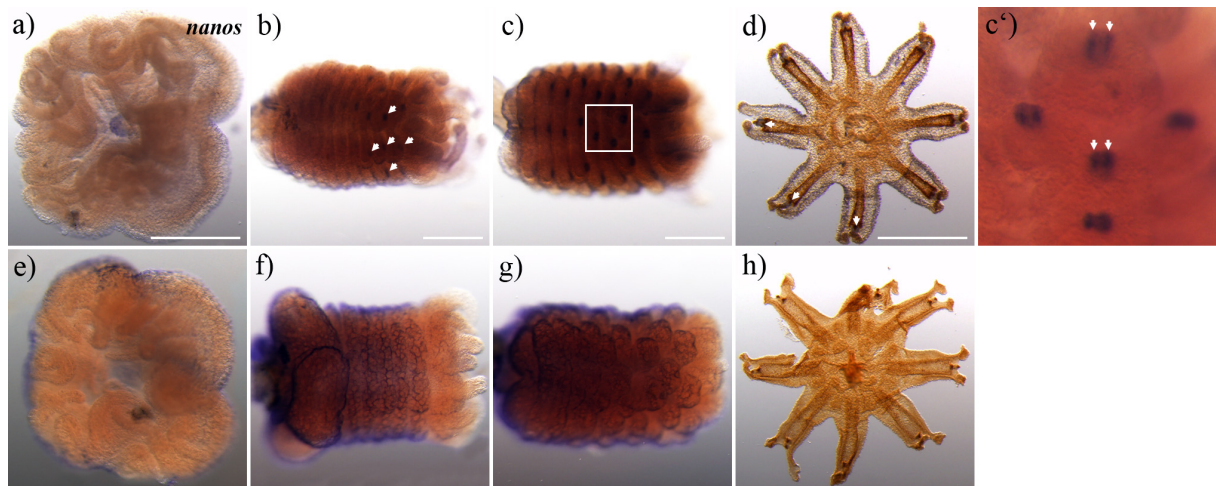
### 2.2.7 Stammzellspezifische Gene

Die Lebensstadien Polyp und Meduse unterscheiden sich im Bezug auf ihr Regenerationspotential und die Fähigkeit zur sexuellen Reproduktion stark voneinander. Dementsprechend sollte eine Veränderung in der Expression stammzellspezifischer Gene, ausgelöst durch die Metamorphose, stattfinden. In verschiedenen Hydrozoa, wie z. B. *Hydra*, werden Stammzellen durch schmale, spindelförmige „interstitielle Zellen“ im Ektoderm repräsentiert. Aus diesen interstitiellen Zellen entwickeln sich die Nervenzellen, Nematocyten, Drüsenzellen und Gameten (Bosch *et al.*, 2010). Um zu verstehen, welche Zellen bei *Aurelia aurita* einen Stammzellcharakter besitzen, wurden vier stammzellspezifische Gene, die in der blastx Analyse über große Homologien zu den Proteinen von *nanos*, *cniwi*, *sox2* und KLF13 verfügen, ausgewählt (K. 2.2.3, Abb. 2.4 a, Tab. 2.3 orange markiert). Mit der ISH wurde ihre Expression in vier unterschiedlichen Lebensstadien, Polyp, frühe und späte Strobila und Ephyra, untersucht. Ein besonderer Aspekt dabei war, Einblick in die Entwicklung und Anlage der Gonaden der Ephyra zu erlangen.

Das Transkript des Gens *nanos* (3\_aurelia\_rc\_finalASM\_12850) konnte in der jungen Strobila in ektodermalen Zellen an den Entstehungsorten der Rhopalien, der weiterentwickelten Ephyra-Anlage, detektiert werden (Abb. 2.10 b, Pfeile). In der späten Strobila konnte die Expression in zwei parallel zueinander liegenden Gruppen von ektodermalen Zellen an den Entstehungsorten der Rhopalien beobachtet werden (Abb. 2.10 c, c', Pfeile). Die Ephyra weist in den Rhopalien ebenfalls eine Expression in den ektodermalen Zellen auf (Abb. 2.10 d). Im Polypen konnte kein Transkript detektiert werden (Abb. 2.10 a). Dieses Expressionsmuster entspricht der 454-Sequenzierung mit einer vergleichsweise hohen Expression in der Strobila (19 Reads) und einer sehr geringen in der Ephyra (2 Reads). Im Polypen ist wie in der ISH kein Transkript exprimiert (Tab. 2.3). Für die drei weiteren untersuchten Gene, *cniwi*, *sox2* und KLF13,



konnte keine signifikante Expression in der ISH detektiert werden. Es ist möglich, dass sie nur sehr schwach exprimiert werden und sich deswegen nicht von der unspezifischen Färbung unterscheiden. Die mögliche geringe Expression wird durch die Ergebnisse der 454-Sequenzierung bestätigt, in der keines der drei Gene, *cniwi*, *sox2* und *KLF13*, mehr als drei Reads aufweist.



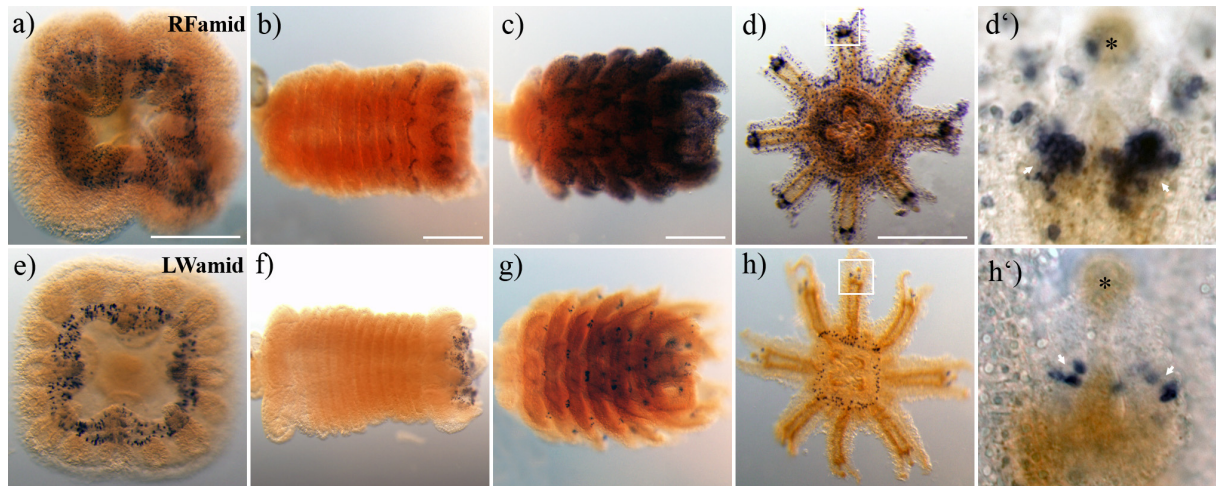
**Abb. 2.10:** whole mount *in situ* Hybridisierung gegen das Transkript des Gens *nanos*, (3\_aurelia\_rc\_finalASM\_12850) in *Aurelia aurita*. a-d:, antisense-Sonden-Hybridisierung; e-h: sense-Sonden-Hybridisierung. a, e: Polypen, apikal; b, f: junge Strobilae, lateral; c, g: späte Strobilae, lateral; d, h: Ephyrae, oral. c': Gruppen *nanos*-positiver Zellen in der späten Ephyra, lateral, Ausschnitt von c. Größenmaßstab in a, b, c und d je 1 mm.

Zusammenfassend konnten zwar *nanos*-exprimierende Zellen detektiert werden, sie weisen aber weder die Form noch die erwartete Lokalisation von Stammzellen auf. Somit konnten keine Beweise für die Existenz von Stammzellen im Polypen oder für die Entwicklung und Anlage der Gonaden der Ephyra bei *Aurelia aurita* erbracht werden.

### 2.2.8 Nervensystemspezifische Gene

Eine weitere spannende Fragestellung umfasst die Veränderungen des diffusen Nervensystems des Polypen während der Metamorphose zum organisierten Nervensystem der Meduse mit Sinnesorganen. Um Neuronen mit der ISH zu detektieren, wurden Transkripte verwendet, die für Präkursor-Neuropeptide, für Arginin-Phenylalanin-Amide (RFamid) und Leucin-Tryptophan-Amide (LWamid) kodieren (K.

2.2.3, Abb. 2.4 b, Tab. 2.3 violett markiert). Die untersuchten Lebensstadien umfassen den Polypen, die frühe und späte Strobilae und die Ephyra.



**Abb. 2.11:** *whole mount in situ* Hybridisierung gegen Präkursor-Neuropeptide, um die Veränderungen des Nervensystems während der Strobilation von *Aurelia aurita* darzustellen. a-d: Präkursor-Neuropeptid für RFamid, (celera\_v01\_contig\_11246) antisense-Sonden-Hybridisierung; e-h: Präkursor-Neuropeptid für LWamid, (celera\_v01\_contig\_19898) antisense-Sonden-Hybridisierung. a, e: Polypen, apikal; b, f: frühe Strobilae, lateral; c, g: späte Strobilae, lateral; d, h: Ephyrae, oral. d': Querschnitt durch die halbkreisförmig angeordneten Präkursor-Neuropeptide der RFamid-positiven Zellen, apikal, Ausschnitt von d in 40 x Vergrößerung; h': Präkursor-Neuropeptid für LWamid-positiv Zellen, apikal, Ausschnitt von h in 40 x Vergrößerung; \*: Statocyste. Größenmaßstab in a, b, c und d je 1 mm.

Das Transkript des Gens RFamid (celera\_v01\_contig\_11246) konnte im Polypen, in ektodermalen Zellen des Hypostoms und in den Tentakeln detektiert werden (Abb. 2.11 a). Während des Verlaufs der Strobilation nimmt die Expression des Transkripts in den Zellen des Ektoderms der späteren Ephyrae deutlich zu (Abb. 2.11 b, c). Die Ephyra weist in der Exumbrella und der Subumbrella über das komplette Ektoderm verteilt, markierte Neuronen auf (Abb. 2.11 d). Zudem war um die Rhopalien der Ephyra eine halbkreisförmige Ansammlung von markierten Neuronen nachzuweisen (Abb. 2.11 d, d', Pfeile). Die markante Zunahme von Neuronen, die einhergeht mit der erhöhten Expression, spiegelt sich auch in den Ergebnissen der 454-Sequenzierung wieder. Das RFamid-codierende Gen wird schwach im Polypen (6 Reads) und der Strobilae (6 Reads) und merklich gesteigert in der Ephyra (112 Reads) exprimiert (Tab. 2.3). Das zweite untersuchte Präkursor-Neuropeptid LWamid (celera\_v01\_contig\_19898) wird im Vergleich zu RFamid wesentlich geringer exprimiert. Das Transkript von LWamid konnte ebenfalls in Ektoderm-Zellen des Hypostoms des Polypen, aber nicht in den Tentakeln nachgewiesen werden (Abb. 2.11 e). Während der Strobilation entwickeln

sich um die Rhopalien weitere markierte ektodermale Zellen (Abb. 2.11 f, g). Die Ephyra verfügt ausschließlich über markierte Zellen um das Hypostom und um die Rhopalien, aber es waren keine Zellen im Ektoderm der Exumbrella und der Subumbrella markiert, wie bei der Hybridisierung von RFamid (Abb. 2.11 h, h', Pfeile). Die Ergebnisse werden durch die 454-Sequenzierung mit vier Reads des Polpyen, zwei Reads der Strobila und acht Reads der Ephyra bestätigt (Tab. 2.3).

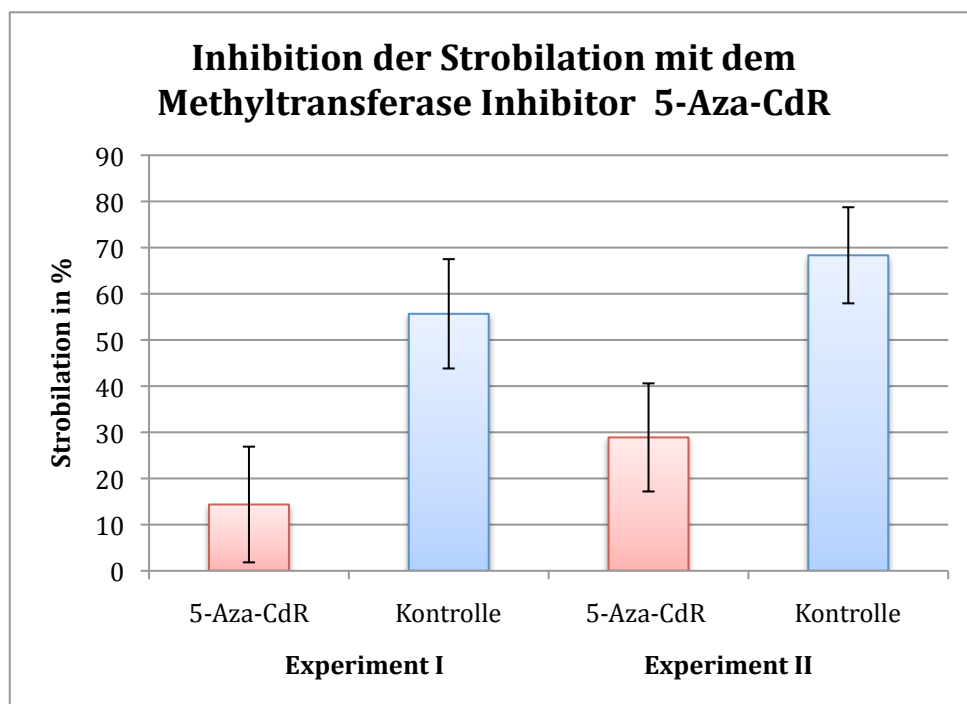
Die Ergebnisse der ISH weisen, wie zu erwarten, eine starke Zunahme der Expression an Präkursor-Neuropeptiden, einhergehend mit einer steigenden Anzahl von Neuronen, im Verlauf der Metamorphose des Polpyen zur Ephyra, auf.

### 2.3 Epigenetische Inhibition der Metamorphose

Wie bereits durch die 454-Sequenzierung belegt und durch die ISH bestätigt wurde, gibt es stadienspezifisch exprimierte Gene. Einige Beispiele dafür sind Cl5 und Cl2 im Polypen, Cl390 und *patched* in der Strobila und *mesoglein* und *myosin tail* in der Ephyra (K. 2.2.5 & 2.2.6). Aber wie ist es möglich, dass Gene nur in einem Lebensstadium exprimiert werden? Ein möglicher Mechanismus ist die epigenetische Regulation von Genen. Sie beschreibt die Modulierung der Genexpression durch DNA-Methylierung und Histonmodifizierung ohne eine Veränderung der Gensequenz (Strachan & Read, 2005). Um den Einfluss der DNA-Methylierung während der Strobilation von *Aurelia aurita* zu ergründen, wurde ein Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-2-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) verwendet. 5-Aza-CdR wurde bereits bei verschiedenen humanen Tumorzelllinien verwendet, um abgeschaltete Gene wieder zu exprimieren (Bender *et al.*, 1998). Mit der Inkubation von Polypen in der Methyltransferase-inhibierenden Chemikalie sollte die Strobilation durch die Aktivierung strobilationsspezifischer Gene induziert werden. Doch die Behandlung von Polypen mit 5-Aza-CdR konnte keine Strobilation auslösen. Wurden aber Polypen zur Strobilation durch eine Temperaturreduzierung induziert und während dieses Zeitraums mit 5-Aza-CdR behandelt, trat ein signifikanter Effekt auf. Die Anzahl an strobilierenden Polypen wurde im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert (Abb. 2.12).

Um diesen Versuch zu belegen, wurden in zwei unabhängigen Experimenten 3 x 20 (Experiment I) und 3 x 30 Polypen (Experiment II) zur Strobilation induziert und über

den kompletten Zeitraum in 100  $\mu$ M 5-Aza-CdR inkubiert, die Kontrolle hingegen wurde lediglich mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Durch die Behandlung mit 5-Aza-CdR (Abb. 2.12, rote Balken) konnte die Anzahl an strobilierenden Polypen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2.12, blaue Balken) signifikant reduziert werden (Anhang 9.4). Die wenigen Strobilae, die aus den 5-Aza-CdR inkubierten Polypen entstanden, metamorphosierten im Vergleich zur Kontrolle zudem erst 48-72 Stunden später (Anhang 9.4 Tab. 9.1). Eine vollständige Inhibition der Strobilation mit 5-Aza-CdR konnte aber nicht erreicht werden.



**Abb. 2.12:** Diagramm zur Inhibition der Strobilation von Polypen mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-CdR. Die prozentuale Anzahl der strobilierenden Tiere aus einem Ansatz, die mit 5-Aza-CdR behandelt wurden (rot), sind im Vergleich zu den Kontrolltieren (blau) angegeben. Die Anzahl der Individuen in Experiment I lag zu Beginn des Versuchs bei 3 x 20 Polypen, die höchste Anzahl an Strobilae in allen Ansätzen war an Tag 36. Im Experiment II wurden 3 x 30 Polypen zu Beginn des Versuchs verwendet, die höchste Anzahl an Strobilae in allen Ansätzen war an Tag 21. Die Konzentration von 5-Aza-CdR lag bei 100 $\mu$ M. Als Kontrolle wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) (das Lösungsmittel für 5-Aza-CdR) in der gleichen Verdünnung 1:1000 in ASW verwendet. Eine vollständige Tabelle mit Angaben zur Anzahl der Strobilae ist im Anhang 9.4 Tab. 9.1 zu finden, die Daten zur Erstellung des Diagramms sind im Anhang 9.4 Tab. 9.2. Standardabweichung: STABW.

Aus der Behandlung mit 5-Aza-CdR ging eindeutig hervor, dass durch die Inhibierung der Methyltransferasen die Strobilation verhindert oder zumindest verlangsamt wurde.

Das beweist, dass die DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle beim Übergang von einem Lebensstadium zum nächsten spielt.

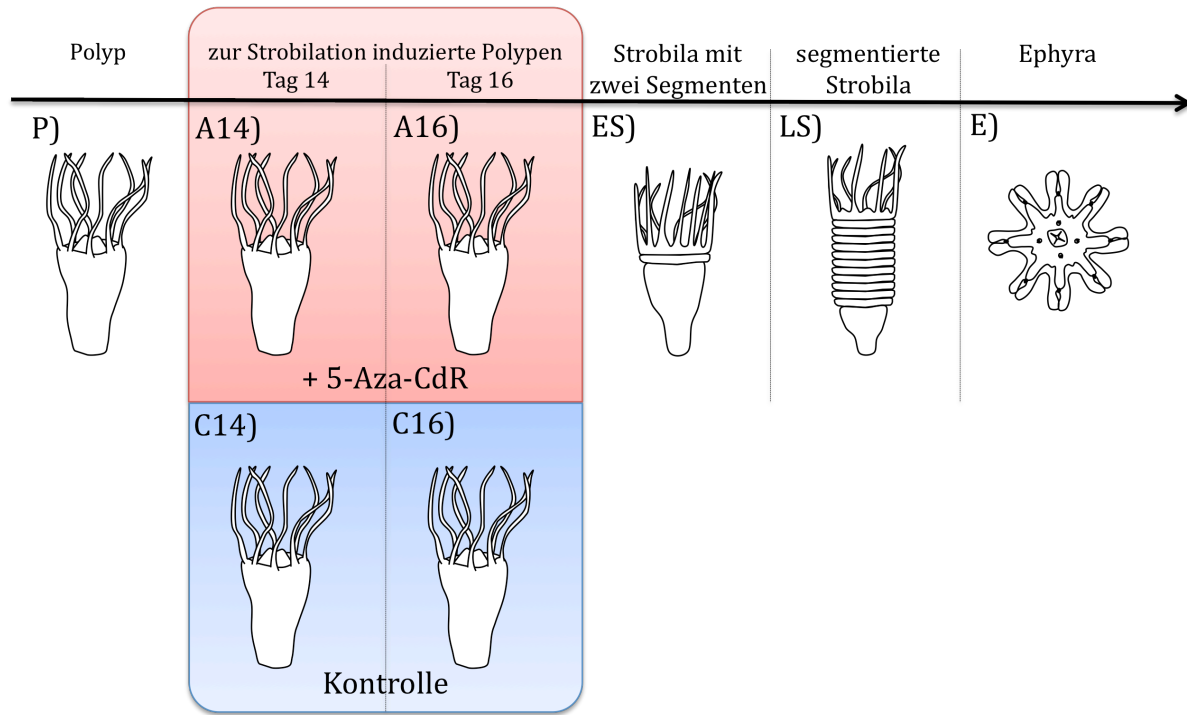
### **2.4 Mikroarray-Hybridisierung zur weiteren Analyse der Strobilation**

Die Sequenzierung des Transkriptoms hatte einen ersten Einblick in die Prozesse der Strobilation ermöglicht. Schwach exprimierte Gene waren aber aufgrund der nicht sättigenden Sequenzierung im Transkriptom von *Aurelia aurita* unterrepräsentiert. Um ein umfassendes Expressionsprofil der Gene in den einzelnen Lebensstadien zu erzeugen wurde eine Mikroarray-Hybridisierung durchgeführt. Sie sollte weitere Einblicke in die Regulation der Metamorphose des Polypen zur Ephyra erbringen. Zudem sollten weitere Kandidatengene zur Induktion und Steuerung der Strobilation aufgedeckt werden. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse und die Sensitivität der *whole mount in situ* Hybridisierung mit der Mikroarray-Hybridisierung überprüft und bestätigt werden.

#### **2.4.1 Mikroarray-Erstellung, Hybridisierung und mRNA-Präparation**

Für die Erstellung der spezifischen Sonden des Mikroarray-Chips wurde die aurelia\_celera\_v02 Transkriptom Datenbank verwendet. Mit Hilfe der eArray Software, wurde für jedes Contig aus der Assembly ein spezifisches 60 bp Oligonukleotid ausgewählt, welches dann für den 44K Oligonukleotid Array verwendet wurde. Für die Hybridisierung wurde mRNA aus Polypen (Abb. 2.13 P), Strobilae mit einem Segment (Abb. 2.13 ES), vollständig segmentierten Strobilae (Abb. 2.13 LS) und Ephyrae (Abb. 2.13 E) verwendet. Zusätzlich wurde mRNA aus Polypen eingesetzt, die zur Strobilation induziert, unterdessen aber mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-CdR behandelt wurden. Im Vergleich zu den ebenfalls induzierten Kontrollpolypen sollten sie eine wesentlich geringere Veränderung in der Expression strobilations-induzierender Gene aufweisen (K. 2.3). Kurz vor Beginn der Strobilation an Tag 14 wurde aus den mit 5-Aza-CdR behandelten Polypen (Abb. 2.13 A14) und den unbehandelten Polypen (Abb. 2.13 C14) mRNA extrahiert. An Tag 16, an dem ein Zehntel der Kontrolltiere zu strobilieren begann, wurde wieder mRNA aus den mit 5-Aza-CdR behandelten (Abb. 2.13 A16) und den unbehandelten Polypen (Abb. 2.13 C16) extrahiert und für die Hybridisierung

verwendet. Für jeden untersuchten Zeitpunkt wurden drei biologische Replikate für je eine Hybridisierung angefertigt.



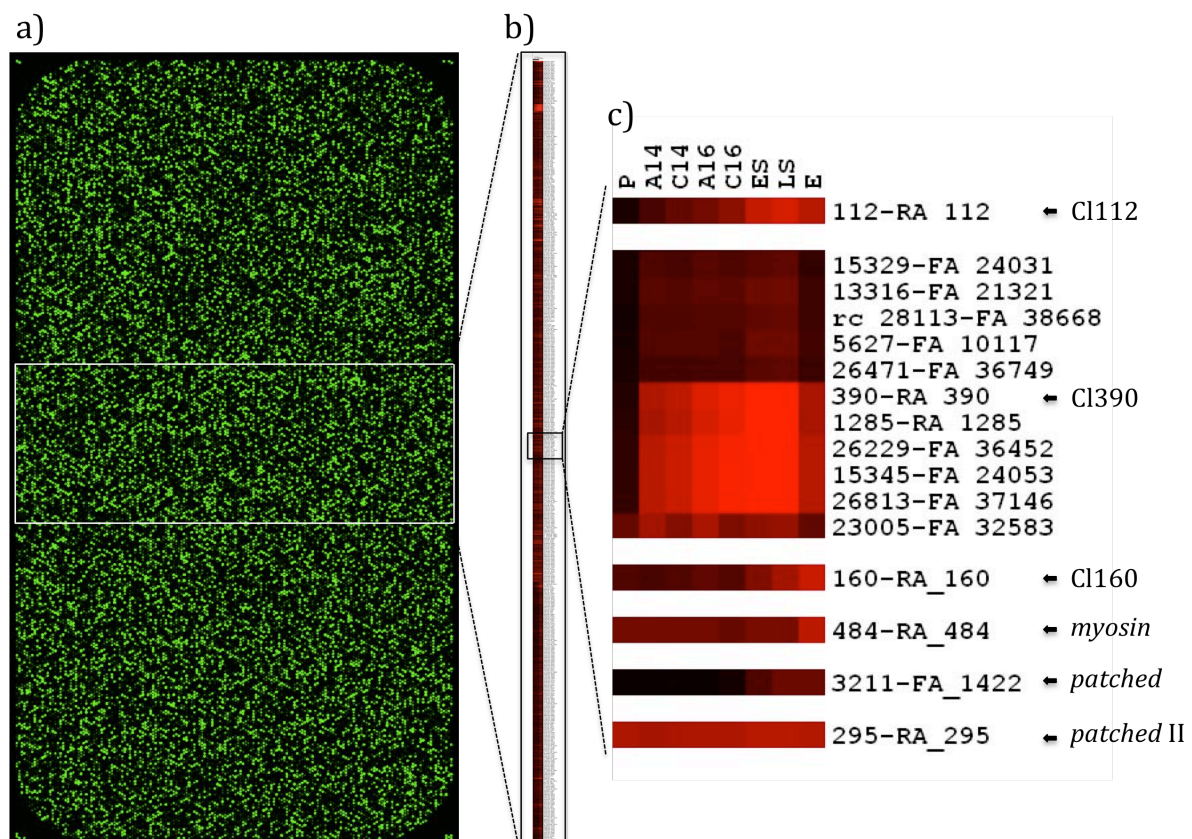
**Abb. 2.13:** Verwendete Lebensstadien für die mRNA-Präparation zur Hybridisierung mit dem Mikroarray-Chip. P: Polyp; A14: Polyp induziert zur Strobilation, behandelt mit 5-Aza-CdR zwei Tage vor dem Zeitpunkt der Strobilation von 10 % der angesetzten Polypen; C14: Kontrolle zu A14, behandelt mit DMSO; A16: Polyp induziert zur Strobilation, behandelt mit 5-Aza-CdR, zum Zeitpunkt der Strobilation von 10 % der angesetzten Polypen; C16: Kontrolle zu A16, behandelt mit DMSO; ES: Strobilae mit zwei Segmenten; LS: vollständig segmentierte Strobilae; E: Ephyrae 24 Stunden nach der Abschnürung.

#### 2.4.2 Auswertung der Mikroarray-Hybridisierung

Die Auswertung der Mikroarray-Hybridisierung (MH) wurde mit der Genespring Software (Agilent) ausgeführt und die Mittelwerte der Expressionsstärke (Fluoreszenzintensitäten, Abb. 2.14 a) in *relative light units* (eng. RLU) für alle 33.272 Sonden aus den drei Replikaten in eine *structured query language* (SQL)-Datenbank übertragen (siehe Anhang 9.8: 01 - Final\_Table\_with\_clusters\_280610.xls). Die Normalisierung der Genexpression aller Sonden erfolgte anhand der Expression von *elongation factor 1 alpha* (EF1) des Polypenstadiums. Dafür wurde die Expression von fünf der acht EF1 Sonden in den anderen untersuchten Lebensstadien, an die des Polypen adaptiert (siehe Anhang 9.8: 02 - EF1a Normalisierung.xls). Der dafür



berechnete Normalisierungsfaktor wurde dann für alle anderen Expressionswerte des jeweiligen Lebensstadium verwendet (siehe Anhang 9.8: 03 - EF1a Median normalisierte Tabelle). Um Sonden auszuschließen, die keine Hybridisierung aufwiesen, wurde ein Grenzwert der Fluoreszenzintensitäten von 50 RLU gesetzt, der in mindestens einem der Lebensstadien gegeben sein musste. Der daraus resultierende, reduzierte Datensatz mit 19.432 Sonden konnte dann exemplarisch mit den Ergebnissen der ISH und der Anzahl der Reads einzelner Contigs der 454-Sequenzierung verglichen werden (Tab. 2.4). Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die Strobila- und Ephyrastadien in der Mikroarray-Hybridisierung einen bestimmten Zeitpunkt charakterisieren, entgegen der 454-Sequenzierung, bei der ein Gemisch verschiedener Strobilastadien und verschieden alte Ephyrae verwendet wurden. Ein direkter Vergleich zweier Lebensstadien ist nur bei den Polypenstadien möglich.



**Abb. 2.14:** Mikroarray-Hybridisierung unterschiedlicher Lebensstadien von *Aurelia aurita* mit dem Fokus auf die Strobilation. a: Grafik des Fluoreszenzsignals eines Mikroarray-Chips nach der Hybridisierung; b: *heatmap* erstellt aus den Daten der Hybridisierungen 04 - cutoff\_50\_log10\_19432; c: Ausschnitt der *heatmap* mit ausgewählten Genen: Cl112, Cl390, Cl160, *myosin*, *patched*, *patched II*, sowie weiteren Kandidatengenen; P: Polyp, A14: Polyp induziert zur Strobilation, behandelt mit 5-Aza-CdR zwei Tage vor dem Zeitpunkt der Strobilation von 10 % der angesetzten Polypen; C14: Kontrolle zu A14, behandelt mit DMSO; A16: Polyp induziert zur Strobilation, behandelt mit 5-Aza-CdR, zum Zeitpunkt der Strobilation von 10 % der angesetzten Polypen; C16: Kontrolle zu A16, behandelt mit DMSO; ES: Strobilae mit nur

einem Segment; LS: vollständig segmentierte Strobilae; E: Ephyrae 24 Stunden nach der Abschnürung. c: *heatmap* mit folgenden Abstufungen von rot: starkes Signal, schwarz: kein Signal.

Die normalisierten Ergebnisse wurden zusätzlich, um sie übersichtlich zu illustrieren, einer logarithmischen Transformation ( $\log_{10}$ ) unterzogen (siehe Anhang 9.8: 04 - cutoff\_50\_log10\_19432.xls). Der resultierende Datensatz konnte dann mit Hilfe der Mayday Software nach den Fluoreszenzintensitäten innerhalb der untersuchten Lebensstadien geclustert und eine *heatmap* (Abb. 2.14 b) erstellt werden. Aus der *heatmap* wurden die bereits in Tabelle 2.4 selektierten Gene ebenfalls exemplarisch zusammengefasst (Abb. 2.14 c) und konnten damit verglichen werden.

Das Expressionsmuster der TRGs Cl112 und Cl390 der MH entsprach exakt der in der ISH belegten Expression in den verschiedenen Lebensstadien, sowie der 454-Sequenzierung (Tab. 2.4, K. 2.2.5). Die Transkription von Cl112 wird unmittelbar vor der Metamorphose initiiert (Tab. 2.4 C14), ist am stärksten in der vollständig segmentierten Strobila (Tab. 2.4 LS) und wird fortgeführt in der Ephyra (Tab. 2.4 E). Die Expression von Cl390 beginnt bereits mehrere Tage vor der Strobilation (Tab. 2.4 C14). Sie ist sehr stark während der Metamorphose (Tab. 2.4 ES & LS) und damit verglichen, nur noch gering in der Ephyra (Tab. 2.4 E) exprimiert. Besonders zu beachten ist, dass die mit 5-Aza-CdR behandelten Polypen ebenfalls eine Expression aufweisen, wenn auch nur ungefähr halb so stark wie die Kontrollpolypen (Tab. 2.4 A14 & C14 sowie A16 & C16). Die *heatmap* (Abb. 2.14 c) veranschaulicht die Expression von Cl112 und Cl390, beide Gene sind nicht im Polypen (Abb. 2.14 c P) vorhanden und haben die höchste Expression während der Metamorphose (Abb. 2.14 c ES & LS). Im Ephyrastadium werden sie hingegen nur noch gering exprimiert.

Die in der 454-Sequenzierung und der ISH belegte starke Expression des TRG Cl160 konnte ebenfalls verifiziert werden (Tab. 2.4, K. 2.2.5). Die Expression des Transkripts von Cl160 beginnt bereits in der Strobila mit zwei Segmenten (Tab. 2.4 ES) und steigert sich weiter über das vollständig segmentierte Strobilastadium (Tab. 2.4 LS) bis in die Ephyra (Tab. 2.4 E). Die *heatmap* spiegelt diese eindeutige Steigerung der Expression von Cl160 wieder (Abb. 2.14 c)

**Tab. 2.4:** Exemplarischer Auszug aus den normalisierten Daten in RLU (03 - EF1a Median normalisierte Tabelle) der Mikroarray-Hybridisierung, beginnend mit dem Probenamen auf dem Mikroarray-Chip,



## Kapitel 2: Ergebnisse

gefolgt von den untersuchten Lebensstadien: P, A14 (rot), C14 (blau), A16 (rot), C16 (blau), ES, LS, E und der dazugehörigen Fluoreszenzintensität aus der Mikroarray Hybridisierung. Daneben sind die Namen der verwendeten Transkripte für die Sonden des Mikroarray-Chips aus der Celera\_02 Assembly, sowie der Gencode und die Anzahl an Reads, aus dem der Contig zusammengesetzt wurde, aufgeführt.

Probename Mikroarray	P	A14	C14	A16	C16	ES	LS	E	Celera 02 Assembly	Gen- name	Po Reads	St Reads	Ep Reads
CUST_52_PI 424983781	3,9	33,6	<b>111,9</b>	<b>244,3</b>	<b>798,1</b>	<b>10850,0</b>	<b>23887,1</b>	<b>6096,6</b>	112-RA _112	<b>Cl112</b>	2	<b>995</b>	<b>257</b>
CUST_20065 PI424983781	3,8	43,6	32,8	66,7	44,6	71,3	92,0	12,8	15329-F A_24031		0	3	1
CUST_26588 PI424983781	3,5	72,4	60,3	98,4	83,4	185,7	201,5	21,1	13316-F A_21321		1	3	1
CUST_32839_ PI424983781	3,2	44,1	46,7	54,6	55,1	94,4	129,1	18,4	rc_28113- FA_38668		0	2	2
CUST_15619_ PI424983781	3,5	55,5	57,8	56,9	42,0	187,3	188,3	26,7	5627-F A_10117		2	74	8
CUST_24695_ PI424983781	4,1	25,8	28,4	29,6	30,4	70,9	97,5	17,4	26471-F A_36749		0	4	0
CUST_204_ PI424983781	6,5	<b>3883,8</b>	<b>7965,3</b>	<b>35973,0</b>	<b>76597,6</b>	<b>231322,6</b>	<b>238804,2</b>	3098,3	390- RA_390	<b>Cl390</b>	0	<b>2002</b>	9
CUST_13568_ PI424983781	9,1	2706,2	6173,1	27249,5	63902,4	267544,7	294650,0	2853,5	1285- RA_1285		1	1416	5
CUST_24605_ PI424983781	11,1	6751,1	14089,3	58169,0	120123,3	261533,9	271524,5	5825,1	26229-F A_36452		0	2	0
CUST_7377_ PI424983781	12,6	6595,2	14455,9	62939,6	134798,3	319411,3	320616,8	6098,1	15345-F A_24053		0	2	0
CUST_24826_ PI424983781	13,1	6303,2	14197,3	61825,5	132233,0	294859,1	303980,1	6015,2	26813-F A_37146		0	2	0
CUST_23267_ PI424983781	136,6	2219,3	528,4	2954,5	399,0	940,6	1334,9	119,7	23005-F A_32583		1	6	1
CUST_80_ PI424983781	51,2	35,4	55,7	97,6	57,8	<b>445,9</b>	<b>2315,0</b>	<b>12454,1</b>	160- RA_160	<b>Cl160</b>	0	<b>283</b>	<b>1227</b>
CUST_13152_ PI424983781	250,8	263,3	236,7	235,2	141,8	328,5	310,0	<b>7941,5</b>	484- RA_484	<b>myosin tail</b>	2	0	<b>291</b>
CUST_1547_ PI424983781	2,2	1,9	2,2	1,9	3,2	<b>45,2</b>	<b>159,2</b>	<b>164,0</b>	3211- FA_1422	<b>patched</b>	0	<b>151</b>	<b>207</b>
CUST_154_ PI424983781	<b>4088,4</b>	<b>2588,8</b>	<b>3510,7</b>	<b>3988,7</b>	<b>3548,9</b>	<b>6232,2</b>	<b>6683,3</b>	<b>4988,8</b>	295- RA_295	<b>patched II</b>	<b>24</b>	5	<b>46</b>

Die Expression von *myosin tail* konnte in der MH ausschließlich in der Ephyra nachgewiesen werden (Tab. 2.4). Die für die MH verwendeten Strobilationsstadien ES und LS befanden sich noch am Beginn der Metamorphose, *myosin tail* wurde aber erst in der späten Strobila exprimiert (Abb. 2.7 s). In der *heatmap* wurde *myosin tail* aufgrund der logarithmischen Transformation nicht richtig präsentiert. Entgegen der 454-Sequenzierung und der ISH wurde es in der *heatmap* in allen untersuchten Lebensstadien schwach exprimiert und verstärkt in der Ephyra dargestellt (Abb. 2.14 c E).

Die Fluoreszenzintensitäten der Rezeptoren des SHH-Signalwegs *patched* wiesen zwar das erwarteten Expressionsprofil auf aber im Vergleich mit den Ergebnisse der 454-Sequenzierung und der ISH waren sie wesentlich geringer exprimiert (Tab. 2.4, Abb. 2.4). *Patched* wird mit dem Beginn der Segmentierung (Tab. 2.4 ES) exprimiert, die

Expression steigt während des Prozesses der Segmentierung (Tab. 2.4 LS) gering an und auch in der 24 Stunden alten Ephyra ist noch eine Expression vorhanden (Tab. 2.4 E). *Patched II* wird hingegen, wie auch in der ISH belegt, konstitutiv in jedem untersuchten Lebensstadium exprimiert. Die Darstellung der beiden *patched* Rezeptoren in der *heatmap* stimmte mit den Ergebnissen der 454-Sequenzierung und der ISH überein (Abb. 2.14 c).

Interessanterweise konnten weitere während der Strobilation hochexprimierte Gene, die Splice-Varianten des TRG Cl390 darstellen, durch die Mikroarray-Hybridisierung ermittelt werden. Dazu gehören die Gene 1285-RA\_1285, 26229-FA\_36452, 15345-FA\_24053 und 26813-FA\_37146 (Tab. 2.4). Zudem konnten weitere TRGs: 23005-FA\_32583, 15329-FA\_24031, 13316-FA\_21321, rc\_28113-FA\_38668, und 26471-FA\_36749, die z. B. einen Einfluss auf die Musterbildung während der Strobilation haben, entdeckt werden. Ebenfalls in diese Gruppe gehört das Gen 5627-FA\_10117 (Tab. 2.4), das in der blastx Analyse eine hohe Homologie von  $9e^{-28}$  zu dem *small nuclear ribonucleoprotein G* [NP\_003087.1] von *Homo sapiens* aufwies und wahrscheinlich auf Grund der erhöhten Zellproliferation hoch reguliert ist.

Zusammenfassend wurde durch die Mikroarray-Hybridisierung die Expression der TRGs Cl390 und Cl160 noch vor den ersten morphologischen Anzeichen der Strobilation bestätigt und ihre mögliche Funktion als Induktoren für die Strobilation damit bekräftigt. Die verwendeten Datensätze aus der 454-Sequenzierung und der Mikroarray-Hybridisierung ergänzen sich perfekt und konnten bereits durch die *in situ* Hybridisierungen validiert werden. Ein Beispiel dafür sind die TRGs Cl390 und Cl631, die sowohl in der 454-Sequenzierung, als auch in der Mikroarray-Hybridisierung die am höchsten exprimierten Gene während der Strobilation darstellen. Zusammen verfügen die Datensätze der 454-Sequenzierung und der Mikroarray-Hybridisierung über ein enormes Potential, den Prozess der Strobilation aufzudecken. Es konnten bereits weitere Kandidatengene für die Induktion und Steuerung der Metamorphose aufgedeckt werden, welche noch nicht im Detail analysiert wurden.

## 2.5 Generierung transgener *Aurelia aurita*

Der zweite Teil meiner Arbeit umfasste die Etablierung transgener *Aurelia aurita*, um die zellulären Veränderungen und Differenzierungsprozesse während des gesamten Entwicklungszyklus und im Besonderen während der Metamorphose des Polypen zur Meduse zu analysieren. Die Zellen des Polypen werden während der Metamorphose grundlegend reorganisiert. Die Markierung lebender Zellen durch die Expression von GFP könnte die Entwicklung und Abstammung medusenspezifischer Organe wie der Gonaden, der Rhopalien, der quergestreiften Muskulatur und des strukturierten Nervensystems erklären. Zudem könnte die Differenzierung und Entwicklung von Stammzellen während der Strobilation verfolgt werden, denn im Gegensatz zu dem potentiell unsterblichen Polypen besitzt die Meduse keine regenerativen Eigenschaften und ist sterblich.

Zur Generierung transgener *Aurelia aurita* sollten Embryonen durch die Mikroinjektion plasmidbasierter DNA-Vektor-Systeme genetisch manipuliert werden. Dazu wurden Reporter-Konstrukte aus pGEM-T und pMiLRneo Backbone Plasmiden mit verschiedenen Reporter-Genen unter der Kontrolle von konstitutiv stark exprimierten Promotoren erstellt. Die Identifizierung und Auswahl der hoch exprimierten Gene erfolgte aus zwei *complementary DNA* (cDNA) basierten Transkriptom-Datenbanken von *Aurelia aurita*. Im Anschluss daran wurden potentielle Promotorbereiche und Terminatorsequenzen aus genomischer DNA (gDNA) von *Aurelia aurita* amplifiziert und in die Reporter-Konstrukte kloniert.

### 2.5.1 454-Sequenzierung und *de novo* Assemblierung des Transkriptoms von *Aurelia aurita* aus der Ostsee

Für die Mikroinjektion von Reporter-Konstrukten standen ausschließlich Embryonen, präpariert aus Medusen von *Aurelia aurita* der Ostsee (engl. *baltic sea*: bs), zur Verfügung (siehe K. 2.1). Für die Selektion konstitutiv stark exprimierter Gene, deren Promotoren in Reporter-Konstrukten verwendet werden sollten, wurde aus diesem Grund das Transkriptom aus Polypen der Ostsee mit dem *Roche Genome Sequencer FLX* System sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung mit 0,5 FLX-Chips betrug 34,7 Mb, bestehend aus 157.412 Reads (Tab. 2.5). Für die Analyse der Expression der Transkripte

wurde der TGICL Assembler verwendet, der die fragmentierten Daten zu einem Transkriptom rekonstruierte. Die erstellte TGICL Assembly aurelia\_bs\_polyp\_run090409 umfasste 9.567 Contigs und 1.974 Singletons (Tab. 2.6, Anhang 9.8).

**Tab. 2.5:** Übersicht der Sequenzen aus den 454-Sequenzierungen der Polypen von *Aurelia aurita*. Es wurden je Lebensstadium 0,5 GS FLX-Chips sequenziert. Die Ausbeute der Sequenzierung kann aus der Anzahl der Reads und der sequenzierten Basen abgelesen werden.

Lebensstadium	Anzahl der verwendeten GS FLX-Chips	Reads	Sequenzierte Basen
Polyp	0,5	157.412	34,7 Mb
Total	0,5	157.412	34,7 Mb

**Tab. 2.6:** Übersicht über das Transkriptom des Polypen. Neben dem Lebensstadium ist der Name der Assembly mit der Angabe zur Anzahl der darin enthaltenen Contigs und Singletons angegeben.

Lebensstadium	Name des Transkriptoms	Assembler	Contigs	Singletons
Polyp	aurelia_bs_polyp_run090409	TGICL	9.567	1.974

### 2.5.2 Identifizierung und Auswahl von konstitutiv exprimierten Genen

Für die Selektion von konstitutiven Genen von *Aurelia aurita* standen zwei Datenbanken zur Verfügung. Zuerst stand nur eine EST (*expressed sequence tags*) Bibliothek von Planularlarven zur Verfügung, die von Prof. Kiyokazu Agata, Universität Kyoto, Japan, bereitgestellt worden war (persönliche Kommunikation, siehe Anhang 9.8). Nach der Sequenzierung des Transkriptoms von Ostsee-Polypen - aurelia\_bs\_polyp\_run090409 - stand eine zweite Datenbank, die zudem Aufschluss über die Expression der Gene gab, zur Verfügung.

Da anfänglich nur die EST-Bibliothek von Planularlarven zur Verfügung stand, wurden aus dieser Datenbank Transkripte selektiert, die ein hohes Expressionslevel erwarten ließen. Die Auswahl fiel auf die Transkripte von  $\beta$ -aktin (CL1Contig2), tubulin (CL2Contig1), ubiquitin (CL18contig1) und histon 3 (CL200Contig1) (Tab. 2.7). Anhand der Sequenzierung des Transkriptoms von Ostsee-Polypen konnte die Expression der ausgewählten Transkripte aus der Planula-EST-Bibliothek überprüft werden. Für die Übereinstimmung der Sequenzen wurde der *basic local alignment search tool for nucleotides* (blastn) Algorithmus verwendet, um gleiche Transkripte beider Datenbanken einander zuordnen zu können. Die Anzahl an Reads der vergleichbaren

Contigs von *aktin* (CL1Contig2) mit 427 Reads und *tubulin* (CL2Contig1) mit 289 Reads im *aurelia\_bs\_polyp\_run090409*-Transkriptom war sehr hoch (Tab. 2.7). Die Expressionswerte von *ubiquitin* (CL18contig1) mit 20 Reads und *histon 3* (CL200Contig1) mit 29 Reads waren vergleichsweise gering (Tab. 2.7).

Mit dem Vorhandensein eines Transkriptoms aus Ostsee-Polypen wurden zwei weitere Haushaltsgene selektiert, die über eine sehr hohe Anzahl an Reads verfügten und somit ein hohes Expressionslevel erwarten ließen: *aktin* (*aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21*) mit 726 Reads und EF1 (*elongations faktor 1 alpha*) (*aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_45*) mit 434 Reads (Tab. 2.7).

**Tab. 2.7:** Dargestellt sind ausgewählte, konstitutiv stark exprimierte Gene von *Aurelia aurita* mit der Angabe zum Gen-Namen, dem Sequenz-Namen des vergleichbaren Transkripts in den verschiedenen Datenbanken, der Länge des Transkripts und der Anzahl der Reads, die Auskunft über die Expression der Transkripte gibt.

Gen-Name	Planula EST, Sequenz-Name	Transkript-Länge	bs Polyp Transkriptom Sequenz-Name	Transkript-Länge	Anzahl der Reads
EST aus Planularlarven					
<i>aktin</i>	CL1Contig2	1.564 bp	<i>aurelia_bs_polyp_run090409_49</i>	1.591 bp	427
<i>tubulin</i>	CL2Contig1	1.543 bp	<i>aurelia_bs_polyp_run090409_34</i>	1.584 bp	289
<i>ubiquitin</i>	CL18contig1	2.058 bp	<i>aurelia_bs_polyp_run090409_885</i>	822 bp	20
<i>histon 3</i>	CL200Contig1	800 bp	<i>aurelia_bs_polyp_run090409_635</i>	1.306 bp	29
Transkriptome aus Ostsee-Polypen					
<i>aktin</i>			<i>aurelia_bs_polyp_run090409_21</i>	1.387 bp	726
EF1	CL3Contig4	1.955 bp	<i>aurelia_bs_polyp_run090409_45</i>	1.622 bp	434

### 2.5.3 Amplifikation von Promotoren und Terminatoren von konstitutiv exprimierten Genen

Nach der Selektion der konstitutiven Gene, wurden deren flankierende Bereiche als Promotoren und Terminatoren für die Herstellung der Reporter-Konstrukte kloniert. Für *Aurelia aurita* existiert bisher kein sequenziertes Genom, auch sind bislang keine spezifischen Promotor-Elemente zur Regulierung der Genexpression bekannt. Da nur die Transkripte der selektierten Gene vorhanden waren, wurden diese aus gDNA von Medusen aus der Ostsee amplifiziert und sequenziert. Aus den gewonnenen Sequenz-Informationen wurden Primer erstellt, um mittels der Technik der Splinkeretten-PCR, die flankierenden Bereiche zu klonieren (Thomsen *et al.*, 2004). Die Amplifikate wurden kloniert, sequenziert und der potentielle Promotorbereich oder die Terminatorsequenz

mit dem bekannten genomischen Bereich verglichen. Dieser Prozess wurde für die Gene der Transkripte von *aktin* (CL1Contig2), *tubulin* (CL2Contig1), *ubiquitin* (CL18contig1) *histon 3* (CL200Contig1), *aktin* (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21) und EF1 (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_45) durchgeführt. Die Splinkeretten-PCR wurde so oft wiederholt, bis eine ausreichend große Sequenz der potentiellen Promotor- und Terminations-Bereiche bekannt war (Tab. 2.8, vollständige Sequenzen, siehe Anhang 9.2). Mit spezifischen Primern wurde daraufhin der potentielle Bereich des Promotors oder Terminators amplifiziert und in die Reporter-Konstrukte P1-14 kloniert.

**Tab. 2.8:** Dargestellt sind die Sequenzierungs-Ergebnisse potentieller Promotoren und Terminatoren konstitutiv stark exprimierter Gene von *Aurelia aurita* mit der Angabe des Gen-Namens, des Sequenz-Namens des Transkripts in den verschiedenen Datenbanken, der Anzahl der Reads, die Auskunft über die Expression der Transkripte gibt und dem sequenzierten potentiellen Promotor- und Terminator-Bereich in bp.

Gen-Name	Sequenz-Name	cDNA Sequenz-Länge	Anzahl der Reads	Sequenzierter potentieller Promotor	Sequenzierter potentieller Terminator
<i>aktin</i>	CL1Contig2	1.564 bp	427	-1.647 bp	1.166 bp
<i>tubulin</i>	CL2Contig1	1.543 bp	289	-1.183 bp	596 bp
<i>ubiquitin</i>	CL18contig1	2.058 bp	20	-744 bp	
<i>histon 3</i>	CL200Contig1	800 bp	29	-1.357 bp	
<i>aktin</i>	aurelia_bs_polyp_run090409_21	1.387 bp	726	-1.355 bp	1.445 bp
<i>EF1</i>	aurelia_bs_polyp_run090409_45	1.622 bp	434	-1.573 bp	

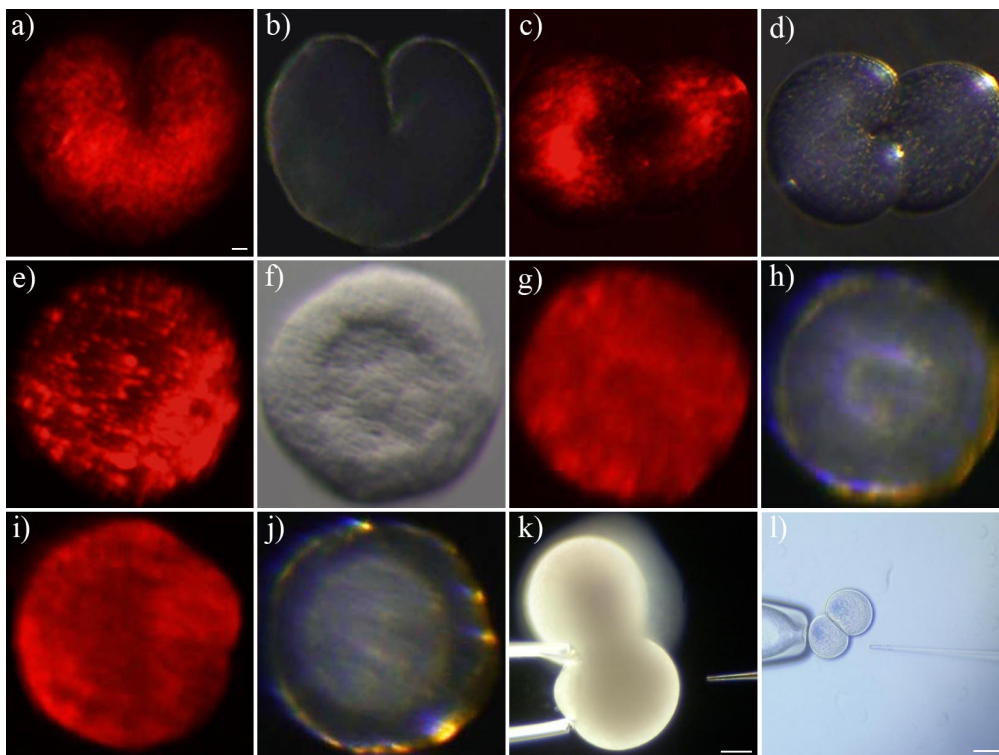
#### 2.5.4 Konstrukte

Die potentiellen Promotoren der Gene *aktin*, EF1, *tubulin* *ubiquitin* und *histon 3* mit einer Länge von 744 bis 1.641 Basenpaaren, sowie die potentiellen Terminatoren der Gene *aktin* und *tubulin*, mit einer Länge von 576 bis 1.439 Basenpaaren, wurden über Restriktionsschnittstellen in pGEM-T Backbone Plasmide (P1-13) (Promega) in Einzel- oder Doppel-Konstrukte ligiert (Abb. 2.15). Zusätzlich diente ein pMiLRneo Backbone Vektor mit flankierenden *inverted terminal repeats* (ITRs) als Grundlage für ein weiteres Konstrukt (P14) (Abb. 2.15). Die Inserts beinhalten den, dem Gen vorgelagerten, potentiellen Promotorbereich und das Startcodon. Darauf folgen ein bis sechs weitere Codons, der genomischen Sequenz des konstitutiven Gens. Die Inserts der potentiellen Terminatoren beginnen mit dem Stopcodon, worauf die dem Gen nachgelagerte Sequenz folgt. Jeder der Vektoren P1-14 verfügt über eine Ampicillin-Resistenz. Der Vektor P4 trägt mCherry, die Vektoren P9, P11, P13 Kaede, als Reportergen. Alle weiteren



### 2.5.5 Injektion von Reporter-Konstrukten in Zygoten und Embryonalstadien von *Aurelia aurita*

Die Injektion der Reporter-Konstrukte erfolgte saisonal, sobald sexuell reife Medusen beider Geschlechter auftraten. Die Verfügbarkeit von Embryonen der Jahre 2008/2009 und die verwendeten Konstrukte können aus den Injektionsdaten der im Anhang 9.5 dargestellten Tabelle 9.3 abgelesen werden. Für die Injektion wurden ausschließlich Zygoten und Blastomere der 2-Zell- oder 4-Zellstadien verwendet. Die Zygoten von *Aurelia aurita* (Abb. 2.16 l) waren mit einem Durchmesser von 120-150  $\mu\text{m}$  im Vergleich mit einem Embryo von *Hydra vulgaris* AEP um den Faktor vier kleiner (Abb. 2.16 k). Für die Mikroinjektion der Reporter-Konstrukte musste dementsprechend eine kleinere Haltekapillare und ein geringerer Injektionsdruck verwendet werden (K 7.9.2).



**Abb. 2.16:** a-j: Unterschiedliche Entwicklungsstadien injizierter RITC-Embryonen, k-l: Embryonen vor der Injektion an der Haltekapillare, a, b: Laterale Ansicht einer Zygote während der ersten äquatorialen Furchung die vom animalen zum vegetalen Pol verläuft; c, d: Laterale Ansicht eines Embryo während der zweiten äquatorialen Furchung; e, f: Apikale Ansicht eines Blastulastadiums 24 Stunden nach der Injektion; g, h: Apikale Ansicht eines Gastrulastadiums 48 Stunden nach der Injektion; i, j: Apikale Ansicht eines Gastrulastadiums 72 Stunden nach der Injektion. k: Laterale Ansicht einer Blastomere im 2-Zellstadium von *Hydra vulgaris* an der Haltekapillare, links im Bild die Injektionsnadel; l: Laterale Ansicht einer Blastomere im 2-Zellstadium von *Aurelia aurita* an der Haltekapillare, links im Bild die Injektionsnadel. Die Bilder k und l wurden bei gleicher Vergrößerung erzeugt; die Bilder a, c, e, g, i: wurden unter Fluoreszenzlicht hergestellt, die Bilder b, d, f, h, j mit Durchlicht. Größenmaßstab in a 10  $\mu\text{m}$ , in k und l je 0,1 mm.



Die Injektionsansätze, ausgenommen Injektion 7 (Anhang 9.5 Tab. 9.3), wurden mit 1-2 % Rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) versetzt, das als Kontrolle für eine gelungene Injektion diente. Da die Embryonen und Planularlarven von *Aurelia aurita* keine Eigenfluoreszenz aufwiesen, konnte im Anschluss an die Injektion die weitere Entwicklung der RITC-positiven Embryonen bis zum Polypen verfolgt werden. In Abbildung 2.14 a-j sind verschiedene RITC-positive Embryonalstadien abgebildet. Die Anzahl der lebensfähigen RITC-positiven Embryonen lag nach der Injektion (sieben Tage) bei den Injektionen 6-20 bei einem Fünftel der injizierten Tiere (Anhang 9.5 Tab. 9.3). Für die folgenden Injektionen 21-52 wurde keine Statistik geführt, da sich deutlich mehr RITC-positive Embryonen zu Polypen entwickelten als zuvor. Nach der Nahrungsaufnahme der Polypen wiesen etwa ein Viertel der Tiere eine starke Autofluoreszenz auf, welche die Lokalisierung von RITC stark erschwerte.

### **2.5.6 Injektion linearisierter Konstrukte und genomischer DNA**

Der Mechanismus der Integration von Reporter-Konstrukten während der Embryogenese ist unbekannt. Daher wurde neben ringförmigen und auch linearisierte Reporter-Konstrukte injiziert, für den Fall, dass linearisierte Konstrukte besser integriert werden können. Zudem wurde zu den linearisierten Konstrukten auch geschnittene genomische DNA von *Aurelia aurita* hinzugefügt. Diese DNA war mit dem gleichen Restriktionsenzym wie die Vektoren geschnitten worden. Die Maskierung der Konstrukte mit eigener DNA sollte die Reporter-Konstrukte vor dem Abbau im Embryo und dem Prozess des Gen-*silencing* während der Entwicklung schützen. RITC-positive Embryonen aus den Injektionen 16, 39 und 42 (Anhang 9.5 Tab. 9.3), bei denen ausschließlich linearisierte Konstrukte verwendet wurden, entwickelten sich zu intakten Polypen. Aus den Injektionen 40, 41, 43, 44, 47 mit linearisierten Konstrukten (Anhang 9.5 Tab. 9.3), die zusätzlich genomische DNA enthielten, entstanden ebenfalls intakte RITC-positive Polypen. Stabile transgene GFP-exprimierende Polypen konnten jedoch nicht generiert werden.

### **2.5.7 Generierung transgener *Aurelia aurita* durch die Verwendung von Minos-Transposase**

Die Minos-DNA-Transposase wurde bereits bei verschiedenen Vertebraten und Invertebraten zur Erstellung von Transgenen eingesetzt (Pavlopoulos *et al.*, 2007). Das Plasmid P14 verfügt über zwei *inverted terminal repeats* (ITRs)-Elemente, die das GFP-Reporterkonstrukt flankieren und es zu einem Transposon zusammensetzen. Bei der Verwendung von P14 (Abb. 2.15) in den Injektionen 49-52 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) wurde 0,1 µg/µl Minos-Transposase-mRNA mitinjiziert. Das Enzym sollte während der Embryogenese translatiert werden, um das Transposon aus P14 in die DNA von *Aurelia aurita* zu integrieren. Die Embryonen aus diesen Injektionen zeigten keinen Unterschied zu den anderen Injektionen. Eine Verbesserung der Integration konnte nicht nachgewiesen werden. Polypen, die stabil GFP exprimierten konnten nicht hergestellt werden.

### **2.5.8 Injektion von GFP-mRNA**

Die Injektionen 49-52 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) enthielten zusätzlich GFP-mRNA im Injektionsansatz. Die Translation der mRNA während der Embryogenese sollte als Kontrolle der Translation der Minos-Transposase-mRNA (K. 2.5.7) dienen. Die injizierten Embryonen wurden über die komplette Embryogenese alle 12 Stunden auf die Expression von GFP hin kontrolliert. Es konnte jedoch keine GFP-Fluoreszenz festgestellt werden.

### **2.5.9 Transgene *Aurelia aurita***

Die RITC-positiven Embryonen aus den Injektionen 1-52 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) wurden alle 24 Stunden auf die Expression von GFP kontrolliert. Als Kontrolle wurden nicht injizierte Embryonen verwendet. Blastula- und frühe Gastrula-Stadien zeigten kein detektierbares Signal im Spektrum von GFP. Eine Woche nach der Injektion war bei 55 Planularlarven ein anteriores endodermales GFP-Signal sichtbar (Abb. 2.17 d) (Anhang 9.5 Tab. 9.3). Wesentlich geringer war die Anzahl (6) der Planulae, die ein ektodermales Signal aufwiesen (Abb. 2.17 a, Tab. 2.9). Zudem war ein Drittel der fluoreszierenden

Planularlarven (Abb. 2.17 f) stark deformiert und die Metamorphose zum Polypen setzte, im Vergleich mit den Kontrolltieren, um 2-3 Wochen verzögert ein.

Die Planularlarven, die ein ektodermales GFP-Signal aufwiesen (Abb. 2.17 a), aus den Injektionen mit den Reporter-Konstrukten P9 und P12 (Abb. 2.15) unter der Steuerung eines EF1 oder eines *aktin*-Promotors, entwickelten sich zu Polypen ohne jegliche GFP-Fluoreszenz (Tab. 2.9).

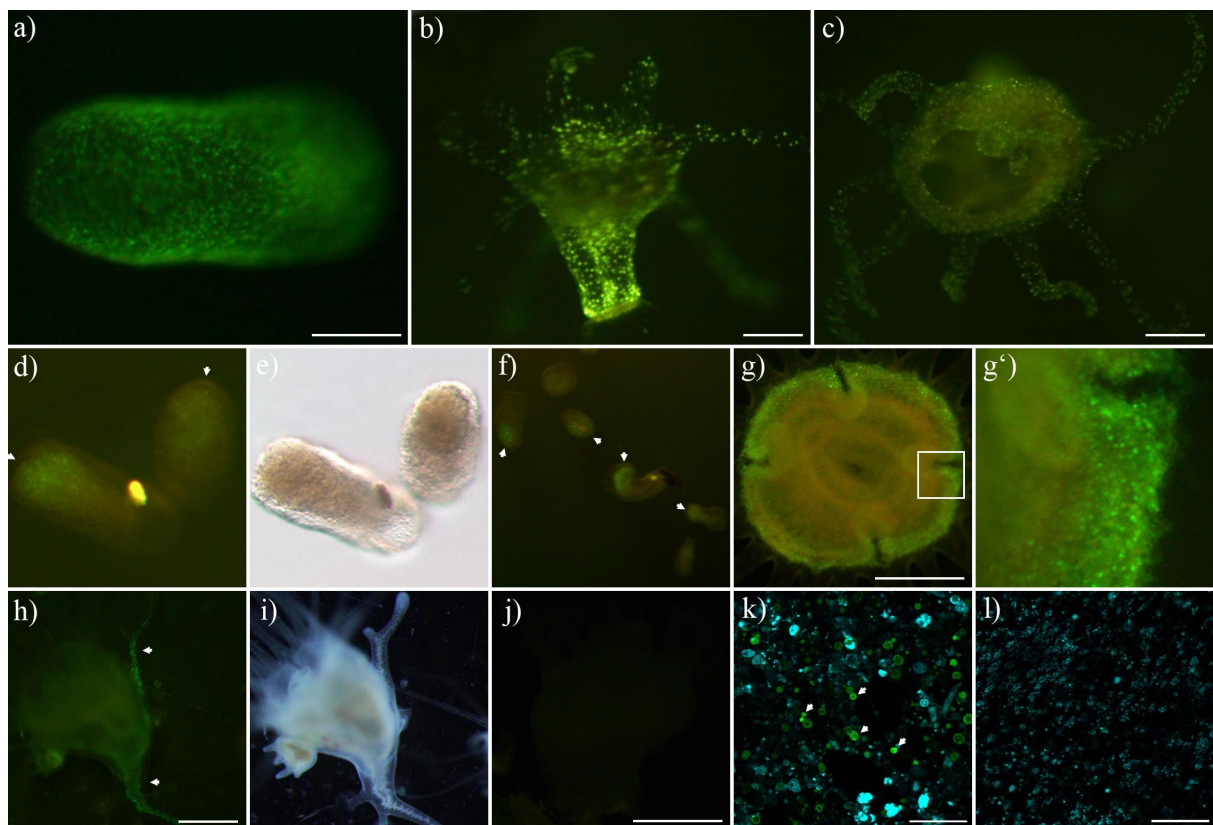
Aus Planularlarven, die eine endodermale GFP-Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 2.17 d, f), aus den Injektionen der Reporter-Konstrukte P2, P6 und P7 (Abb. 2.15) unter der Steuerung eines *aktin*- oder eines *histon*-Promotors, entwickelten sich zehn Polypen, die ein ebenfalls endodermales GFP-Signal aufwiesen (Abb. 2.17 g, h, Tab. 2.9). Als Kontrolle dienten nicht injizierte Polypen (Abb. 2.17 j).

**Tab. 2.9:** Übersicht über die transient transgenen Larven und Polypen von *Aurelia aurita*. Aufgeführt sind die Plasmid-Nummer und der Plasmid-Name des injizierten Konstrukts, sowie die Anzahl der injizierten Embryonen. Anschließend wird die Anzahl der Larven und der Polypen genannt, die über eine endodermale oder eine ektodermale GFP-Fluoreszenz verfügten, sowie die Anzahl der stabilen transgenen Polypen.

Plasmid-Nr.	Plasmid-Name	Injizierte Embryonen gesamt	Planularlarven mit endodermaler GFP Expression	Planularlarven mit ektodermaler GFP Expression	Polypen mit transienter endodermaler GFP Expression	Polypen mit transienter ektodermaler GFP Expression	Stabile transgene GFP Polypen
1	VTP-H12	33	<b>5</b>	0	<b>1</b>	0	0
2	VALP18	594	<b>2</b>	0	<b>1</b>	<b>1</b>	0
3	VTTG3	55	0	0	0	0	0
4	VA16M26	50	0	0	0	0	0
5	VUG11	97	0	0	0	0	0
6	VA16G3	192	<b>4</b>	0	<b>2</b>	0	0
7	VHPII4	599	<b>10</b>	0	<b>6</b>	<b>1</b>	0
8	VEGT3	527	0	0	0	0	0
9	VEKT7	549	<b>16</b>	<b>4</b>	0	0	0
10	VEG4	74	0	0	0	0	0
11	VEK12	174	0	0	0	0	0
12	VAGT2	867	<b>18</b>	<b>2</b>	0	0	0
13	VAKT1	416	0	0	0	0	0
14	LigAN3	527	0	0	0	0	0
Gesamt	14	4754	<b>55</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>0</b>

Die endodermale GFP-Fluoreszenz der Polypen wurde immer mehrere Stunden nach der Nahrungsaufnahme detektiert. Für die darauf folgenden 48 Stunden verfügten die Polypen über eine starke Fluoreszenz. Weitere 24 Stunden später war das GFP-Signal nur noch schwach sichtbar und nach insgesamt 96 Stunden nicht mehr detektierbar.

Durch erneute Nahrungszugabe konnte das Signal repliziert werden. Nicht transfizierte Polypen wiesen keine Fluoreszenz nach der Nahrungsaufnahme auf. Auffällig waren zudem Schwankungen in der endodermalen Lokalisation des GFP-Signals. Die Fluoreszenz im Polypen konnte in wenigen Stunden vom Ring des Hypostoms (Abb. 2.17 g) in die Stolone (Abb. 2.17 h) wechseln. Es wurden sechs Polypen mit auffällig starker, endodermaler Fluoreszenz selektiert und erfolgreich als Massenkultur angelegt. Aus den einzelnen Polypen entstanden durch Fragmentation und durch Knospung an den Spitzen der Stolone weitere Klone. Die anfängliche starke Intensität des GFP-Signals war in allen Polypen aus den drei Injektionen nach wenigen Wochen nicht mehr wahrnehmbar. Auch durch erneute Nahrungszugabe konnte keine Fluoreszenz mehr induziert werden. Stabile endodermal GFP-exprimierende Transgene konnten nicht generiert werden (Tab. 2.9).



**Abb. 2.17:** Verschiedene Stadien transient transgener *Aurelia aurita*, a: Laterale Ansicht einer Planularlarve mit ektodermaler GFP-Fluoreszenz, der aborale Pol befindet sich links; b: Laterale Ansicht eines jungen Polypen mit ektodermaler GFP-Fluoreszenz; c: Apikale Ansicht eines jungen Polypen mit ektodermaler GFP-Fluoreszenz in der Nähe des aboralen Pols; d, e: Laterale Ansicht von Planularlarven mit endodermaler GFP-Fluoreszenz am apikalen Pol; f: Laterale Ansicht von deformierten Planularlarven mit endodermaler GFP-Fluoreszenz; g: Apikale Ansicht eines Polypen mit endodermaler GFP Fluoreszenz; g': Vergrößerung der apikalen Ansicht von g; h, i: Polyp mit endodermaler GFP-Fluoreszenz in den Stolonen; j: nicht injizierter Kontrollpolyp; k: Quetsch-Präparat KLSM-Aufnahme eines Polypen mit endodermaler

GFP-Fluoreszenz; l: Quetsch-Präparat KLSM-Aufnahme eines Kontroll-Polypen. a, b, c, d, f, g, g', h, j: wurden unter Fluoreszenzlicht hergestellt; e, j: wurden mit Durchlicht hergestellt. Größenmaßstab in a, b, c 0,1 mm, in g, h, j 1 mm und in k und l je 31,75 µm.

In zwei Fällen entwickelten sich aus den Planularlarven der Injektion 14 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) mit P2 (Abb. 2.15), einem GFP-DsRed-Doppelkonstrukt unter der Steuerung eines *aktin*-Promotors, nach der Metamorphose Polypen, die eine ektodermale GFP-Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 2.17 b, c, Tab. 2.9). Als Kontrolle wurden nicht injizierte Polypen beobachtet (Abb. 2.17 j). Im kompletten Ektoderm waren stark GFP-fluoreszierende Zellen verteilt. Die Polypen waren morphologisch intakt und verfügten über Cnidocyten. Jedoch verschwand das GFP-Signal nach der ersten Nahrungsaufnahme vollständig. Die Tiere und ihre Klone wurden über sechs Monate gehältert - es konnte aber keine GFP-Fluoreszenz mehr festgestellt werden (Tab. 2.9).

Zusammenfassend konnten durch die Injektionen 1-20 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) der Reporter-Konstrukte P1-8 (Abb. 2.15) in Embryonen von *Aurelia aurita* keine stabilen transgenen Polypen hergestellt werden. Auch die verwendeten Konstrukte P8-14 (Abb. 2.15), die bei den Injektionen 21-52 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) injiziert wurden, erbrachten keine Steigerung der Effizienz. Aus 4754 injizierten Embryonen entwickelten sich 61 Planularlarven mit GFP-Fluoreszenz. Davon verfügten sechs Larven über ein ektodermales und 55 über ein endodermales GFP-Signal. Nach der Metamorphose zum Polypen konnte in zwei Fällen eine transiente ektodermale GFP-Fluoreszenz und in zehn weiteren Polypen eine transiente endodermale GFP-Fluoreszenz beobachtet werden (Tab. 2.9). Transgene Polypen, die stabil GFP-exprimierten, konnten jedoch nicht hergestellt werden.

### **2.5.10 KLSM-Mikroskopie der transient transgenen Polypen von *Aurelia aurita***

Die endodermale Expression von GFP, in transient transgenen Polypen sollte durch einen immunhistochemischen Nachweis von GFP belegt werden. Durch eine Fluoreszenz-Antikörper-Färbung sollte die Expression des GFP-Proteins in Polypen mit endodermalem GFP-Signal aus den Injektionen 3, 10 und 11 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) mit P2, P6 und P7 (Abb. 2.15) belegt werden. Die Auswertung der Immunohistochemie mit

fixierten Polypen erbrachte keinen Nachweis von GFP-Protein in Polypen mit endodermaler Fluoreszenz.

Um den Ursprung der endodermalen Fluoreszenz zu verstehen, wurden nun Quetsch-Präparate von Polypen mit endodermalem GFP-Signal aus den Injektionen 3, 10 und 11 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) mit P2, P6 und P7 (Abb. 2.15) angefertigt. Die Betrachtung erfolgte mit dem KLSM. Es konnten 2-8 µm große Vesikel im Cytosol festgestellt werden, die eine deutliche Fluoreszenz im GFP Spektrum aufwiesen (Abb. 2.17 k). Das Signal war nicht im Zellkern lokalisiert, aber die Verteilung und Intensität der Fluoreszenz entsprach dem Muster, welches bei intakten Polypen beobachtet worden war (Abb. 2.17 g'). Die Kontrolle aus nicht-injizierten Polypen wies bei identischer Anregung keine Fluoreszenz-Emission auf (Abb. 2.17 l). Es konnten keine weiteren Experimente durchgeführt werden, da die Polypen aus den Injektionen 3, 10 und 11 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) mit P2, P6 und P7 (Abb. 2.15) keine GFP-Fluoreszenz mehr zeigten. Der Ursprung der transienten GFP-Fluoreszenz konnte nicht abschließend geklärt werden. Es bleibt unklar, ob es sich bei der Fluoreszenz um die des GFP oder eine Autofluoreszenz gehandelt hat.

### **2.5.11 Extraktion genomischer DNA zur Überprüfung der Integration von Reporter-Konstrukten**

Um die Integration der Reporter-Konstrukte in das Genom der transfizierten Polypen zu überprüfen, sollte gDNA extrahiert werden. Dafür musste zunächst eine Extraktions-Methode für gDNA aus Polypen etabliert werden, da konventionelle Methoden wie die Phenol-Chloroform-Extraktion ergebnislos verliefen. Die Extraktion von gDNA konnte mit einem Protokoll unter Verwendung von Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) (Winnepenninckx *et al.*, 1993) erfolgreich ausgeführt werden (K. 7.2.2). Anschließend wurde aus Polypen, die keine Fluoreszenz mehr aufwiesen, aus den Injektionen 3, 10 und 11 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) mit P2, P6 und P7 (Abb. 2.15), gDNA extrahiert. Mit spezifischen Primern sollte die Integration der Reporter-Konstrukte in das Genom der Tiere verifiziert werden. Die PCR zur Amplifikation des Reporter-Konstrukts ergab in keinem der getesteten Polypen ein positives Ergebnis. Die Integration der Reporter-Konstrukte ins Genom konnten nicht bewiesen werden.

### 2.5.12 Elektroporation

Als Alternative zur Mikroinjektion diente die Elektroporation zur Transfizierung. Sie konnte im Gegensatz zur Injektion mit jedem Entwicklungsstadium von *Aurelia aurita*, ausgenommen der Medusenstadien, vollzogen werden. Die Reporter-Konstrukte wurden vor der ersten Injektion durch Elektroporation an Polypen und Strobilae getestet. Auch Embryonalstadien und Planularlarven wurden mit Reporter-Konstrukten elektroporiert.

Bei der anschließenden Beobachtung konnte RITC in nahezu jeder Zelle der elektroporierten Tiere festgestellt werden, eine Lokalisation im Nukleus war nicht auszuschließen. Eine GFP-Expression und eine damit einhergehende Fluoreszenz konnte nicht beobachtet werden, da ein Großteil der Kontrolltiere nach der Elektroporation eine hohe konstante Autofluoreszenz im Spektrum von GFP aufwies, welche die korrekte Detektion von GFP optisch unmöglich machte.

### 3. Diskussion

Ziel meiner Arbeit war es, einen tiefen Einblick in die molekularen Mechanismen, welche die Strobilation von *Aurelia aurita* (Scyphozoa) kontrollieren, zu ermöglichen. Durch die 454-Sequenzierung des Transkriptoms, die *whole mount in situ* Hybridisierung sowie die Mikroarray-Hybridisierung konnten bedeutende Gene, die wahrscheinlich für die Initiierung sowie die Steuerung der Strobilation zuständig sind, identifiziert werden. Zudem konnte eine epigenetische Regulation der Genexpression während der Metamorphose des Polypen zur Ephyra nachgewiesen werden. Diese Modulation der Expression konnte zum einen durch die Mikroarray-Hybridisierung sowie zum anderen durch das Ausbleiben der Strobilation belegt werden. Damit einhergehend konnten stadienspezifisch exprimierte Gene detektiert und starke Veränderungen des Nervensystems, welche der Polyp während der Metamorphose zur Ephyra erfährt, dokumentiert werden. Für die Existenz von Stammzellen konnten ebenfalls weitere Beweise erbracht werden.

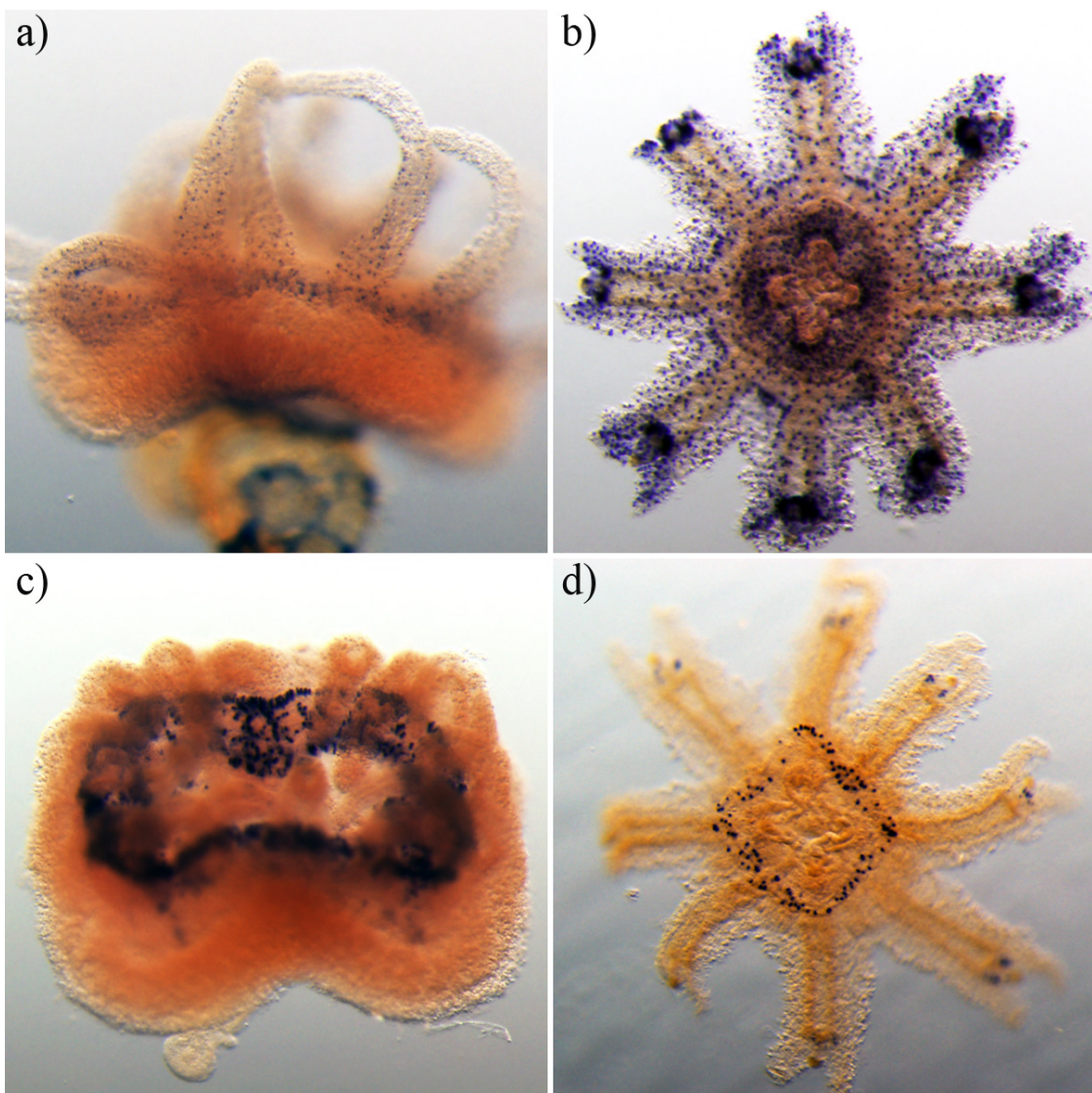
Die Erstellung von Reporter-Konstrukten mit spezifischen Promotoren und Terminatoren sowie die Etablierung der Mikroinjektion und die erfolgreiche Aufzucht von transfizierten Embryonen konnte ebenfalls etabliert werden. Allerdings konnten ausschließlich transient GFP exprimierende Tiere generiert werden.

#### 3.1 Veränderungen des Nervensystems während der Strobilation

Die Modifikationen des Nervensystems in den unterschiedlichen Lebensstadien von *Aurelia aurita* sind erstaunlich (Abb. 3.1). Aus einem diffusen Nervensystem entsteht im Laufe der Entwicklung ein komplexes Nervensystem mit Rhopalien, die optische, chemische und mechanische Reize wahrnehmen können. Die ersten FMRFamid-immunreaktiven Neuronen konnten im Ektoderm der frühen Planula detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Entwicklung der Planula entstehen zusätzliche Neuronen im Apikalorgan (Nagayasu *et al.*, 2008). Nach der Metamorphose zum Polypen konnten FMRFamid-positive Neuronen in den Tentakelanlagen und in der Mundscheibe nachgewiesen werden. Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung gegen das Transkript von RFamid konnte diese Beobachtung im Polypen bestätigt werden. Während des



Prozesses der Metamorphose nimmt die Anzahl RFamid-positive Zellen im Ektoderm der späteren Subumbrella und der Exumbrella stark zu. Diese Zellen stellen das Nervensystem der Ephyra dar. Ein Antikörper gegen FMRFamide diene als Marker gegen das diffuse Nervensystem, das in der gesamten Körperwand der Ephyra verteilt ist und dort Nematocyten konnektiert (Nagayasu *et al.*, 2009). Die aus der Metamorphose hervorgehende Ephyra wies an der Basis der Rhopalien zusätzlich ein Zentrum stark RFamid-positiver Zellen auf. Dieses Zentrum, bestehend aus FMRFamid-immunreaktiven Neuronen, verbindet wahrscheinlich das diffuse Nervensystem mit dem der Rhopalien (Nagayasu *et al.*, 2009). Das von Nagayasu *et al.*, 2009 beschriebene Netz von Motoneuronen der Ephyra, das die periodischen Kontraktionen der Subumbrella-Muskulatur auslöst, enthielt hingegen nur wenige RFamid-positive bzw. FMRFamid-immunreaktive Neuronen.



**Abb. 3.1:** *Whole mount in situ* Hybridisierung gegen die Präkursor-Neuropeptide, RFamid (a und b) und LWamid (c und d), um die Veränderungen des Nervensystems während der Strobilation vom Polypen (a und c, lateral) zur Ephyra (b und d, oral) zu untersuchen. Das Transkript des Gens RFamid wird im Polypen in ektodermalen Zellen des Hypostoms und der Tentakeln nachgewiesen. Bei der Ephyra wird es hingegen im diffusen Nervensystem, das die Exumbrella und die Subumbrella innerviert, sowie um die Rhopalien exprimiert. Das Transkript von LWamid wird ebenfalls im Hypostom des Polypen, aber nicht in den Tentakeln detektiert. In der Ephyra wird die Expression des Gens LWamid in den Rhopalien und im Hypostom belegt.

GLWamid-immunreaktive Zellen wurden unter anderem als epidermale, sensorische Neuronen in den Rhopalien der Ephyra nachgewiesen (Nagayasu *et al.*, 2009). In der *in situ* Hybridisierung gegen das Transkript von LWamid konnten ebenfalls in zwei Arealen an der Basis der Rhopalien LWamid-positive Zellen detektiert werden, die sich während der Metamorphose entwickelten. Die LWamid-positiven Zellen am Hypostom der Ephyra könnten ebenfalls eine Funktion als epidermale, sensorische Neuronen übernehmen.

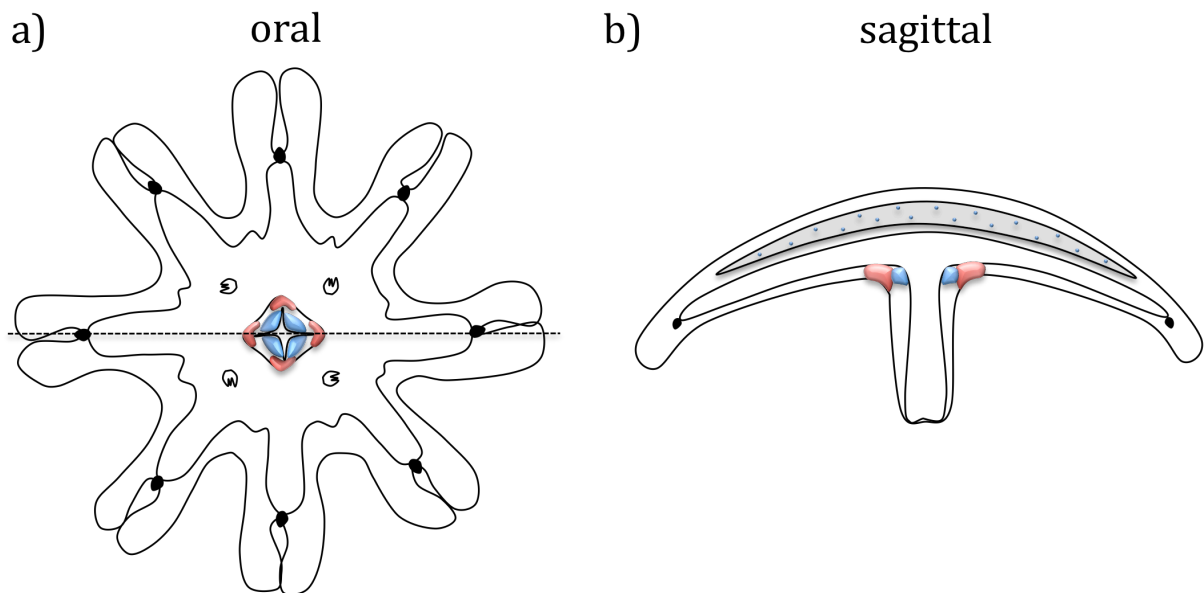
Ob die untersuchten Neuropeptide einen stimulierenden Einfluss auf die Induktion der Strobilation haben, kann aus den bisherigen Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Bei *Hydractinia echinata* (Hydrozoa) konnte gezeigt werden, dass die Planularlarve durch den Verlust von bioaktivem LWamid ihre Fähigkeit zur Metamorphose zum Polypen verliert (Plickert *et al.*, 2003).

### 3.2 Stammzellen und deren Einfluss auf die Differenzierungsprozesse innerhalb der Metamorphose

Stammzell-Systeme wurden innerhalb der Cnidaria bisher nur bei den Hydrozoa entdeckt. Bei *Hydra magnipapillata* (Hydrozoa) konnten die keimbahnspezifischen Gene *Cnnos1*, *Cnvas1* und *Cnvas2* schon in i-Zellen nachgewiesen werden (Mochizuki *et al.*, 2000 & 2001). In *Hydractinia echinata* (Hydrozoa) wurde das keimbahnspezifische Gen *Hevas* ebenfalls in i-Zellen der Planula und des Polypen belegt (Rebscheret *et al.*, 2008). Bei den Scyphozoa, Anthozoa und Cubozoa hingegen ist nichts über die Organisation eines Stammzell-Systems bekannt. Bei *Aurelia aurita* konnte die Expression eines *nanos*-homologen Gens während der Strobilation in den ektodermalen Zellen, welche die Rhopalien bilden, und in Zellen der Sinnesgrube der Ephyrae nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den i-Zellen des *Hydra*-Polypen wiesen diese Zellen keine

morphologischen Ähnlichkeiten auf. Außerdem sind die Zellen, die das *nanos*-homologe Gen exprimieren, in einem Bereich lokalisiert, dem keine hohe Zellproliferation zugeschrieben wird (nach Böhm, 2009). Es ist fragwürdig, ob aus diesen *nanos* exprimierenden Zellen die Zellen der Keimbahn hervor gehen. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Expression keimbahnspezifischer Gene erst mit dem Beginn der Geschlechtsreife der Medusen stattfindet.

Durch die *in situ* Hybridisierung gegen stammzellspezifische Gene konnten, weder im Polypen noch in der Ephyra, Stammzellen in *Aurelia aurita* nachgewiesen werden. Aber aus den *in situ* Hybridisierungen gegen Minicollagene und *zebra* konnten Zentren mit stark erhöhter Zellproliferation am Hypostom der Ephyra abgeleitet werden (Abb. 3.2 a, b). Innerhalb dieser Areale wurde bereits mit einer Bromdesoxyuridin-Markierung eine erhöhte Zellproliferation nachgewiesen (Böhm, 2009). Interessanterweise konnte auch das Transkript von *mesoglein* in den interstitiellen Bereichen der Proliferationszonen am Hypostom detektiert werden (Abb. 3.2 a, b).



**Abb. 3.2:** Mögliche Lokalisation von Stammzellen (blau) und Mesogleazellen (rot) in der Ephyra von *Aurelia aurita*. Orale Ansicht der Ephyra (a) mit Arealen von vermutlichen Stammzellen, aus denen Nematoblasten und Drüsenzellen hervorgehen und Mesogleazellen im Hypostom. Die sagittale Ansicht der Ephyra (b) zeigt zusätzlich die Mesogleazellen in der Mesoglea (grau). Die gestrichelte Linie zeigt die Schnittebene von b) an.

Welche Funktion die, ebenfalls in amöboiden Zellen der Scyphozoen-Mesoglea nachgewiesenen, *mesoglein*-Transkripte haben, ist nicht bekannt. Allerdings gibt es Hinweise, dass einige dieser amöboiden Zellen an der Gametogenese teilnehmen (Harrison & Westfall, 1991). Im Medusenstadium von *Podocoryne carnea* (Hydrozoa) konnten die Transkripte von *Pcnos1* und *Pcnos2*, beides Orthologe von *nanos*, im Manubrium, der Ort an dem die Gonaden lokalisiert sind, nachgewiesen werden (Torras *et al.*, 2004).

### **3.3 Differentielle Genexpression innerhalb der verschiedenen Lebensstadien: Polyp, Strobila und Ephyra**

Die Cnidaria verfügen über den ältesten Lebenszyklus innerhalb der Eumetazoa, dennoch war bis zu Beginn dieser Arbeit nichts über die molekularen Mechanismen zu dessen Regulation bekannt. Innerhalb der Insekten wurden bereits bei *Drosophila melanogaster* von einem Drittel der exprimierten Gene, die Transkriptionslevel über einen kompletten Entwicklungszyklus analysiert. Die Analyse ergab, dass sich von 3483 Genen während der Embryogenese 2103, in der larvalen Phase 445, in der Puppenphase 646 und im Adultstadium 118 Gene signifikant verändern. Das zeigt deutlich, dass sich die Expression von über hundert Genen um das mindestens Vierfache während Anfang, Mitte und Ende der Embryogenese, während der Transition von der Larve zur Puppe und während des Endes des Puppenstadiums verändert (Arbeitman *et al.*, 2002). Dieses Beispiel belegt, dass jedes Lebensstadium bei *Drosophila melanogaster* über stadienspezifisch exprimierte Gene verfügt.

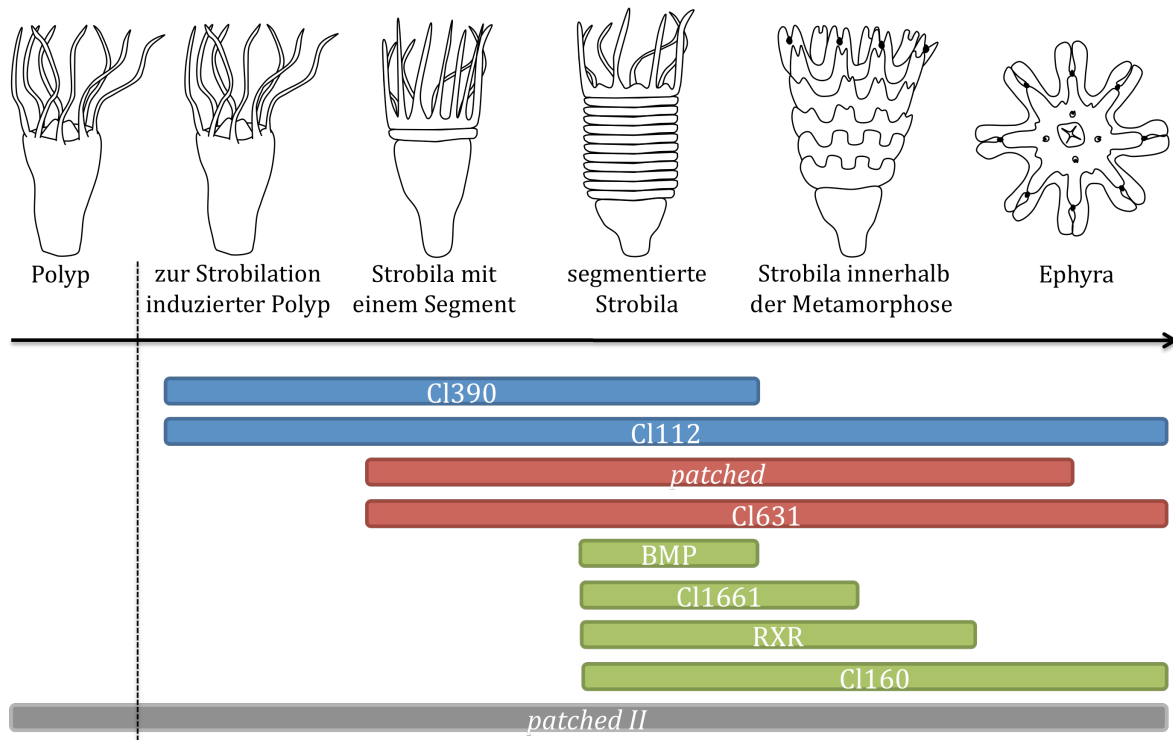
Um innerhalb der Cnidaria zu verstehen, wie auf der Basis von einem Genom unterschiedliche Morphotypen entstehen, wurde im Zuge dieser Arbeit ein 29608 Contigs umfassendes Transkriptom (*aurelia\_celera\_v02*) aus drei verschiedenen Lebensstadien von *Aurelia aurita* erstellt. Die Genexpressionsanalyse ergab, dass 1,1 % (266 Gene) der polypspezifischen, 1,4 % (218 Gene) der strobilaspezifischen und 1,6 % (191 Gene) der ephyraspezifischen Transkripte nur im jeweiligen Lebensstadium exprimiert werden. Die übrigen 95,9 % (28.933 Gene) werden in allen drei Lebensstadien exprimiert. Im Vergleich zu den Veränderungen der Genexpression aus der Mikroarray-Analyse von *Drosophila melanogaster* war die Anzahl an

lebensstadienspezifischen Genen aus der 454-Sequenzierung von *Aurelia aurita* wesentlich geringer. Für die Auswahl stadienspezifischer Gene wurden allerdings sehr stringente Parameter verwendet, die viele gering exprimierte Gene ausschlossen. Zudem lag keine sättigende Sequenzierung des Transkriptoms von *Aurelia aurita* vor. Dementsprechend kann sich die Anzahl stadienspezifisch exprimierter Gene noch wesentlich erhöhen.

Bei einem weiteren Vertreter der Cnidaria *Podocoryne carnea* (Hydrozoa) wurden bereits mit Hilfe der *RNA fingerprinting* Technik und 15 spezifischen Oligonukleotiden 762 lebensstadienspezifische Banden amplifiziert, von denen 7 % (54 Banden) dem Polypen und 9 % (70 Banden) der Meduse zugeordnet werden konnten (Aerne *et al.*, 1996). Im direkten Vergleich mit *Podocoryne carnea* war die Anzahl der stadienspezifisch, in Polyp und Strobila, exprimierten Gene bei *Aurelia aurita* deutlich höher und die Verteilung der spezifisch in einem Lebensstadium exprimierten Gene homogener. Allerdings kann hier kaum von einer Gegenüberstellung der beiden Datensätze gesprochen werden, da die Daten aus der *RNA fingerprinting* Technik von *Podocoryne carnea* vermutlich nur einen kleinen Ausschnitt ihres Gesamt-Transkriptoms repräsentieren.

### **3.4 Differentielle Genexpression während der Strobilation von *Aurelia aurita***

Anhand ihrer charakteristischen Expressionsmuster aus der 454-Sequenzierung, der *in situ* Hybridisierung und der Mikroarray-Hybridisierung konnten die untersuchten Gene, die einen möglichen Einfluss auf die Strobilation haben, in vier Gruppen unterteilt werden (Abb. 3.3): 1. Gene, die vor den ersten morphologischen Anzeichen der Strobilation exprimiert werden (blau); 2. Gene, die mit der Ausbildung des ersten Segments exprimiert werden (rot); 3. Gene, die im Anschluss an die Segmentierung exprimiert werden (grün) und 4. Gene, die konstitutiv über den gesamten Zeitraum exprimiert werden (grau). Innerhalb dieser Gruppen stellen Homologe des *Sonic Hedgehog* (SHH) Signalwegs, des *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) Signalwegs, des Retinoic-X-Rezeptors (RXR) und der sogenannten *taxonomically restricted genes* (TRGs) die vermutlichen Induktoren und Regulatoren der Strobilation dar.



**Abb. 3.3:** Exprimierte Gene während der Strobilation in vier Gruppen unterteilt, unmittelbar vor den ersten morphologischen Veränderungen exprimiert (blau): Cl390 und Cl112; mit der Entstehung des ersten Segments der Strobila exprimiert (rot): *patched* und Cl631; im Anschluss an die Segmentierung exprimiert (grün): BMP, Cl1661, RXR und Cl160; und über den kompletten Zeitraum exprimierte Gene (grau): *patched II*. Die vertikale, gestrichelte Linie symbolisiert den Übergang zur Strobilation.

Die erste Gruppe umfasste die Gene Cl390 und Cl112. Diese werden unmittelbar vor den ersten morphologischen Anzeichen der Strobilation exprimiert und könnten die potentiellen Induktoren für die Strobilation darstellen. Cl390 und Cl112 stellen beide *taxonomically restricted genes* (TRGs) dar. Wie bereits in *Hydra* gezeigt werden konnte, können TRGs einen Einfluss auf die Morphogenese und die Musterbildung haben. In *Hydra vulgaris* AEP wurde durch die Überexpression des TRGs *mHym301A* aus *Hydra oligactis* die Neubildung und Regeneration der Tentakeln so modifiziert, dass sie im gleichen asynchronen Muster wie bei *Hydra oligactis* auftraten (Khalturin *et al.*, 2008). Des Weiteren kann die Etablierung eines TRGs in der Kodierung eines antimikrobiellen Peptids (AMP) liegen, um mikrobielle Offensiven zu verhindern und um eine spezifische Mikrobiota zu formen (Khalturin *et al.*, 2009). Aufgrund der ausschließlichen Expression von Cl390 und Cl112 während der Strobilation, ist es jedoch höchst unwahrscheinlich, dass sie für ein AMP kodieren. Zudem gibt es ein weiteres Transkript, Cl5 (*aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_5*), das in der Proteinstruktur mit mehreren Arginin-

Wiederholungen eine hohe Ähnlichkeit zu Cl390 aufweist. Es wird exklusiv an der Außenseite der Tentakeln exprimiert und ist somit höchstwahrscheinlich an der Musterbildung beteiligt.

Die zweite Gruppe von Genen wird mit der Bildung des ersten Segments der Strobila exprimiert. Zu dieser Gruppe gehörten *patched*, der Rezeptor des *Sonic Hedgehog* (SHH) Signaltransduktionswegs und das TRG Cl631. Bei *Drosophila* kontrolliert der SHH-Signalweg zusammen mit der *wingless*-Signalkaskade die Segmentierung des Embryos und die darauffolgende Determinierung der Zellschicksale innerhalb der einzelnen Parasegmente (Gilbert & Singer, 2006). Der SHH-Signaltransduktionsweg könnte somit ebenfalls an der Segmentierung der Strobila beteiligt sein. In der *in situ* Hybridisierung konnte eine, diese Hypothese belegende, den Segmenten vorhergehende, „Welle“ der Expression des *patched* Transkripts nachgewiesen werden. Bei *Platynereis dumerilii* (Polychaeta) konnte ebenfalls eine der Segmentierung vorausgehende Expression von *patched* sowie von *hedgehog* und dem Transkriptionsfaktor *gli* noch vor der Segmentierung belegt werden (Dray *et al.*, 2010). Bei Amphibien wurde die Rolle des SHH-Signaltransduktionswegs im Verlauf der Umgestaltung des Darms in der Metamorphose bereits beschrieben. Dabei wird von Stammzellen innerhalb des Darmepithels vermehrt SHH produziert, um die Zellproliferation zu erhöhen und subepitheliale Fibroblasten zur Expression von BMP-4 anzuregen. BMP-4 reprimiert wiederum die Zellproliferation und initiiert die Differenzierung (Ishizuya-Oka & Hasebe, 2008). Darüber hinaus ist der SHH-Signaltransduktionsweg bei den Vertebraten wichtig für die Entwicklung der Extremitäten und des Nervensystems (Gilbert & Singer, 2006). Der SHH-Signalweg könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Entwicklung des Nervensystems, des Gastrovaskularsystems und die Formierung der Lappen innerhalb der Strobilation haben, da das Transkript von *patched* auch im Anschluss an die Segmentierung über den kompletten Zeitraum der Metamorphose stark exprimiert wird. Das Gen Cl631 fällt in die Gruppe der oben bereits beschriebenen TRGs. Genauso wie Cl390 kodiert es für ein sezerniertes Peptid mit mehreren Arginin-Wiederholungen. Auffällig war, dass Cl631 nicht in der Basis der Strobila exprimiert wurde, aber über die Strobilation hinaus noch in der Ephyra als Transkript vorhanden war. Somit könnte eine mögliche Funktion von Cl631, die eines Morphogens sein.

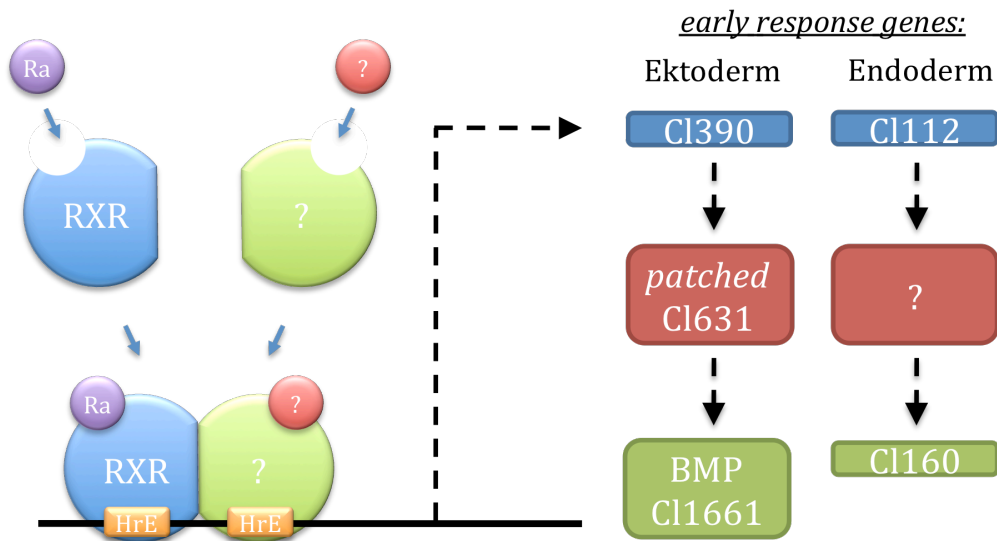


Die dritte Gruppe von Genen wird im Anschluss an die Segmentierung der Strobila exprimiert. Sie umfasste die Gene BMP, Cl1661, Cl160, und den RXR. Das Gen 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_4359 kodiert für BMP, ein sezerniertes Morphogen und ein Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie, deren zugehörige Proteine Prozesse wie Zellteilung, Apoptose, Zellmigration und Differenzierung regulieren (Gilbert & Singer, 2006). Wie im vorhergehenden Absatz diskutiert, wird innerhalb der Metamorphose des Darms bei Amphibien BMP-4 exprimiert, welches die Differenzierung des Epithels initiiert (Ishizuya-Oka & Hasebe, 2008). BMP könnte für die Differenzierungsprozesse der Lappen und des Gastrovaskularsystems eine Rolle spielen. Das zweite Gen dieser Gruppe HMG (Cl1661) kodiert für ein interessantes Peptid mit zwei *High Mobility Group* (HMG)-Domänen. Während des Verlaufs der Metamorphose wird HMG verstärkt in Zellen, aus denen vermutlich die Lappen und die Rhopalien hervorgehen, exprimiert. Die Überexpression des *Drosophila* Homologs des *High Mobility Group* Proteins (HMGD) in Embryonen von *Drosophila* führte zu einer Veränderung der Expression der *early response genes E74A* und *E75A*, wodurch die Verpuppung und die Metamorphose der Larve ausblieb (Chen *et al.*, 2008). Das Transkript Cl1661 könnte ein vielversprechender Kandidat für die Regulierung der Metamorphoseprozesse sein. Ein weiteres Gen Cl160 weist eine Domäne der SOUL Superfamilie auf. In *Mus musculus* wurden Proteine, die eine SOUL Domäne enthalten und Häm-bindende Eigenschaften sowie eine charakteristische optische Absorption aufweisen, in der Retina und in der Epiphyse gefunden (Sato *et al.*, 2004). Eine Funktion von Cl160 könnte die Bindung von Häm-Domänen sein. Dies würde den Nachweis des Transkripts in den pigmentierten Zellen des Gastrovaskularsystems der Ephyra erklären. Ein weiteres Gen, welches für den Retinoic-X-Rezeptor kodiert, spielt eine besondere Rolle innerhalb der Strobilation. Durch die Zugabe von all-trans-Retinsäure während der Induzierung von Polypen zur Strobilation, konnte die Metamorphose der Tiere im Vergleich zur Kontrolle deutlich früher beobachtet werden (Dirksen, persönliche Kommunikation). Zwar konnte in der *in situ* Hybridisierung gegen das Transkript des Retinoic-X-Rezeptors nur ein Signal in ektodermalen Zellen, welche vermutlich die Rhopalien bilden, detektiert werden, durch eine RT-PCR konnte allerdings gezeigt werden, dass das Transkript des Retinoic-X-Rezeptors in der Strobila wesentlich stärker exprimiert ist als in Polyp und Ephyra (nicht gezeigt). Zudem wurde mittels einer RT-PCR die Expression zweier Transkripte überprüft (nicht gezeigt), die möglicherweise für das Enzym Retinoldehydrogenase

kodieren, welches das Substrat des Retinoic-X-Rezeptors katalysiert. Dabei wurde festgestellt, dass eines der beiden Transkripte ausschließlich in Polyp und Strobila stark exprimiert wird, während das andere Transkript nur gering, aber konstitutiv in allen Stadien vorhanden ist. Aus diesen Daten kann ein induzierender Einfluss des Retinoic-X-Rezeptors auf die Strobilation von *Aurelia aurita* abgeleitet werden. Vergleicht man den Mechanismus der Metamorphose von *Aurelia aurita* mit dem der Amphibien, wäre mit dem Retinoic-X-Rezeptor ein Teil des metamorphoseinduzierenden Heterodimers gegeben. Fraglich ist nur, welcher Rezeptor und welcher Ligand den anderen Teil des Heterodimers darstellen. Einen Hinweis auf ein strobilationsinduzierendes, hitzeinstabiles Molekül bei *Aurelia aurita*, das eventuell den Liganden darstellt, gaben bereits Verfütterungs-Experimente von Strobila-Segmenten an Polypen (Li, 2010).

Die vierte Gruppe von Genen enthält das Transkript von *patched II*, eines weiteren Rezeptors des SHH-Signaltransduktionswegs, das in allen untersuchten Lebensstadien konstitutiv exprimiert wird. Da *patched II* nur den Rezeptor darstellt, kann keine Aussage über seine Aktivierung getroffen werden. Welche Funktionen der SHH-Signalweg innerhalb der Strobilation erfüllen kann, wurde bereits im Zusammenhang mit *patched* (s. o.) beschrieben.

Aus diesen Resultaten lässt sich folgendes Modell postulieren (Abb 3.4): Durch die Aktivierung eines bisher unbekanntem Rezeptors durch seinen Liganden wird ein Heterodimer mit dem, durch Retinsäure aktivierten, Retinoic-X-Rezeptor gebildet. Dieses Dimer bindet dann an die *hormone responsive elements* der Zielgene der Metamorphose und aktiviert deren Transkription. Zu diesen *early response genes* zählen im Ektoderm Cl390, *patched*, Cl631, BMP und Cl1661, im Endoderm sind es Cl112 und Cl160. Ziel weiterführender Untersuchungen sollte es sein, den bisher unbekanntem Rezeptor und seinen Liganden zu bestimmen und die Kaskade der durch ihn regulierten Gene zu ergründen.



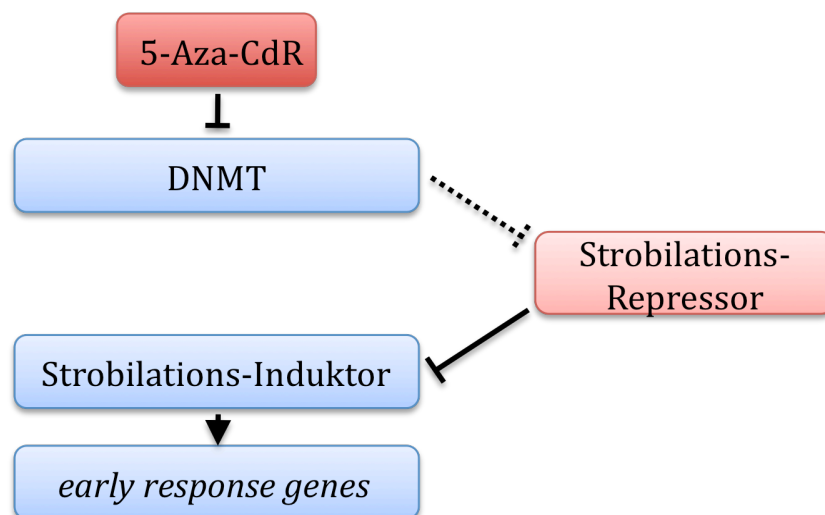
**Abb. 3.4:** Modell der möglichen Induzierung der Strobilation von *Aurelia aurita*. Ein bisher unbekannter Rezeptor wird durch seinen Liganden aktiviert und bildet ein Heterodimer mit dem durch Retinsäure aktivierten Retinoic-X-Rezeptor. Das Heterodimer bindet an die *hormone responsive elements* der Zielgene (*early response genes*) und aktiviert deren Transkription. Zu den Zielgenen zählen im Ektoderm Cl390, *patched*, Cl631, BMP und Cl1661, im Endoderm sind es Cl112 und Cl160. RXR: Retinoic-X-Rezeptor, Ra: Retinsäure, HrE: *hormone responsive element*.

### 3.5 Epigenetische Inhibition der Strobilation

Die Inhibition epigenetischer Mechanismen, hat einen großen Einfluss auf die Metamorphose. Wie schon bei *Apis mellifera* (Arthropoda) belegt, entstehen aus Larven, durch das Ausschalten der DNA-Methyltransferase Dnmt3, nach der Metamorphose Königinnen mit vollständig entwickelten Ovarien, anstelle von Arbeiterinnen (Kucharski *et al.*, 2008). Um einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression durch die Methylierung der DNA während der Metamorphose von *Aurelia aurita* nachzuweisen, wurden Polypen zur Strobilation induziert und mit 5-Aza-CdR behandelt. Das Resultat dieser Inkubation war die vornehmliche Inhibition der Strobilation. Auch die Ergebnisse der Mikroarray-Hybridisierung belegen eine deutliche Reduzierung der Expression strobilationspezifischer Gene der mit 5-Aza-CdR behandelte Tiere im Vergleich zu der Kontrolle.

Eine mögliche Erklärung für die überwiegende Inhibition der Strobilation durch die Behandlung mit 5-Aza-CdR ist, dass regulative Elemente polypenspezifischer Gene einen kritischen Methylierungsgrad nicht mehr erreichen könnten. Somit bliebe den meisten Polypen der Eintritt in die Metamorphose verwehrt. Bei den Mammalia (Chordata)

konnte bewiesen werden, dass während der Entwicklung der Keimzellen eine starke *de novo*-Methylierung stattfindet (Strachan & Read 2005). Während der Metamorphose von *Aurelia aurita* müssten die Gene des momentanen Lebensstadiums ebenfalls *de novo*-methyliert und die Gene des folgenden Lebensstadiums demethyliert werden. Es wäre möglich, dass durch die Behandlung mit dem Methyltransferase-Inhibitor polypenspezifische Gene nicht mehr methyliert werden könnten und somit weiter exprimiert würden. Unter diesen Genen könnten sich ein oder mehrere Strobilations-Repressor-Gene befinden, welche die Demethylierung strobilationsinduzierender, regulativer Elemente verhindern (Abb. 3.5). Die Metamorphose des Polypen bleibt dadurch aus und die *early response genes*, welche die Strobilation initiieren würden nicht exprimiert.



**Abb. 3.5:** Inhibition der Strobilation mit 5-Aza-CdR. Durch die Behandlung mit 5-Aza-CdR wird die DNMT inaktiviert. Die möglichen „Strobilations-Repressor-Gene“ können nicht mehr methyliert werden, die Strobilation wird verhindert. Die Expression der möglichen „Strobilations-Induktor-Gene“ bleibt unterdrückt und es werden keine *early response genes* für die Metamorphose aktiviert.

Der Versuch mit Larven von *Apis mellifera*, die durch die Injektion von *Dnmt3 small interfering* RNA die Entwicklung zu Königinnen durchliefen, anstatt sich zu Arbeiterinnen zu entwickeln (Kucharski *et al.*, 2008), unterscheidet sich im Resultat stark von der Behandlung von Polypen mit 5-Aza-CdR. Zum einen wurde die Metamorphose der Polypen durch die Behandlung zum Teil inhibiert und zum anderen wies das Produkt der Metamorphose, die Ephyra, keine sichtbaren Veränderungen auf.

Es wäre aber ein interessanter Ansatz Embryonen von *Aurelia aurita* mit 5-Aza-CdR zu behandeln, um anschließend das Resultat der Entwicklung zu untersuchen.

### 3.6 Transgene *Aurelia aurita*

Die Generierung transgener Polypen sollte die *in vivo*-Beobachtung und -Verfolgung einzelner Zell-Linien im Prozess der Strobilation ermöglichen. Im Anschluss an die Injektion von GFP-Reporter-Konstrukten in Zygoten von *Aurelia aurita* konnten transient GFP exprimierende Planularlarven beobachtet werden. Im Gegensatz zu den transgenen Embryonen von *Hydra vulgaris* (Hydrozoa), bei denen bereits 2-3 Tage nach der Injektion eine Expression von GFP nachzuweisen war (Wittlieb *et al.*, 2005), besaßen die injizierten Embryonen von *Aurelia aurita* erst nach 7 Tagen eine GFP-Fluoreszenz. Eine späte Expression der Reporter-Proteine wurde ebenfalls bei transfizierten Embryonen von *Nematostella vectensis* (Hydrozoa) belegt. Zwar verfügten diese bereits nach 24 Stunden über eine transiente Expression des Reporterproteins mCherry, aber erst nach 5-9 Tagen der Entwicklung waren eindeutige transgene Zellen zu beobachten (Renfer *et al.*, 2010). Die verzögerte Expression von GFP könnte zum einen auf eine sehr späte Integration des Reporter-Konstrukts in das Genom zurückgeführt werden, zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression der Gene, deren Promotoren verwendet wurden, erst in einem späteren Entwicklungsstadium erfolgte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Plasmide ausschließlich transient exprimiert wurden und nicht ins Genom integrierten.

1,28 % aller injizierten Embryonen von *Aurelia aurita* wiesen im Planula-Stadium eine GFP-Fluoreszenz auf, die Anzahl der transienten Polypen mit einem GFP-Signal lag bei 0,25 %. Die geringe Anzahl an GFP-exprimierenden Planularlarven entstand durch die hohe Mortalität der injizierten Embryonen. Sie ist wahrscheinlich auf die Reproduktionsstrategie von *Aurelia aurita*, basierend auf vielen Embryonen, die nur geringe Mengen an Dotter enthalten, zurückzuführen. Im Gegensatz zu einem weiblichen Polypen von *Hydra vulgaris*, der 1-2 Embryonen pro Woche bildet (Martin *et al.*, 1997), kann eine reife weibliche *Aurelia aurita* Meduse 414.000 Planularlarven enthalten, die innerhalb von 7,1 Tagen entlassen werden (Ishii & Takagi, 2003). Da nur zwei Individuen für eine erfolgreiche Reproduktion im nächsten Lebenszyklus benötigt

werden, kann die Anzahl der überlebenden Embryonen von *Aurelia aurita* entsprechend gering ausfallen.

Um den Verlust der GFP-Fluoreszenz nach der Umwandlung der Planula zum Polypen erklären zu können, müssen zunächst der Verlauf der Metamorphose und die damit einhergehenden Prozesse nachvollzogen werden. Während der Metabolie finden grundlegende morphologische und zelluläre Änderungen statt. Innerhalb der Metamorphose, findet eine sekundäre Gastrulation statt, bei der aus Zellen des Ektoderms ein sekundäres Endoderm entsteht, welches das primäre Endoderm ersetzt. Die Zellen des primären Endoderms sammeln sich unterdessen am aboralen Pol und weisen eine hohe apoptotische Aktivität auf. (Yuan *et al.*, 2008) Der Verlust der endodermalen GFP-Expression könnte auf die Apoptose der Zellen des primären Endoderms während der Metamorphose der Planularlarve zum Polypen zurückgeführt werden. Die wenigen transient transgenen Polypen mit einer endodermalen Fluoreszenz, die nach der Metamorphose vorhanden waren, könnten durch endodermale GFP-positive Zellen, die keine Apoptose vollzogen haben, entstanden sein. Der Verlust der ektodermalen Fluoreszenz der Planularlarven nach der Metamorphose kann damit aber nicht erklärt werden. Allerdings finden im Verlauf der Metamorphose epigenetische Veränderungen im genetischen Material statt. Es ist somit durchaus möglich, dass ein ins Genom integriertes Reporter-Konstrukt im Verlauf der Metamorphose methyliert und damit ausgeschaltet wird. Bei *Danio rerio* (Osteichthyes) konnte belegt werden, dass Nachkommen von Larven mit robuster GFP-Fluoreszenz, diese durch epigenetische Veränderungen innerhalb weniger Generation verlieren oder nur noch mosaikartig aufweisen (Goll *et al.*, 2009). Warum aber die Polypen mit endodermaler GFP-Fluoreszenz diese nach wenigen Wochen verloren haben, bleibt unklar. Zudem konnte kein Beweis für die Integration der GFP-Reporter-Konstrukte in das Genom erbracht oder GFP-positive Zellen nachgewiesen werden. Somit kann es sich bei der beobachteten GFP-Fluoreszenz entweder um eine transiente Expression oder um eine Autofluoreszenz des Gewebes gehandelt haben.

### 3.7 Ausblick

Die Frage, ob Zellen des Hypostoms der Ephyra von *Aurelia aurita* für die Keimbahn rekrutiert werden und ob *mesoglein*-exprimierende Zellen dazugehören, könnte in Zukunft mit der Generierung von transgenen *Aurelia aurita* geklärt werden. Polypen mit GFP-positiven Stammzellen könnten durch die Mikroinjektion eines GFP-Reporter-Konstrukts unter der Kontrolle eines *nanos*-Promotors in Embryonen generiert werden. Die GFP-positiven Stammzellen könnten dann über die Metamorphose verfolgt werden. Dabei müsste aber beachtet werden, dass eine verstärkte Genexpression keimbahnspezifischer Transkripte erst im späten Adultstadium, einhergehend mit der Geschlechtsreife der Medusen, auftreten kann.

Zudem könnten weitere GFP-Reporter-Konstrukte unter der Kontrolle von Präkursor-Neuropeptid-Promotoren zur Generierung transgener Tieren verwendet werden. Die resultierenden Polypen, die über GFP-positive Neuronen verfügen würden, könnten dann während der Strobilation beobachtet werden, um den Ursprung des komplexen Nervensystems und seiner sensorischen Organe zu ergründen.

Zusätzliche weiterführende Experimente mit den strobilationsspezifischen Genen wären ein RNAi *knockdown* der TRGs Cl112, Cl390 und Cl631, um die Veränderungen oder die Verhinderung der Strobilation zu belegen. Zudem könnte überprüft werden, ob durch die Zugabe von aufgereinigtem Protein von Cl112 oder Cl390 die Strobilation initiiert wird. Wäre ein sequenziertes Genom vorhanden, könnten außerdem die flankierenden Gene *up-* und *downstream* von Cl112 und Cl390 untersucht und deren Promotoren auf *hormone responsive elements* analysiert werden. Zudem könnte ein RNAi-induzierter *knockdown* von Cl1661/HMG durchgeführt werden, um anschließend die Expression von Transkripten, die Homologien zu den *early response genes* von *Drosophila* wie *E74A* und *E75A* aufweisen, zu verfolgen. ETS (Celera\_v01\_contig\_Cl4522), welches wie *E74A* über eine ETS-Domäne verfügt, wäre hierfür ein geeigneter Kandidat. Ein weiterer spannender Versuch wäre die Pulsbehandlung von Strobilae mit Cyclopamin, einem Inhibitor des SSH-Signalwegs (Stanton & Peng, 2009), um die Auswirkungen des Verlustes des SHH-Signalwegs auf die Strobilation und im Speziellen auf die Segmentierung zu beobachten.



In der weiteren Auswertung der aus der Mikroarray-Hybridisierung gewonnenen Daten sollte der Fokus speziell auf die Induktion der Strobilation gelegt werden. Noch bevor die Polypen ein morphologisches Anzeichen der Metamorphose aufweisen, sollte der in Abbildung 3.4 von mir postulierte unbekannte Rezeptor aktiviert und über eine positive Rückkopplung stark exprimiert werden. Eine solche positive Rückkopplung ist ebenfalls für den Ecdysonrezeptor der Insekten (Gilbert & Singer, 2006) und auch für den Thyroidhormonrezeptor der Amphibien (Brown & Cai, 2007) beschrieben. Eine Expression des Rezeptors und seines Liganden wäre in den beiden zur Strobilation induzierten Polypenstadien (C14 und C16) zu erwarten. In den mit 5-Aza-CdR behandelten Polypenstadien (A14 und A16) sollten hingegen diese Transkripte deutlich geringer exprimiert werden. Zusätzlich könnten weitere *early response genes* und Morphogene entdeckt werden, die sowohl in diesen Lebensstadien (C14 und C16), als auch in der Strobila mit einem Segment (ES) exprimiert werden. Die vergleichende Auswertung der beiden Expressionsprofile der Strobilae (ES und LS) wird eine zusätzliche Einsicht in die Musterbildung und Steuerung der Strobilation erbringen. Außerdem könnten die stadienspezifisch exprimierten Gene durch die Mikroarray-Daten überprüft und ergänzt werden.

Ein weiter Ansatz zur Erstellung transgener *Aurelia aurita* könnte mit dem *protein-trap*-Vektor-System erfolgen, das ein künstliches GFP-Exon in das Intron eines bekannten Gens des Genoms integriert (Morin *et al.*, 2001). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die entstehenden GFP-Fusionsproteine die Lokalisation des eigentlichen Proteins einnehmen. Zudem würde damit die aufwendige Amplifikation und Sequenzierung von Promotoren und Terminatoren entfallen. Stattdessen müsste nur die bekannte Sequenz des ausgewählten Gens auf Introne untersucht werden. Außerdem könnten verschiedene Transposon-Vektoren (*mariner*, *Hermes* und *piggyBac*) zur Erstellung transgener Tiere eingesetzt werden (Gonzalez-Estevez *et al.*, 2002). Da es ebenfalls möglich ist, dass die injizierten GFP-Reporter-Konstrukte durch DNasen degradiert wurden, wäre es eine weitere Möglichkeit die Embryonen vor der Injektion mit einem DNase-Inhibitor zu waschen. Zudem könnten die vorhandenen Konstrukte mit flankierenden, invertierten Bindestellen für die Meganuklease I-SceI ergänzt und zusammen mit der I-SceI Meganuklease injiziert werden (nach Renfer *et al.*, 2010). Ein weiterer Vorteil dieser Methode wäre, dass die I-SceI Meganuklease nicht nur die

linearisierten GFP-Reporter-Konstrukte in das Genom integriert, sondern sie auch vor der Degradation schützt (Thermes *et al.*, 2002).

Da die zur sexuellen Reproduktion benötigten Lebensstadien von *Aurelia aurita* nur saisonal auftreten, ist der Zeitraum für die Erstellung transgener Tiere durch die Mikroinjektion sehr begrenzt. Für die erfolgreiche, zeitnahe Etablierung transgener *Aurelia aurita* wäre die Vorbereitung und Durchführung aller beschriebenen Methoden in einer Saison zu empfehlen.

## 4. Zusammenfassung

Wie kann ein Organismus mit nur einem Genom mehrere Morphotypen entwickeln? Um Einsicht in die Metagenese von *Aurelia aurita* (Scyphozoa) zu erhalten, wurde das Transkriptom der Lebensstadien Polyp, Strobila und Ephyra sequenziert. Durch eine differentielle Genexpressionsanalyse wurden stadienspezifische Gene selektiert und in einer *whole mount in situ* Hybridisierung auf ihre Expression hin überprüft. Somit konnten Transkripte detektiert werden, die ausschließlich während der Strobilation exprimiert werden. Zwei Kandidatengene, die möglicherweise für die Induktion der Strobilation verantwortlich sind, gehören zu der Gruppe der *taxonomically restricted genes*. Zudem wurden während der Strobilation exprimierte Gene identifiziert, die signifikante Homologien zu den Proteinen des *Sonic Hedgehog* Signalwegs, des *transforming growth factor beta* Signalwegs und zu dem Retinoic-X-Rezeptor aufweisen.

Um diese Daten zu bestätigen und um weitere Kandidatengene für die Induktion und Steuerung des Prozesses der Metamorphose aufzudecken, wurde mRNA aus Polypen, Ephyrae und Strobilae mit einem Segment, sowie vollständig segmentierten Strobilae, für eine Mikroarray-Hybridisierung verwendet. Um zusätzliche Gene, welche die Strobilation induzieren, aufzudecken, wurden Polypen mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2-Deoxycytidin behandelt, der die Strobilation unterdrückt. Zu zwei Zeitpunkten unmittelbar vor Beginn der Strobilation wurde aus behandelten Polypen und Kontroll-Polypen weitere mRNA für die Mikroarray-Hybridisierung extrahiert. Aus den Resultaten der 454-Sequenzierung, der *in situ* Hybridisierung und der Mikroarray-Hybridisierung konnte anschließend ein Model, das die möglichen Induktoren der Strobilation und alle identifizierten *early response genes* umfasst, erstellt werden.

Abschließend sollten transgene *Aurelia aurita* generiert werden, um die zellulären Prozesse während der Metamorphose, wie die Neubildung medusenspezifischer Organe und den Verlust des Regenerationspotentials, besser ergründen zu können. Dafür wurden spezifische GFP-Reporter-Konstrukte kloniert und in Zygoten, präpariert aus Medusen, injiziert. Aus den injizierten Embryonen entwickelten sich über das Planulastadium Polypen, die transient GFP exprimierten.

## 5. Summary

How does one organism with only one genome develop several different morphotypes during its life cycle? To gain insight into this process, the transcriptome of several *aurelia aurita* (scyphozoa) life stages were sequenced, including the polyp, strobila, and ephyra stages. Life stage specific genes were selected through differential gene expression analysis and their expression patterns were detected using whole mount in situ hybridisation. Genes that are exclusively expressed during strobilation, the process of metamorphosis in the jellyfish, were selected for further investigation. Two taxonomically restricted genes were identified as candidate inducers of strobilation. Furthermore, genes that are expressed during strobilation share significant homology with several conserved genes including proteins of the *sonic hedgehog* signalling pathway, a member of the transforming growth factor beta family, and the retinoic-x-receptor.

To further test these data and to discover further candidate genes involved in the process of metamorphosis, a microarray hybridisation was performed using mRNA taken from polyp, ephyra, strobila with one segment, and fully segmented strobila. To selectively identify genes involved in initiation of strobilation, additional polyps were incubated with the Methyltransferase inhibitor 5-aza-2-deoxycytidine to repress strobilation. Subsequently, mRNA was extracted from control and treated polyps at two time points close to the start of strobilation. Genes with strong expression before the start of metamorphosis were identified as candidate genes involved in strobilation. Taken together, the results of the 454-sequencing, in situ hybridizations, and microarray hybridisation were used to build a model, which includes the possible inducers of strobilation and all identified early response genes.

For future studies, transgenic *aurelia aurita* should be generated, which will aid in the understanding of cellular process during metamorphosis, including the development of medusa specific organs and the loss of regeneration capacity. To this end, specific GFP-reporter constructs were cloned and injected into zygotes. The embryos successfully developed into planula larva and formed polyps with transient GFP expression.

## 6. Material

### 6.1 Verwendete Organismen

<i>Aurelia aurita</i>	Polypen aus Roscoff, entnommen aus dem Atlantik in Frankreich, ubiquitäre Population, bestimmt nach Schroth <i>et al.</i> , 2002
<i>Aurelia aurita</i>	Eizellen präpariert aus reifen Medusen, entnommen aus der Ostsee, boreale Population bestimmt nach Schroth <i>et al.</i> , 2002
<i>Artemia salina</i>	Silver Star
<i>Escherichia coli</i>	Stamm ElectroMAXTMDH5 $\alpha$ TM

### 6.2 Chemikalien

5-Aza-2-Deoxycytidin	Sigma
Agar Agar	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumacetate	Roth
Ampicillin	Merck
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serum Albumin	Roth
Calciumchlorid	Roth
CHAPS	Sigma
Chloroform	Fluka
(CATB) Cetyltrimethylammoniumbromid	Sigma
dNTPs (10 mM)	Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
EDTA	Sigma
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid	Sigma
Ethanol	Roth

Ethidium bromide (50 mg/ml)	Roth
Eukitt	Sigma
Formamid	Roth
Fluoromount G	SouthernBiotech
Glucose	Merck
Glycine	Merck
Glycerin	Roth
HCl	Roth
Heparin	Sigma
IPTG	Sigma
Isoamylalcohol	Roth
Isopropanol (2-Propanol)	Roth
KCl	Merck
Lithiumchlorid	Roth
Maleinsäure	Roth
Methanol	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Natriumacetat	Roth
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	Roth
Natriumsulfat	Roth
Natriumchlorid	Roth
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumcitrat	Roth
NBT/BCIP	Roche
NH <sub>4</sub> Cl	Merck
Paraformaldehyd	Agar Scientific Ltd.
Phenol	Roth
Rotiphorese Gel 40	Roth
Schafserum	Sigma
Natriumlaurylsulfat	Roth

Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim
Synthetisches Seewasser, Reef Crystals	Zoo Zajak, Duisburg
Substrate Lösung (NBT/BCIP)	Roche
TEMED	Serva
Triethanolamin	Merck
Tris	Roth
TRIzol® Reagent	Invitrogen
tRNA	Sigma
Trypton	Difco Laboratories
Tween-20	Roth
Harnstoff	Roth
X-Gal	Sigma

### 6.3 Medien

<i>Aurelia</i> Medium	30 ‰ (w/v) Synthetisches Meersalz Reef Crystals™ in Millipore H <sub>2</sub> O
<i>Artemia</i> Medium	30 ‰ (w/v) Synthetisches Meersalz Reef Crystals™ in Millipore H <sub>2</sub> O
LB Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, autoklaviert
LB-Amp Medium	LB Medium mit 50 µg/ml Ampicillin (zugegeben nach dem Autoklavieren)
LB Agar	LB Medium mit 1,5 % (w/v) Agar Agar, autoklaviert
SOB Medium	2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , autoklaviert
SOC Medium	SOB Medium mit 20 mM Glucose (steril filtriert, nach dem Autoklavieren zugesetzt)

### 6.4 Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml, bei -20 °C gelagert
APS	10 % (w/v) in Millipore H <sub>2</sub> O, 50 % Glycerin



Hoechst-Stammlösung	1 mg/ml in Millipore H <sub>2</sub> O
CTAB-Extraktionspuffer	2 % (w/v) CATB, 1,4 M NaCl, 0,2 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM TrisHCl pH 8, 0,1 mg/ml Proteinase K
Denhardt's solution (50x)	1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % (w/v) Ficoll, 1 % (w/v), fraction V, steril filtriert, bei -20 °C gelagert
DNA loading buffer (6x)	Fermentas
Heparin	10 mg/ml in Millipore H <sub>2</sub> O, bei -20 °C gelagert
Hybridisierungs-Lösung	50 % Formamid, 5 x SSC, 0,1 % Tween-20, 0,1 % CHAPS, 1 x Denhardt's solution, 100 $\mu$ g/ml Heparin in DEPC
MAB	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5 with NaOH, in DEPC-water
MAB-B	MAB + 1 % BSA Fraktion V
MAB-T	MAB + 0,1 % Tween-20
NTM	0,1 M NaCl, 0,1 M Tris, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,5
NTM-T	NTM mit 0,1 % (v/v) Tween20
Paraformaldehyd	4 % (w/v) in PBT, pH 7,5
PBS	0,15 M NaCl, 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,3
PBT	PBS with 0,1 % (v/v) Tween20
SSC (20x)	3 M NaCl, 0,3 M sodium citrate, pH 7,0
TAE (50x)	2 M Tris acetate, 50 mM EDTA, pH 8,0
TBE (10x)	1,3 M Tris, 0,45 M boric acid, 25 mM EDTA, pH 8,5
TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5
X-Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid

### 6.5 Enzyme

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Restriktionsendonukleasen von NEB bezogen.

<i>NotI</i>	Fermentas
<i>PstI</i>	Fermentas

DNase I	Roche
Platinum Taq-DNA-Polymerase	invitrogen™
Proteinase K	Fermentas
Shrimp alkaline phosphatase	Fermentas
SP6 RNA Polymerase	Roche
RNase H	invitrogen™
SequiTherm EXCEL II DNA-Polymerase	Epicentre Biotechnologies
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas
T4 DNA-Ligase	New England Biolab
T4 DNA-Polymerase	invitrogen™
T7 RNA polymerase	Roche

### 6.6 Vektoren

pGEM-T	Promega
pMiLRneo	Klinakis <i>et al.</i> , 2000

### 6.7 Antikörper

Anti-DIG-Schaf-Ig-AP, 11093274910	Roche
Anti-GFP-Kaninchen-IgG , AB3080	Millipore
Anti-Rabbit-Ziege-IgG-Alexa 488 nm, A11008	invitrogen™

### 6.8 Kits

DIG RNA Labelling Kit (SP6/T7)	Roche
First strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
illustra™ QuickPrep Micro mRNA Purification Kit	GE Healthcare
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel
pGEM-T Easy Vector System	Promega
Qiafilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
SequiTherm EXCEL II LC	Epicentre
Superscript II Double Strand cDNA Synthesis	invitrogen™

MEGAscript® RNAi Kit

Ambion

## 6.9 Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotide, die nicht in Kits enthalten waren, wurden von MWG synthetisiert. Eine Liste aller verwendeten Primer ist im Anhang 9.7 zu finden.

## 6.10 Geräte

### 6.10.1 PCR-Maschinen (Thermocycler)

Primus 25	MWG-Biotech
Primus 96	peqLab
Primus 96 plus	MWG-Biotech

### 6.10.2 Gelelektrophorese-Kammern und Netzgeräte

B1A, B2, D3 (Gel Kammer)	Owl Separation Systems Inc.
EV-231 (Netzgerät)	Consort
EPS-3500 (Netzgerät)	Pharmacia Biotech

### 6.10.3 Inkubatoren

HIS25	Grant Boekel
KS10	Edmund Bühler
Thermo incubator	Heraeus Instruments
Thermomixer compact	Eppendorf
Thermomixer Certomat H	B. Braun Biotech

### 6.10.4 UV-Geräte

Imaging system	Bio-Rad
ImaGo compact imaging system	B+L Systems
UV-Stratalinker 1800	Stratagene

### 6.10.5 Elektroporation

Gene Pulser II	Bio-Rad
Pulse Controller II	Bio-Rad

### 6.10.6 Zentrifugen

Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Mini Spin	Eppendorf
Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments
SpeedVac Plus SC110A	Savant

### 6.10.7 Mikroskope

SZX16	Olympus
DP71 (digital Kamera)	Olympus
AxioCam	Zeiss
Axioskop 2	Zeiss
KLSM TCS SP/UV	Leica
DC300F (digital Kamera)	Leica

### 6.10.8 Weitere Geräte

AF-10 (Eismaschine)	Scotsman
BioPhotometer	Eppendorf
DNA Analyzer 4300L	LI-COR
Gefrierschrank -20 °C	Siemens
Gefrierschrank -80 °C	Forma Scientific
Kühlschrank +4 °C	Liebherr
Kühlschrank +10 °C	Liebherr
Waage	Sartorius
Mikrowelle	Moulinex
Milli-Q Academic System	Millipore

Nanodrop ND 1000 Photometer	Thermo Scientific
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments
Steril Arbeitsbank	Heraeus
VARIOKLAV 400 EV	H+P Labortechnik GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries

### 6.11 Weitere Materialien

12-well Platten	Roth
Latex- und Nitril-Handschuhe	Roth
Pasteur-Pipetten (150 mm, 230 mm)	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000, 5000 µl)	Sarstedt
Pipetten (0,5 bis 5000 µl)	Eppendorf
Plastikgefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt
Skalpell-Klingen	Merck
Sterile Filter (0,20 µm, 0,45 µm Porengröße)	Sarstedt
Deckgläser	Roth
Elektroporationsküvetten	Eppendorf
Objektträger 76 x 26 mm	Walter CMP
YM-50 Microcon-Säule	Millipore

### 6.12 Computerprogramme und Datenbanken

#### 6.12.1 Datenbanken

Blast Datenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>
-----------------	---

#### 6.12.2 Sequenzanalyse-Software

CLC Sequence Viewer 6	CLC bio
DNAMAN v4.15	Lynnon Corporation
eSeq v3.0	LICOR

Genespring Software	Agilent
SMART	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>
Mega	<a href="http://www.megasoftware.net/">http://www.megasoftware.net/</a>
eArray Software	<a href="https://earray.chem.agilent.com/earray/">https://earray.chem.agilent.com/earray/</a>
Mayday Software	<a href="http://www-ps.informatik.uni-tuebingen.de/mayday/wp/">http://www-ps.informatik.uni-tuebingen.de/mayday/wp/</a>

### 6.12.3 Weitere Software

Bildbearbeitung	Photoshop CS4 (Adobe)
Mikroskopie	Axio Vision 3.1 (Zeiss) & IM 50 4.0 (Leica)

## 7. Methoden

### 7.1 Hälterung von *Aurelia aurita*

Polypen von *Aurelia aurita* wurden bei 18–22 °C in künstlichem 30 ‰ Seewasser kultiviert. Sie wurden einmal pro Woche mit frisch geschlüpften *Artemia salina* gefüttert und nach 24 Stunden gewaschen. Dabei wurden Nahrungsreste und Detritus entfernt und die 3 Liter fassenden Glasschalen mit frischem, künstlichem 30 ‰ Seewasser befüllt.

#### 7.1.1 Induktion der Strobilation von *Aurelia aurita*

Nach der von Berking *et al.* 2005 beschriebenen Methode, wurden Polypen der ubiquitären Population durch die Reduzierung der Temperatur zur Strobilation induziert. Dafür wurden, die bei Raumtemperatur gehälterten Polypen, in einen auf 10 °C temperierten Kühlschrank überführt. Nach 2-3 Wochen setzte bei nahezu allen Tieren der induzierten Kultur die Strobilation ein. Die Anzahl der Individuen einer Kultur hatte keinen Einfluss auf die Induktion.

#### 7.1.2 Induktion der Fertilisation von *Aurelia aurita*

Es wurden am frühen Morgen mittelgroße Medusen von circa 20-25 cm Durchmesser mit vollständigen Gonaden in einem 25 Liter Ballon gesammelt. Ausgewählt wurden vier männliche Tiere (weiße Gonaden) und sechs weibliche Tiere (pink- bis purpurfarbene Gonaden), die dann in circa 20 Litern Seewasser ins Labor überführt und bei 4 °C im Dunkeln für 22 Stunden verwahrt wurden. Nach dem Überführen des Ballons auf RT und der direkten Beleuchtung mit einer Aquariumlampe, konnten vier Stunden später Zygoten aus den Mundarmen der weiblichen Medusen entnommen werden.

### **7.1.3 Inhibition der Strobilation mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-2-Deoxycytidin**

Die Polypen wurden zur Strobilation induziert (K. 7.1.1). Für die Inhibition der Strobilation wurden 20-30 Polypen in einer Petrischale in Artifizielles Seewasser (ASW) mit 100  $\mu$ M 5-Aza-2-Deoxycytidin gehältert. Alle 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und neues 5-Aza-2-Deoxycytidine zugegeben. Die Kontrolltiere wurden dagegen nur mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Die Konzentration der Stammlösung des in DMSO gelösten 5-Aza-2-Deoxycytidins betrug 100 mM. Sie wurde in Aliquots von 20  $\mu$ l aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Der Versuch wurde mit 3 x 20 mit 5-Aza-2-Deoxycytidine behandelten Tieren, 3 x 20 unbehandelten Tieren (Experiment I), 3 x 30 mit 5-Aza-2-Deoxycytidine behandelten Tieren und 3 x 30 unbehandelten Tieren (Experiment II) repliziert (siehe Anhang 9.4).

## **7.2 Isolation von Nukleinsäuren**

### **7.2.1 Isolation von mRNA aus Polypen, Strobilae und Ephyrae von *Aurelia aurita***

Die mRNA-Extraktion wurde mit dem illustra™ QuickPrep *Micro* mRNA Purification Kit von GE Healthcare gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### **7.2.2 Isolation von gDNA aus Polypen von *Aurelia aurita***

Die gDNA-Extraktion wurde nach einer modifizierten Methode, der von Winnepeninckx *et al.*, 1993, beschriebenen Extraktion durchgeführt. Für die Extraktion wurden 3-5 Polypen mittlerer Größe verwendet. Sie wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einer, der Tiermasse identische Menge ( $\varnothing$  0,5 mm) an Glaskugeln, vermengt. Nachdem so viel Medium wie möglich abgenommen worden war, wurden die Tiere im Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Pistill homogenisiert. Anschließend wurden 750  $\mu$ l eines auf 60 °C vorgewärmten CTAB-Extraktionspuffers zugesetzt und das Reaktionsgefäß invertiert, bis das komplette Tiermaterial gelöst war. Während der anschließenden Inkubation bei 60 °C für 30



Minuten wurde das Reaktionsgefäß gelegentlich invertiert. Dann folgte die Zugabe von 1 VT Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) mit einer anschließenden mehrfachen Invertierung. Es folgte eine 10 Minuten lange Zentrifugation bei 7700 rpm, dann wurde die wässrige Phase mit 2/3 VT Isopropanol versetzt und für 60 Minuten bei RT präzipitiert. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 7700 rpm zentrifugiert und das resultierende Pellet mit 76 % Ethanol und 10 mM Ammoniumacetat für 30 Minuten gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 10 Minuten bei 7700 rpm wurde das Pellet in 20  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  gelöst.

### **7.2.3 Isolation von Plasmid-DNA**

Bakterien-Klone, die ein Insert der korrekten Größe aufwiesen, wurden ausgewählt und in einer 4 ml LB-Ampicillin-Übernacht-Kultur (16 Stunden) vermehrt. Die Plasmid-Präparation erfolgte mit dem NucleoSpin®Plasmid QuickPure-Kit der Firma Macherey-Nagel, gemäß dem Protokoll des Herstellers. Wurden größere Mengen des Plasmids benötigt, wurde das Qiafilter Plasmid Midi Kit der Firma Quiagen, gemäß dem Protokoll des Herstellers, verwendet.

### **7.2.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA/RNA wurde bestimmt durch das Messen der optischen Dichte bei 260/280/230 nm am Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer.

### **7.2.5 Synthese einzelsträngiger cDNA**

Es wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas unter Gebrauch des Protokolls des Herstellers verwendet. Für die reverse Transkription wurde der Not I  $(\text{dt})_{18}$  Primer verwendet.

### 7.2.6 Synthese doppelsträngiger cDNA

Zur Synthese doppelsträngiger cDNA wurde das SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit von invitrogen™ nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Um eine 3`- bzw. eine 5`-RACE-PCR zur Isolation des gesamten offenen Leserahmens (ORF) eines Gens durchzuführen, wurde zunächst doppelsträngige cDNA hergestellt. Sie wurde dann in der Splinkeretten-PCR verwendet, um die Transkripte von 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_4359 (homolog zu BMP), 3\_aurelia\_rc\_finalASM\_12850 (homolog zu nanos) und 02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_4675 (homolog zu sox2) zu vervollständigen.

### 7.2.7 Splinkerettensynthese und –ligation

Jeweils 50 µl des Splinkeretten Top-, bzw. Splinkeretten Bottom-Primers (100 pmol/µl) wurden zu doppelsträngigen Splinkeretten-Adaptoren (50 pmol/µl) hybridisiert, indem der Ansatz 1 min bei 95 °C inkubiert und dann langsam abgekühlt wurde.

Die Splinkeretten wurden über die „blunt ends“ an die doppelsträngige cDNA von Polyp, Strobila und Ephyra oder an die jeweils mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV, FspI, HindII und XbaI geschnittene gDNA von Medusen ligiert. Hierfür wurde folgender 20µl Ansatz über Nacht bei 16-18 °C inkubiert:

10 µl ds cDNA (Produkt von 1 µg mRNA)

2 µl ds Splinkeretten-Adaptor (50 pmol/µl)

2 µl T4 DNA Ligase Puffer

1 µl T4 DNA Ligase

5 µl Millipore H<sub>2</sub>O

Anschließend wurden nicht ligierte Splinkeretten, mit Hilfe einer YM-50 Microcon-Säule von Millipore, nach Angaben des Herstellers aus dem Ligations-Ansatz entfernt.

### 7.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

#### 7.3.1 Standard-PCR

Für einen 25µl Standard-PCR Ansatz wurden folgende Komponenten zusammengesetzt:

2,5 µl 10 × PCR-Puffer

1 µl cDNA (1:25 verdünnt) / 1 µl gDNA (80 µg/µl)

1 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)

1 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)

0,5 µl dNTPs (jeweils 10 mM)

0,1 µl DNA-Polymerase

18,9 µl Millipore H<sub>2</sub>O

Die Annealing-Temperatur wurde mit  $T_a = T_m$  (MWG Biotech) minus einem Grad Celsius festgelegt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Standard-PCR-Programm: 2 min, 94 °C,

bis zu 40 X (30 s, 94 °C; 30 s,  $T_a = (T_m - 1 \text{ °C})$ ; 1 min/kb, 72 °C),

5 min, 72 °C

Für die Splinkeretten-PCR wurde die „hot start“ Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) verwendet, um die Spezifität und die Ausbeute zu erhöhen.

### 7.3.2 PCR zur Reamplifikation spezifischer Produkte

Im Falle von schwachen Amplifikaten wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und durch Reamplifikation angereichert, um genügend Produkt zur Klonierung vorliegen zu haben. Hierfür wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in 200 µl Millipore H<sub>2</sub>O zerstoßen. Die Suspension wurde für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der, das Amplifikat enthaltende, Überstand diente dann als Matrize 1 µl für einen erneuten PCR-Ansatz. Es wurde weiter verfahren wie in K. 7.3.1.

### 7.3.3 Splinkeretten-PCR

Die Splinkeretten-PCR wurde benutzt um unbekannt genomsche Sequenzen *up-* oder *downstream* bekannter Sequenzen zu amplifizieren. Dies war der Fall für die Gene *tubulin* CL2Contig1 rev (Planula EST), *aktin* CL1Contig2 (Planula EST), *aktin* aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21, *ubiquitin* CL18contig1 (Planula EST), *histon* 3CL200Contig1 (Planula EST) und EF1 aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_45 (bs Polyp Transkriptom). Für sie standen jeweils vier unterschiedlich geschnittene gDNA-Präparationen zur Verfügung (K. 7.2.7). Für die Vervollständigung der cDNA Transkripte wurde ebenfalls die Splinkeretten-PCR (RACE) verwendet. Für die Gene 03\_aurelia\_rc\_finalASM\_4359 (homolog zu BMP), 3\_aurelia\_rc\_finalASM\_12850 (homolog zu *nanos*) und 02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_4675 (homolog zu *sox2*) stand eine doppelsträngige cDNA Präparation zur Verfügung (K. 7.2.7). Dafür wurde an die gDNA, oder an die cDNA Splinkeretten, ein spezieller Typ der Vektoretten (Devon *et al.*, 1995) ligiert (K. 7.2.7). Der obere Strang der Splinkerette bestand aus 5'- CGAATCGTAA CCGTTCGTAC GAGAATTCGT ACGAGAATCG CTGTCCTCTC CAACGAGCCA AGG- 3', der untere Strang war nach den verwendeten Restriktionsenzymen für gDNA modifiziert, oder *blunt end* für cDNA. Es wurden innere sowie ein äußerer Splinkeretten-, bzw. spezifische innere sowie ein äußerer Primer, für die erste und zweite PCR verwendet. Es wurden drei verschiedener PCR-Techniken, die „Nested“-, „Hot Start“- sowie die „Touch Down“-PCR, kombiniert. Zur Steigerung der Produktspezifität wurden zwei aufeinander folgende Amplifikationen durchgeführt („nested“-PCR). In der ersten PCR wurden die

äußeren Transkript- bzw. Splinkeretten-spezifischen Primer verwendet. Das Produkt dieser PCR wurde anschließend 1:100 verdünnt in  $d_0H_2O$  und als Matrize für eine weitere Amplifikation mit den jeweils inneren Primern eingesetzt. Die PCR-Techniken wurden unter der Verwendung der Platinum *Taq* Polymerase (Invitrogen) wie folgt durchgeführt:

### Erste PCR:

Touch-Down-PCR:	2 min, 94 °C
3 x 7 Zyklen:	30 s, 94 °C
	30 s, $T_A = (T_m - 1 \text{ °C}) + 6 - 1 \text{ °C}$ je Zyklus
	2:30 min, 72 °C
1 x 20 Zyklen:	30 s, 94 °C
	30 s, $T_A = (T_m - 1 \text{ °C})$
	3 min, 72 °C
	5 min, 72 °C

### Zweite PCR:

Touch-Down-PCR:	2 min, 94 °C
3 x 7 Zyklen:	30 s, 94 °C
	30 s, $T_A = (T_m - 1 \text{ °C}) + 6 - 1 \text{ °C}$ je Zyklus
	2:30 min, 72 °C
1 x 20 Zyklen	30 s, 94 °C
	30 s, $T_A = (T_m - 1 \text{ °C})$
	3 min, 72 °C
	5 min, 72 °C

Spezifische Produkte wurden in je drei Ansätzen reamplifiziert (K. 7.3.2): nur Vorwärts-Primer, nur Rückwärts-Primer und beide Primer zusammen. Spezifische PCR-Amplifikate wurden in den pGEM-T Vektor ligiert und sequenziert.

### 7.3.4 Insert-Check-PCR

Um zu überprüfen, ob sich das gewünschte Insert im Vektor befindet, wurden Klone selektiert und in einen 10 µl PCR-Ansatz als Template hinzugefügt. Diese Klone wurden zusätzlich auf einer neuen LB-Amp-Platte (0,1 % Ampicillin) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Es wurden für den pGEM-T-Vektor spezifische SP6- und T7-Primer und das Programm aus K. 7.3.1 mit 35 Zyklen verwendet.

### 7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die DNA-Moleküle gemäß ihrer unterschiedlichen Größe aufzutrennen, wurden Gele mit einer Konzentration von 0,8-1,2 % Agarose in 1 x TAE-Puffer gegossen, denen 100 mg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Als Marker dienten 3-6 µl des GeneRuler DNA-Ladder Mixes. Die Elektrophorese wurde je nach Größe des Gels bei 80-120 V durchgeführt.

#### 7.4.1 Aufreinigung und Exktraktion von PCR-Amplifikaten

Für die Extraktion von Amplifikaten aus Agarose-Gelen wurde das NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 7.5 Elektrokompente Zellen

Für die Präparation von elektrokompenten Zellen wurde ein einzelner *E. coli* Klon über Nacht in 50 ml SOB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde verwendet, sobald die OD<sub>600</sub> bei 1-1,2 lag. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 Minuten pelletiert. Sie wurden in 50 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, zentrifugiert, und dann in 25 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 10 %iges Glycerin überführt und als 40 µl Aliquots bei – 80 °C tiefgefroren.

## 7.6 Klonierung

Die Ligation erfolgte mit dem pGEM®-T Vector System von Promega in 5 µl Gesamtvolumen nach Herstellerangaben. Zur Vermehrung des in den Vektor ligierten Inserts, wurden Bakterien mit diesem transformiert. Die Transformation der elektrokompenten *E. coli* des Stammes DH5α-E, erfolgte durch Elektroporation. Je 1 µl des Ligationsansatzes wurde zusammen mit 50 µl Bakteriensuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 1 mm überführt, welche zuvor mit 70 %igem Ethanol und Millipore-H<sub>2</sub>O sowie durch eine 15-minütige UV-Bestrahlung gereinigt worden war. Die Elektroporation fand bei einer Spannung von 1,8 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 nF statt. Anschließend wurden die Bakterienzellen in 500 µl SOC-Medium aufgenommen und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden auf einer LB-Amp<sup>+</sup>-Platte (0,1 % Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 7.7 Lagerung von Bakterien-Kulturen

500 µl einer Bakterien-Kultur wurden in 500 µl steriles 50 %iges Glycerin überführt und bei -80 °C gelagert.

## 7.8 Sequenzierung von DNA und mRNA

### 7.8.1 454-Sequenzierung des Transkriptoms

Für die Sequenzierung des Transkriptoms wurden Polypen, Strobilae mit verschiedenen Reifegraden und 1 bis 96 Stunden alte Ephyren, der ubiquitären Population Roscoff, verwendet. Zudem wurde das Transkriptom von Polypen, der borealen Population Ostsee, sequenziert.

Die Extraktion von mRNA wurde mit dem illustra™ QuickPrep Micro mRNA Purification Kit von GE Healthcare nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 3-4

Polypen, 5 Strobilae oder 10 Ephyrae je Extraktionsansatz verwendet. Die Tiere wurden 48 Stunden vor der Extraktion nicht mehr gefüttert.

Die Synthese von mRNA zu cDNA, sowie die Sequenzierung mit dem Roche Genome Sequencer FLX System, wurde im Labor von Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel durchgeführt.

### 7.8.2 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde mit dem Li-COR 4300 Platten-Sequenzier-Gerät durchgeführt. Für die Sequenzierungs-Reaktion wurde das SequiTherm™EXCEL II DNA-Sequencing Kit (41 cm) der Firma Epicentre Biotechnologies nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Polyacrylamid-Gel enthielt 14 ml H<sub>2</sub>O, 3,75 ml 40 % Rapid Gel XL solution, 2,5 ml 10 x TBE Puffer, 10,5 g Urea, 38 µl TEMED und 175 µl Ammoniumpersulfat. Als Puffer wurde 1 x TBE verwendet. Die verwendeten Primer waren 5'-IRD700- oder 5'-IRD800-markiert. Die Auswertung der Basen und die Qualitätsüberprüfung erfolgte mit der e-Seq 3.0 Software.

## 7.9 Generierung transgener *Aurelia aurita*

### 7.9.1 Konstrukte

Die amplifizierten, potentiellen Promotoren der Gene *aktin*, *EF1*, *tubulin*, *ubiquitin* und *histon 3* mit einer Länge von 744 bis 1641 Basenpaaren, sowie die amplifizierten potentiellen Terminatoren der Gene *Aktin* und *tubulin*, mit einer Länge von 576 bis 1439 Basenpaaren wurden über Restriktionsschnittstellen in Pgem-T Backbone Plasmide (P1-13) (Promega) in Einzel- oder Doppel-Konstrukte ligiert (Abb. 2.15; siehe auch Anhang 9.2, 9.3). Zusätzlich diente ein pMiLRneo Backbone Vektor mit flankierenden *inverted terminal repeats* (ITRs) als Grundlage für ein weiteres Konstrukt (P14) (Abb. 2.15).



### 7.9.2 Injektionsabfolge und Injektionstechnik

In der ersten Saison wurden abwechselnd die Konstrukte P1-7 (Abb. 2.15) in Konzentrationen von 0,5-3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in insgesamt 1388 Embryonen injiziert (Anhang 9.5 Tab. 9.3). In der zweiten Saison wurden abwechselnd die Vektoren P7-14 (Abb. 2.15) mit einer einheitlichen Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in insgesamt 3342 Embryonen injiziert (Anhang 9.5 Tab. 9.3). Die Injektionen 49-52 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) mit dem Vektor P14, der über ein Transposon verfügt, welches das Reporterkonstrukt beinhaltet, enthielten zudem 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  GFP mRNA und 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  *Minos* Transposase mRNA. Für die Injektionen 39-44 und 47 (Anhang 9.5 Tab. 9.3) wurden mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisierte Vektoren eingesetzt. Die Injektionen 40-41, 43-44 und 47 enthielten zudem 100-180  $\text{ng}/\mu\text{l}$  gDNA, die ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *NotI* geschnitten worden war.

Für die Injektion wurden Embryonen aus den Mundarmen der Meduse mit einer Glaspipette entnommen. Nach dem Aufreinigen wurden sie bis zur Injektion in 10 °C kaltes Seewasser überführt. Die Mikroinjektion erfolgte mit einem invertierten Mikroskop (Zeiss Axiovert 100) und zwei Mikromanipulatoren (5171 Eppendorf und Injectman NL2). Die Haltekapillare für die Embryonen hatte einen Außendurchmesser von 140  $\mu\text{m}$ , der Innendurchmesser lag bei 60  $\mu\text{m}$  (Eppendorf). Die Injektionsnadel wurde mit dem Vertical Pipette Puller 700 C hergestellt. Für die Injektion wurde der Eppendorf Femtojet Microinjektor verwendet. Um ein Überleben der Embryonen zu gewährleisten, durfte das Injektionsvolumen des Injektionsansatzes ein Zehntel des Volumens des Embryos nicht überschreiten. Die Injektion war abgeschlossen, sobald durch den einströmenden Injektionsansatz eine Veränderung im Embryo zu erkennen war. Wurden bei der Injektion nicht beide Membranen der Zygote mit der Injektionsnadel durchstoßen, konnte sich der Injektionsansatz dazwischen verteilen. Das, und eine zu große injizierte Menge an Flüssigkeit, führten zu einer Abschnürung des betroffenen Teils der Blastula oder zum Tod des Embryos.

### **7.9.3 Elektroporation von *Aurelia aurita***

Je Elektroporationsansatz wurden 15 Tiere zweimal für je 1 Minute in einem großen Volumen mit 0,77 M Mannitol gewaschen. Dann wurden die Tiere in Elektroporationsküvetten mit einem Durchmesser von 0,4 mm überführt und das Volumen auf 200 µl reduziert. Dem Medium wurden 100 µg/µl Reporter-Konstrukt oder Salmon Sperm DNA (Kontrolle) zugesetzt. Zusätzlich enthielt der Ansatz 10 µl 10 % RITC als Penetrations-Marker. Die Einstellungen des Pulse Controller II waren 200 Ω, 50 µF und 200 V. Nach zweimaliger Elektroporation wurden die Tiere anschließend in kaltes ASW überführt. Die Tiere wurden 24 Stunden bei 10 °C gelagert, dann wurde das Medium gewechselt. Nach der Behandlung sollte ungefähr die Hälfte der elektroporierten Tiere stark zerstört sein.

## **7.10 Expressionsanalyse mit der *whole mount in situ* Hybridisierung**

### **7.10.1 Präparation der DIG-markierten Sonden**

Aus dem Gel aufgereinigte Amplifikate wurden als Matrix für die Sonden-Herstellung verwendet. Die Synthese der markierten Sonden (siehe Anhang 9.1) erfolgte mit dem DIG RNA Labelling Kit (SP6/T7) von Roche nach Angaben des Herstellers.

### **7.10.2 *Whole mount in situ* Hybridisierung**

Alle Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT unter moderater Bewegung auf einem Schüttler durchgeführt. Alle verwendeten Lebensstadien bekamen 48 Stunden vor der Fixierung keine Nahrung mehr zugeführt.

Die Tiere wurden in 2 % (w/v) Urethan in ASW auf Eis für 5 Minuten relaxiert und anschließend in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) über Nacht fixiert. Die fixierten Lebensstadien wurden dreimal in 100 % Methanol gewaschen und konnten gegebenenfalls in Methanol bei -80 °C gelagert werden. Für die weitere Verwendung wurden die Tiere schrittweise je 10 Minuten rehydriert (100 % EtOH, 75 % EtOH/25 %

PBT, 50 % EtOH/50 % PBT, 25 % EtOH/75 % PBT, 100 % PBT) und anschließend einmal für 10 Minuten in PBT gewaschen. Um unspezifische Färbungen zu reduzieren, wurden die Tiere für 1 Stunde in 3 %igem (v/v) Wasserstoffperoxid in PBT inkubiert. Daraufhin wurden die Tiere 3 x 10 Minuten in PBT gewaschen und dann mit 1 µg/ml Proteinase K für 20 Minuten behandelt. Der Verdau wurde durch Spülen mit 4 mg/ml Glycine/PBT Lösung gestoppt, woraufhin ein weiteres Mal mit 4 mg/ml Glycine/PBT Lösung für 10 Minuten gewaschen wurde. Nun wurden die Tiere 3 x 10 Minuten in PBT gewaschen und anschließend 3 x 10 Minuten mit 0,1 M Triethanolamin (pH 7,8) behandelt. Im letzten Schritt wurden dem Triethanolamin zu Beginn 2,5 µl/ml Essigsäureanhydrid und nach 5 Minuten weitere 2,5 µl/ml Essigsäureanhydrid zugesetzt. Im Anschluss wurden die Tiere 3 x 10 Minuten in PBT gewaschen und über Nacht in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBT postfixiert.

Am nächsten Tag wurden die Tiere 3 x 10 Minuten in PBT gewaschen und anschließend in 2 x SSC für 2 x 10 Minuten überführt. Es folgte eine Hitzebehandlung im Wasserbad von 20 Minuten bei 70 °C, um endogene alkalische Phosphatasen zu inaktivieren. Daraufhin wurden die Tiere für 10 Minuten in 50 % Hybridisierungslösung (HS)/50 % 2 x SSC und dann für 10 Minuten in HS überführt. Anschließend wurden die Tiere für 2 Stunden in HS, die zusätzlich 0,5 µg/ml doppelsträngige-RNA und 0,4 mg/ml transfer-RNA zum Blockieren möglicher unspezifischer Bindestellen enthielt, bei 57 °C pre-hybridisiert. Die HS wurde gewechselt und enthielt ebenfalls 0,5 µg/ml doppelsträngige RNA und 0,4 mg/ml transfer-RNA. Die DIG-markierten Sonden wurden in 50 µl Sonden-HS (25 % Formamid, 25 % 20 x SSC und 50 % ddH<sub>2</sub>O) für 5 Minuten bei 70 °C denaturiert. Im Anschluss wurden die DIG-markierten Sonden den pre-hybridisierten Tieren zugegeben, wobei die finale Verdünnung der Sonden bei 1:25.000 lag. Nun wurden die Lebensstadien für 96 Stunden bei 57 °C hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Tiere einer Serie von Waschschrritten bei 57 °C unterzogen (100 % HS, 75 % HS/25 % 2 x SSC, 50 % HS/50 % 2 x SSC, 25 % HS/75 % 2 x SSC), dann wurden sie für 2 x 30 Minuten mit 0,1 % (w/v) CHAPS in 2 x SSC bei 57 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Tiere 2 x 10 Minuten in MAB-T bei RT gewaschen und dann für eine Stunde in MAB-B blockiert. Dann wurde das Medium gegen 80 % MAB-B/20 % hitzeinaktiviertes Schafserum getauscht und die Lebensstadien für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Der Anti-DIG-Antikörper mit konjugierter AP wurde für 24

Stunden bei 4 °C in 1 ml MAB-B mit zerstoßenen Lebensstadien von *Aurelia aurita* präinkubiert. Vor der Zugabe zu den Tieren wurde er für 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in 80 % MAB-B/20 % hitzeinaktiviertes Schafserum überführt. Dann wurden die Ansätze über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Verdünnung des Anti-DIG-Antikörper-AP lag bei 1:1600.

Ungebundene Antikörper wurde durch Waschen in MAB-T für 9 x 20 Minuten entfernt. Dann wurden die Tiere 5 Minuten in NTMT, 5 Minuten in NTMT/0,1 mM Levamisol und anschließend in NTMT mit NBT/BCIP (1:50) im Dunkeln inkubiert. Die Färbereaktion wurde nach einem ausreichenden Signal durch Waschen in ddH<sub>2</sub>O für 3 x 1 Minute gestoppt. Die Tiere wurden anschließend über Nacht in 70 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden sie für je 1 Minute in 100 % Ethanol, 100 % Methanol, 1-Butanol und Xylol überführt und schließlich auf einem Objektträger mit Eukitt eingebettet.

### **7.10.3 Präparation doppelsträngiger RNA**

Für die Präparation doppelsträngiger RNA wurde das MEGAscript RNAi Kit von Ambicon nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Template für die Synthese diente ein GFP-kodierendes Insert eines Vektors.

## **7.11 Mikroarray**

### **7.11.1 mRNA-Extraktion**

Die Extraktion von mRNA erfolgte wie in K. 7.2.1 beschrieben. Die einzelnen Stadien sind in K. 2.4.1 aufgezählt.

### **7.11.2 Mikroarray-Erstellung und -Hybridisierung**

Mit der Erstellung des Mikroarrays wurde die Firma Agilent Technologies Deutschland GmbH beauftragt. Das verwendete Transkriptom für die Erstellung der Sonden war

aurelia\_celera\_v02. Die Synthese der cDNA aus der mRNA der verschiedenen Lebensstadien, sowie die Hybridisierung des Mikroarrays, wurde im Labor von Dr. Tomislav Domazet-Lošo im MPI, Plön, Deutschland durchgeführt.

### **7.12 Histologische Methoden**

#### **7.12.1 Vorbereitung von Polypen für das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM)**

Das KLSM diente dazu, die Lokalisation der GFP-Fluoreszenz im Polypen zu untersuchen. Als Vorbereitung wurden mehrere Tiere zur Relaxierung für ca. 3-5 min mit 2 % Urethan in 30 ‰ Seewasser behandelt und über Nacht bei 4 °C mit 4 % PFA in 1 x PBS fixiert. Nachdem die Polypen 3 x 10 min mit PBS gewaschen worden waren, folgte eine einstündige Behandlung mit Phalloidin (1:1000 in Millipore H<sub>2</sub>O), einem F-Aktin bindenden Protein, und eine 10-minütige Inkubation in Hoechst (1:500 in Millipore H<sub>2</sub>O), welches in die große Furche der DNA-Doppelhelix interkaliert wurde. Anschließend wurden die Polypen mehrmals mit PBS gewaschen und zur Betrachtung unter dem KLSM mit einem Skalpell quer in mehrere Scheiben geschnitten.

Es wurden auch lebende, nicht fixierte Polypen mit dem KLSM betrachtet, diese wurden zuvor für 10 Minuten in Hoechst (1:500 in ASW) inkubiert, 2 x 10 Minuten in ASW gewaschen und dann mit einem Skalpell quer in mehrere Scheiben geschnitten.

#### **7.12.2 Immunmarkierung für das KLSM**

Alle Schritte wurden in 2 ml Schälchen auf einem Schüttler durchgeführt. Als Vorbereitung wurden mehrere Tiere zur Relaxierung für ca. 3-5 min mit 2 % Urethan in 30 ‰ Seewasser behandelt und über Nacht bei 4 °C mit 4 % PFA in 1 x PBS fixiert. Die Polypen wurden 3 x 10 min mit PBT gewaschen, dann 1 x 30 Minuten mit 0,5 % (v/v) TritonX100 in PBS behandelt. Anschließend wurden sie in 1 % (w/v) BSA in PBT für eine Stunde inkubiert. Dann wurden sie über Nacht mit dem Anti-GFP-Rabbit-IgG Antikörper (1:500 in 1 % (w/v) BSA in PBT) inkubiert. Nach vier 15-minütigen Waschschritten in 1 % (w/v) BSA in PBT, wurden die Tiere mit dem sekundären 1:500

Antikörper Anti-Rabbit-Ziege-IgG-Alexa in 1 % (w/v) BSA in PBT für zwei Stunden inkubiert. Es folgten 4 x 15 min Waschen, gefolgt von einer Phalloidin-Behandlung (1:1.000 in 1 % (w/v) BSA und 0,5 % (v/v) TritonX100 in PBT). Nach dreimal 10-minütigem Waschen folgte eine Behandlung in Hoechst (1:500 in 1 % (w/v) BSA in PBT). Die Tiere wurden eingebettet in Fluoromount G und am folgenden Tag am KLSM betrachtet.

## 8. Referenzen

- Aerne B, Gröger H, Schuchert P, Spring J, Schmid V (1996) The polyp and its Medusa : a molecular approach \*. *Comparative and General Pharmacology* 60:7- 16.
- Arbeitman MN *et al.* (2002) Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)* 297:2270-5.
- Balcer LJ, Black RE (1991) Budding and strobilation in *Aurelia* (Scyphozoa, Cnidaria): Functional requirement and spatial patterns of nucleic acid synthesis. *Roux's Archives of Developmental Biology* 200:45-50.
- Bender CM, Pao MM, Jones PA Inhibition of DNA Methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine Suppresses the Growth of Human Tumor Cell Lines. *Cell Cycle*:95-101.
- Berking S *et al.* (2005) A newly discovered oxidant defence system and its involvement in the development of *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria): reactive oxygen species and elemental iodine control medusa formation. *The International journal of developmental biology* 49:969-76.
- Bielen H *et al.* (2007) Divergent functions of two ancient Hydra Brachyury paralogues suggest specific roles for their C-terminal domains in tissue fate induction. *Development (Cambridge, England)* 134:4187-97.
- Bosch TC, Anton-Erxleben F, Hemmrich G, Khalturin K (2010) The Hydra polyp: nothing but an active stem cell community. *Development, growth & differentiation* 52:15-25.
- Böhm, A. M. (2009) Zell- und molekularbiologische Untersuchungen in der Ohrenqualle *Aurelia aurita*, Diplomarbeit, AG Bosch
- Brown DD, Cai L (2007) Amphibian metamorphosis. 306:20-33.
- Chapman JA *et al.* (2010) The dynamic genome of Hydra. *Nature* 464.
- Chen J, Wang H, Wang Y (2008) Overexpression of HmgD Causes the Failure of Pupariation in *Drosophila* by Affecting Ecdysone Receptor Pathway. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 133:123-133.
- Collins AG *et al.* (2008) Phylogenetics of Trachylina ( Cnidaria : Hydrozoa ) with new insights on the evolution of some problematical taxa. 88:1673 - 1685.
- Cooray SN, Clark AJ (2010) Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Molecular and cellular endocrinology*.
- Darling JA *et al.* (2005) Rising starlet : the starlet sea anemone , *Nematostella vectensis*. *BioEssays*:211-221.
- Das B *et al.* (2010) Molecular and genetic studies suggest that thyroid hormone receptor is both necessary and sufficient to mediate the developmental effects of thyroid hormone. *General and Comparative Endocrinology*:1-7.
- David CN *et al.* (2008) Evolution of complex structures : minicollagens shape the cnidarian nematocyst. *Trends in genetics*:431-438.
- Dawson MN, Jacobs DK (2001) Molecular Evidence for Cryptic Species of *Aurelia aurita* ( Cnidaria , Scyphozoa ). *October*:92-96.

- Denker E, Manuel M, Leclère L, Guyader HL, Rabet N (2008) Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria). *Digestion* 315:99 - 113.
- Devon RS, Porteous DJ, Brookes AJ (1995) Splinkerettes--improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic acids research* 23:1644-5.
- Dray N et al. (2010) Hedgehog Signaling Regulates Segment Formation in the Annelid *Platynereis*. *Science* 329:339-342.
- Eri R et al. (1999) Hemsps, a novel EGF-like protein, plays a central role in ascidian metamorphosis. *Leukemia* 5818:5809-5818.
- Foret S, Kucharski R, Pittelkow Y, Lockett GA, Maleszka R (2009) Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. *BMC genomics* 10:472.
- Genikhovich G, Kürn U, Hemmrich G, Bosch TC (2006) Discovery of genes expressed in Hydra embryogenesis. *Developmental biology* 289:466-81.
- Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT (2002) CONTROL AND BIOCHEMICAL NATURE OF THE ECDYSTEROIDOGENIC PATHWAY. *North*:883-916.
- Gilbert, S. F. & Singer R. S. (2006) *Developmental Biology*. 8th ed., Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.
- Gilbert, S. F. & Raunio M. A. (1997) *Embryology: Constructing the Organism*, Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.
- Gilchrist G (1937) BUDDING AND LOCOMOTION IN THE SCYPHISTOMAS OF AURLIA.
- Goffin J, Eisenhauer E (2002) DNA methyltransferase inhibitors — state of the art. *Clinical Trials*:1699-1716.
- Goll MG, Anderson R, Stainier DY, Spradling AC, Halpern ME (2009) Transcriptional silencing and reactivation in transgenic zebrafish. *Genetics* 182:747-55.
- González-Estévez C, Momose T, Gehring WJ, Saló E (2003) Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-specific GFP marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:14046-51.
- Harrison, W. F. & Westfall, A. J. (1991) *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 2*, Wiley-Liss, Inc.
- Hand C, Uhlinger RK (1992) The Culture, Sexual and Asexual Reproduction, and Growth of the Sea Anemone *Nematostella vectensis*. *Hand, The*:169-176.
- Hasebe T, Kajita M, Shi Y, Ishizuya-Oka A (2009) Thyroid hormone-upregulated hedgehog interacting protein is involved in larval-to-adult intestinal remodeling by regulating *sonic hedgehog* signaling pathway in *Xenopus laevis*. *October* 237:3006-3015.
- Houliston E, Momose T, Manuel M (2010) *Clytia hemisphaerica*: a jellyfish cousin joins the laboratory. *Trends in genetics*.
- Ishii H, Takagi A (2003) Development time of planula larvae on the oral arms of the scyphomedusa *Aurelia aurita*. *Journal of Plankton Research* 25:10-13.
- Ishizuya-oka A, Takashi H (2008) *Sonic Hedgehog* and Bone Morphogenetic Protein-4 Signaling Pathway Involved in Epithelial Cell Renewal along the Radial Axis of the Intestine. *Digestion* 77:42-47.



- Khalturin K *et al.* (2007) Transgenic stem cells in Hydra reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self-renewal and differentiation. *Developmental Biology* 309:32 - 44.
- Khalturin K *et al.* (2008) A Novel Gene Family Controls Species-Specific Morphological Traits in Hydra. *Scanning* 6.
- Khalturin K, Hemmrich G, Fraune S, Augustin R, Bosch TC More than just orphans : are taxonomically-restricted genes important in evolution ? *Trends in genetics*.
- King-Jones K, Thummel CS (2005) NUCLEAR RECEPTORS — A PERSPECTIVE FROM DROSOPHILA. *Group* 6.
- Kress E, Samarut J, Plateroti M (2009) Molecular and Cellular Endocrinology Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation : Paradox or duality ? *Molecular and Cellular Endocrinology* 313:36-.
- Kroiher M, Siefker B, Berking S (2000) Induction of segmentation in polyps of Aurelia aurita (Scyphozoa, Cnidaria) into medusae and formation of mirror-image medusa anlagen. *The International journal of developmental biology* 44:485-90.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2010) Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. *In Situ* 1827.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics* 9:299-306.
- Lindgens D, Holstein TW, Technau U (2004) Hyzic, the Hydra homolog of the zic/odd-paired gene, is involved in the early specification of the sensory nematocytes. *Development (Cambridge, England)* 131:191-201.
- Marlow HQ, Srivastava M, Matus DQ, Rokhsar D, Martindale MQ (2008) Anatomy and Development of the Nervous System of Nematostella vectensis , an Anthozoan Cnidarian. *Development*.
- Martin JV, Littlefield CL, William EA, Bode HR (1997) Embryogenesis in Hydra. *Cell*:345-363.
- Martinez DE *et al.* (1997) Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra. *Developmental biology* 192:523-36.
- Matveev IV, Shaposhnikova TG, Podgornaya OI (2007) A novel Aurelia aurita protein mesoglein contains DSL and ZP domains. *Peptides* 399:20 - 25.
- Mcfadden CS, Mcfarland MJ, Buss LW (1984) Biology of hydractiniid hydroids. 1. colony ontogeny in hydractinia echinata (flemming). *Biological Bulletin*.
- Meyer E *et al.* (2009) Sequencing and de novo analysis of a coral larval transcriptome using 454 GSFlx. *BMC Genomics* 18:1-18.
- Mochizuki K, Sano H, Kobayashi S, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T (2000) Expression and evolutionary conservation of nanos-related genes in Hydra. *Development Genes and Evolution*:591-602.
- Mochizuki K, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T (2001) Universal occurrence of the vasa -related genes among metazoans and their germline expression in Hydra. *Development Genes and Evolution* 211:299-308.
- Morin X, Daneman R, Zavortink M, Chia W (2001) A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:15050-5.
- Müller W (1964) Experimentelle Untersuchungen über Stockentwicklung, Polypendifferenzierung und Sexualchimären bei Hydractinia Echinata\*. 268:181-268.

- Nakagawa Y, Henrich VC (2009) Arthropod nuclear receptors and their role in molting. *FEBS Journal* 276:6128-6157.
- Nakanishi N, Hartenstein V, Jacobs DK (2009) Development of the rhopalial nervous system in Aurelia sp.1 (Cnidaria, Scyphozoa). *Development genes and evolution* 219:301-17.
- Nakanishi N, Yuan D, Jacobs DK, Hartenstein V (2008) Early development, pattern, and reorganization of the planula nervous system in Aurelia (Cnidaria, Scyphozoa). *Development genes and evolution* 218:511-24.
- Page RB *et al.* (2008) Effect of thyroid hormone concentration on the transcriptional response underlying induced metamorphosis in the Mexican axolotl. *BMC Genomics* 17:1-17.
- Pavlopoulos A, Oehler S, Kapetanaki MG, Savakis C (2007) The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates Anastasios Pavlopoulos. *Genome Biology* 8:1-7.
- Pertea G *et al.* (2003) TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL)- a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics* 19:651-652.
- Plickert G *et al.* (2003) The role of alpha-amidated neuropeptides in hydroid development--LWamides and metamorphosis in Hydractinia echinata. *The International journal of developmental biology* 47:439-50.
- Putnam NH *et al.* (2010) Sea Anemone Genome Reveals Ancestral Eumetazoan Gene Repertoire and Genomic Organization. *Analysis* 86.
- Rebscher N, Volk C, Teo R, Plickert G (2008) The Germ Plasm Component Vasa Allows Tracing of the Interstitial Stem Cells in the Cnidarian Hydractinia echinata. 1736 -1745.
- Renfer E, Amon-hassenzahl A, Steinmetz PR, Technau U (2009) A muscle-specific transgenic reporter line of the sea anemone , Nematostella vectensis. *PNAS*.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4:406-25.
- Sato E *et al.* (2004) SOUL in mouse eyes is a new hexameric heme-binding protein with characteristic optical absorption, resonance Raman spectral, and heme-binding properties. *Biochemistry* 43:14189-98.
- Schroth W, Jarms G, Streit B, Schierwater B (2002) Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly , Aurelia sp. *BMC Evolutionary Biology* 10:1-10.
- Seipel K, Schmid V (2005) Evolution of striated muscle : Jellyfish and the origin of triploblasty. *Developmental Biology* 282:14 - 26.
- Siebert S, Anton-Erxleben F, Bosch TC (2008) Cell type complexity in the basal metazoan Hydra is maintained by both stem cell based mechanisms and transdifferentiation. *Developmental biology* 313:13-24.
- Silverstone M, Tosteson TR, Cutress CE (1977) The Effect of Iodide and Various Initiation of Strobilation Iodocompounds in Aurelia on. *General and Comparative Endocrinology* 13:108-113.
- Sommer DD, Delcher AL, Salzberg SL, Pop M (2007) Minimus: a fast, lightweight genome assembler. *BMC bioinformatics* 8:64.
- Soza-Ried J *et al.* (2010) The transcriptome of the colonial marine hydroid Hydractinia echinata. *FEBS Journal* 277:197-209.
- Spangenberg DB Iodine Induction of Metamorphosis in Aurelia. *Test*:441-449.

- Spindler K *et al.* (2009) Ecdysteroid hormone action. *Cellular and Molecular Life Sciences*:3837-3850.
- Stanton BZ, Peng LF (2010) Small-molecule modulators of the *Sonic Hedgehog* signaling pathway. *Molecular Biosystems*:44-54.
- Strachan, T. & Read, A. P. (2005) Molekulare Humangenetik, 3th ed., Spektrum Verlag
- Storch, V. & Welsch, U. (1999) Kükenthal Zoologisches Praktikum, 23th ed., Spektrum Verlag
- Steinberg SN (1937) The regeneration of whole polyps from ectodermal fragments of scyphistoma larvae of aurelia aurita. *Health (San Francisco)*.
- Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F (2006) Functional Diversity of DNA Methyltransferase Inhibitors in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Research*:2794-2800.
- Thermes V *et al.* (2002) I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mechanisms of development* 118:91-8.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22:4673-80.
- Thomsen S *et al.* (2004) Control of foot differentiation in Hydra : in vitro evidence that the NK-2 homeobox factor CnNK-2 autoregulates its own expression and uses pedibin as target gene. *Mechanisms of Development* 121:195-204.
- Torras R, Yanze N, Schmid V, González-Crespo S (2004) nanos expression at the embryonic posterior pole and the medusa phase in the hydrozoan Podocoryne carnea. *Evolution & development* 6:362-71.
- Urness LD, Thummel CS (1995) Molecular analysis of a steroid-induced regulatory hierarchy: the Drosophila E74A protein directly regulates L71-6 transcription. *The EMBO journal* 14:6239-46.
- Wehner, R. & Gehring, W. (1995) Zoologie, 23th ed., Georg Thieme Verlag
- Westheide, W. & Rieger, R. M. (2007) Spezielle Zoologie, Bd.1, Einzeller und Wirbellose Tiere, 2th ed., Spektrum Verlag
- Winnepenninckx B, Backeljau T, De Wachter R (1993) Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Hydrobiologia*:2610-2610.
- Wittlieb J, Khalturin K, Lohmann JU, Anton-erxleben F, Bosch TC (2006) Transgenic Hydra allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Sciences-New York* 103:6208 - 6211.
- Wolpert, L. (1999) Entwicklungsbiologie, Spektrum Verlag
- Yuan D, Nakanishi N, Jacobs DK, Hartenstein V (2008) Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan Aurelia. *Development Genes and Evolution*:525-539.
- Yizhu, L. (2010) Investigation of the strobilation in the scyphozoan *Aurelia aurita*, Bachelor Thesis, AG Bosch
- Zylka MJ, Reppert SM (1999) Discovery of a putative heme-binding protein family (SOUL/HBP) by two-tissue suppression subtractive hybridization and database searches. *Brain research. Molecular brain research* 74:175-81.

## 9. Anhang

### 9.1 Gene und Sonden der *in situ* Hybridisierung

#### *zebra*

aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_87 rev

```
TTTCGGGGGACTCTCATCACAGCATCGTTGCAGATTGTAAGTTGATCAGCATATAAAACCAACAAAATG
AAGGCCATTTAAGCATCCTTCTCGTCTCCTTTGTCCTGTACGCAAGTGCAGAAGAATTGAGACTCGTCAGAAGA
GACCTCCCAAAAGTTTGCGAAGATGTGCTCGCTCAAGATCTTTGCGTCAAATTAAGAGGAATCGCCCAAGCTTTG
AAACTCCAAATCTCAAAGGTCGATGATGCCATTGTTGATGCTGCCATCAAGGGATTGGTCAGTGCACCAGCTGTA
TACAGCGCAGCTAAGGCTTTCTTGATGAATGAAGTCATTAACAAGAGCTGTGAAGACTTCCTTTCACCCCCTGTT
TGCACCAAACCTTCGTCAGTTGCTGCAGCTTTGAAAATCAAAGCCGAGAAAAGTAGAAGAATTCGTCAAAGCCGCG
ATTGTGCGAGGAATTACCAAGGAACCGCCATTTACGTCAAAGTTGTTGATTCATGAAGAAGGAAGTTTGGAGC
AAAACATGTGTGCGACTTCTTGGCACCACGTGTATGTGACAAGCTGAAGGAAATTCAGCCAAACTCAAGTCAAT
ATTGTAATAATTGAACGAGATGATTGTTTCTGCAGTCGTTGCTGGATACCAAAAACAGAGACGATATCTACAACAAT
GTCATTGTCTTCATGAAGGATGAAGTTCTTTCTACGACCTGTGAAGATCTTCTTTCCGCAGATTACTGTGCCAAG
TTGAAGGCCGTTGCAGCAAAAATTGAAGATCAAAGCAGCTAAGGTCGACCAAGCAGTAAGAGAAGCTATCTTGAAA
GGATACCTCACCACATCTGCAGTTGTCAAGAGTGTCAAGGAATTCTTCGAAAATGAAGTTCTCTCCAAGAAATGC
GAAGACTTCCTTCCCGACTCTGTCTGCACCTCAATCAAGACTATTGCACAGAAGATGAAAAGTGAGAGCTGACTTG
GTTGATAAGGCAGTAAAGGATGCTTTGATCAAGGGATACAGCAAAGTACAAGATCTTAAGGACTACGCCAAAGA
ATATTTGAAGGAAAAACATCAAATGTGAAGATCATCTCTCCTCAATCTCATGCTCCATCATCAGAAGAAGTGCCAA
ATTCCTTGGTGTGAAAATCCAGGAAGCTGAACAGAAGCTCAGAGACTTGGTTGCACAGCAAGTCACTCAAGCTAG
AGAGCTTTACCGACAAGTCATGGCTTTTATCAAAGCCAAAATCCTGGGATAAGAAAATCAATCATGAAAACTTT
TTAATCTGATATTACTTAGCAATGACTGAATTGATATAAAATGATATTTGTGTCGT
```

Klon Zebra (T7-SP6)

```
CCAACAAAATGAAGGCCATTTTAAGCATCCTTCTCGTCTCCTTTGTCCTGTACGCAAGTGCAGAAGAATTGAGAC
TCGTCAGAAGAGACCTCCCAAAAGTTTGCGAAGATGTGCTCGCTCAAGATCTTTGCGTCAAATTAAGAGGAATCG
CCCAAGCTTTGAAACTCCAAATCTCAAAGGTCGATGATGCCATTGTTGATGCTGCCATCAAGGGATTGGTCAGTG
CACCAGCTGTATACAGCGCAGCTAAGGCTTTCTTGATGAATGAAGTCATTAACAAGAGCTGTGAAGACTTCCTTT
CACCCCCTGTTTGCACCAAACCTTCGTCAGTTGCTGCAGCTTTGAAAATCAAAGCCGAGAAAAGTAGAAGAATTGC
TCAAAGCCGCGATTGTGCGGGGAATTACCAAGGAACCGCCATTTACGTCAAAGTTGTTGATTCATGAAGAAGG
AAGTTTTGAGCAAAAACATGTGTGCGACTTCTTGGCACCACGTGTATGTGACAAGCTGAAGGAAATTCAGCCAAAC
TCAAGGTCGATATTGTAATAATTGAACGAGATGATTGTTTCTGCAGTCGTTGCTGGATACCAAAAACAGAGACGATA
TCTACAACAATGTCAATTGTCTTCATGAAGGATGAAGTTCTTTCTACGACCTGTGAAGATCTTCTTTCCGCAGATT
ACTGTGCCAAGTTGAAGGCCGTTGCAGCAAAAATTGAAGATCAAAGCAGCTAAGGTCGACCAAGCAGTAAGAGAAG
CTATCTTGAAGGATACCTCACCACATCTGCAGTTGTCAAGAGTGTCAAGGAATTCTTCGAAAATGAAGTTCTCT
CCAAGAAATGCGAAGACTTCCTTCCCGACTCTGTCTGCACCTCAATCAAGACTATTGCACAGAAGATGAAAGTGA
GAGCTGACTTGGTTGATAAAGGCAGTAAAGGATGCTTTGATCAAGGGATACAGCAAAGTACAAGATCTTAAGGACT
ACGCCAAAAGAAATTTGAAGGAAAAACATCAAATGTGAAGATCATCTCTCCTCCATCTCATGCTCCATCATCAGAA
GAACTGCCAAATTCCTTGGTGTGAAAATCCAGGAAGCTGAACAGAAGCTCAGAGACTTGGTTGCACAGCAAGTCA
CTCAAGCTAGAGAGCTTTACCGACAAGTCATGGCTTTTATCAAAGCCAAAATCCTGGGATAAG
```

#### Minicollagen Cl3407

03\_aurelia\_rc\_finalASM\_3407

```
AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGACTCAACACAACCTTTTCAACACAGGACAGTCGAGGGTCAAGTTT
CCAGACCTTAGAGTTTCGATATTCAAATGATGAGAATAGCAGTTTTTGTGCGGTTGTGCGCCTTGCCCTTGCTG
GCGTACCAAAAACATAAAGATAAGAGATCACCACAAGCTTGTGGACCAGCATGCCCTGCTACATGTGCCACCAGCCT
```

GCGTCCCAGTCTGTTGTGCTCCACCACCACCACCTCCACCACCACCACCACCAGGCCACCAGGCGCACCAGGACCA  
CTCGGACCCCCAGGACCACCAGGACCTAACGGACCACCCGGACCAGGAGGACCACCAGGAGGACCAGGACCCGCTG  
GACCACCCGGACCTGCAGGAGCACCAGCTGGACCACCAGGACCCGCGAGGAGCAGGACCACCTGGACCCCCAGG  
AGGACCAGGACCACAAGGACCAGCTGGACCACCAGGACCTCCAGGACCACCAGGACGCCAGGACCCCCAGCTCCA  
CCACCACCACCACCACATGCCAGCTGTTTGGCTTGACAGTGTGTGCCATCATGCCACCACCATGCTGCCCCCA  
GAAGCACTAAATGTGTTCTTAATAGGAACTTTTATATAATGATGAACACTTTCCTGACTTTGAAAGTTTTGAGAG  
GAAATTCATTAGAAATGAAGTAAACGAATGGATTTAGTAACATCTATTATCCAGGATTATTAATTGGAATCATT  
TGTGTAAGATGGAGAATGCATACAGTTTTATATAAACATTTGACAAATATATCTCTGAGTGTTCCTCCCTGCGA  
TTATATAAATATGGGAGACG

Klon MC3407 (SP6-T7)

GTTTCGATATTTCAAATGATGAGAATAGCAGTTTTTGTATGCCGTTGTGCGCCTTGCCCTTGCTGGCGTACAAAAAC  
ATAAAGATAAGAGATCACCACAAGCTTGTGGACCAGCATGCCCTGCTACATGTGCACCAGCCTGCGTCCCAGTCTG  
TTGTGCTCCACCACCACCCTCCACCACCACCACCAGGCCACCAGGCGCACCAGGACCACTCGGACCCCCAG  
GACCACCAGGACCTAACGGACCACCCGGACCAGGAGGACCACCAGGAGGACCAGGACCCGCTGGACCACCCGGACC  
TGCAGGAGCACCAGCTGGACCACCAGGACCCGCGAGGAGGAGCAGGACCACTT

### Minicollagen CL1764

01\_aurelia\_rc\_strobila\_run090409\_1764 rev

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGTCCGGGGTATTTTGTATTTCTAGGGATCAGTAACTGAAACAAGATGAAGCT  
CCAGATCTTCGTAGCACTCTGCGTTGTAGCAGCTGTTAGCAGCAGAACCGTCCAAAGAAGTGGTTCAAAGAGGCA  
ATTTGTGCCAAATGCTTGCCAGCCACGTGTGCACCAGCATGTCTTCCAGTCTGTTGTGCACCAGCTCCACCACCA  
CCTCCACCACCTCCACCAGGCCACCAGGCCGACCAGGACCACTTGGACCAGGAGGACCACCAGGACCTAACGGAC  
CACCCGGACCAGGAGGCCACCAGGAGGACCAGGACCTGCTGGACCACCCGGACCTCCAGGAGCACCAGCTGGACC  
ACCAGGACCCGCGAGGAGGCGCTGGACCCTTGGACCCCCAGGAGGACCAGGACCACAAGGACCACCCGGACCACCA  
GGACCTCCAGGACCACCAGGACGCCAGGACCCCCAGCTCCACCACCACCACCACCACCATGCCAGTCATCTGCCA  
AACCGTCTGCACACCAGCATGTCTCCATCTTGCCCATGACAAAAAAGAGAAAGTAAACTCGACGCAATTCGATC  
TC

Klon MC1764 (SP6-T7)

ATGAAGCTCCAGATCTTCGTAGCACTCTGCGTTGTAGCAGCTGTTAGCAGCAGAACCGTCCAAAGAAGTGGTTCA  
AAGAGGCAATTTGTGCCAAATGCTTGCCAGCCACGTGTGCACCAGCATGTCTTCCAGTCTGTTGTGCACCAGCTC  
CACCACCACCTCCACCCTCCACCAGGCCACCAGGCCGACCAGGACCACTTGGACCAGGAGGACCACCAGGACC  
TAACGGACCACCCGGACCAGGAGGGCCACCAGGAGGACCAGGACCTGCTGGACCACCCGGACCTCCAGGAGCACCA  
GCTGGACCACCAGGACCCGCGAGGAGGTGCAGGACCACTTGGACCCCCAGGAGGACCAGGACCACAAGGACCAGCCG  
GACCACCAGGACCTCCAGGACCACCAGGACGCCAGGACCCCCAGCTCCACCACCACCACCACCACCATGCCAGTC  
ATCTGCCAAACCGTCTGCACACCAGCATGTCTCCATCTTGCCCATGA

### Minicollagen Cl1900

03\_aurelia\_rc\_finalASM\_1900 rev

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGTCCGGGACTCTAATAACGCAACACGCACGGAGAAGACGTTTTGCCTAGAG  
ACTTTACACCAAGGGCAACTAGTAAAGATGCGAAAAGTTAGGATTATATTATGCCTCTTGGCAGTGATCGTATAC  
ATTGAGGCAAGAACGACACATAAAGGCAAGCATCAAAAACGTCAAGCAGGTTGCGGAGCAACATGCCCTGGGGTC  
TGTGCTCCTGCATGTCTTCCAACATGTTGCGCAGCTCCACCTCACCCGGACCCCCAGGACCAGCCGGACCACCAG  
GAAACCAAGGACCAGTAGGACTTAACGGACCACCAGGTCTTCCAGGACCTCCAGGTCTCCAGGACCACCAGGCC  
ACCAGGACCTCCAGGAGCCCAACAACCACCTCCAGCACCATGCCAAGCCGTCTGCTTCCAACAATGTTACCAACC  
TGCCCATCATACTGCTGCCCTAAACCAGCAGCACCACCACCATGCCACCCTGCTGTGCCTCAACTTGGCACCAG  
TCTGCCACCAGCTTGTGTAAGAGAAAGAGAAGCTACATCCGTCATCACAAGGTGAGAAGCCAATCATCATCA  
TCGAACGAAAGCATTAAATCGGTCAGTCAGGACGCTCAGATGAACTAAAAAGGATGCTTTTGTAAAATACAAC  
CTTGTTCGCGCAGGCAAACATATCTATACAAACAGTTTTTCATAGGACAGAGTATAGTGTGACAAATACGTTAT  
CTATTTTAAACCATGACTGCCAATGTTGGCTAAAGGACTCTTCTTGCAACAGAACGCTAATTTATGATGAAATAT

TATTTATATCGTTATTCATATTTATTGTGAGTGTTAGAATTTGTATCTCCAAAGGGTAAATGTAGAAATCAACAC  
AAAAAGATCTGAAATCAAAGATATTGCACAAAATGTTTAGGATCATGCACAAAATAAGCCAAAAATAAAAAAAT  
CGTAACTTCAGCAGTTGCCTGTCGTTTGTAAAGCCGCTCGATAAAACTCATTTTTGAGGAAAAGTGTAGATTTCTACA  
TTTCAATAACATATGAAATCAGACATGAACAAGACATCGTATAACTTGCTTTAAAATTCTAACATCCTCTAGTAG  
TTATTTTCATTTAGAAAATTAATTTATCTGTTTCTTAGAAC

Klon Mc1900 (SP6-T7)

GATGCGAAAAGTTAGGATTATATTATGCCTCTTGGCAGTGATCGTATACATTGAGGCAAGAACGACACATAAAGG  
CAAGCATCAAAAACGTCAAGCAGGTTGCGGAGCAACATGCCCTGGGGTCTGTGCTCCTGCATGTCTTCCAACATG  
TTGCGCAGCTCCACCTCCACCCGACCCCGAGGACCAGCCGACCAGGAAACCAAGGACCAGTAGGACTTAAAC  
GGACCACCAGGTCTTCCAGGACCTCCAGGTCTCCAGGACCACCAGGCCACCAGGACCTCCAGGAGCCCAACAAC  
CACCTCCAGCACCATGCCAAGCCGTCTGCTTCCAACAATGTTACCCAACCTGCCATCATACTGCTGCCCTAAACC  
AGCAGCACCACCACATGCCACCCGTCTGTGCCCTCAACTTGCGCACCAGTCTGCCACCAGCTTGTGTAAAGAGA  
AAGAGAAGCTACATCCGTCATCACAAGGTGAGAAGCCAATCATCATCATCGAACGAAAG

### Minicollagen Cl7145

03\_aurelia\_rc\_finalASM\_7145

CATGGTGGTGGTGGTGGTGGCTGTCCAGGAGGTCCACCAGGGCCAGGTCCACCTGGTGGTCCAGGAGGTCCACCAG  
GTGGACCTGGCCCTGGTGGACCTCCTGGACCTCCTGCCCCACCTGCACCTCCTGGCCAGGTGGACCTCCTGGTGGC  
CCTGGACCTCTAGGACCCCTGGACCTCTTGGACCCCGAGGACCTCCTGGTGGCCCTGGACAGCCTGGACCACCTG  
GACCTCCAGCCCTCCCGCTCCTCCTGGACCAAAAAGGACCAAAATGGTGGACAAGGACCAATTGGGACCTCCTGGACC  
ACCTGGACCACCTGGACCACCTGGCCCTACCTGGAATTGGCGGACCTCCTGGACAGCCAGCACCACCACCACCA  
TGCCCGCCGATCTGTCCAACGCAATGTATAGCATCATGTCCAATCTATTGTTGTCCAGCGAAGAGACGAAGAAAG  
TAGAAATTCGAAGAATCACGAAGCAGTTGATGCTGCATGGCGAAACCAACAGACGATTGATTGAACTTTAACGC  
ACACAGACTTGATGACGACTCGCTCTAGAGAATATCAGTGCATTTATGGACACTTCTTGGCAGGAATTAACATAAT  
AGGCTTTTTTATAGACGATGTGCCACAGCAGATAAAATTATTCGACACGAGCCAGAACTTATGCTTCAATAGACAG  
ACTTTTATTTACTAACGTTTAGTATAGTAGCTGGCTCAAGATAGTTGTTATGTAGTGACTTCAACTTTAATGATC  
GAAACTTCACAGCATTTTCTAAAAATGTTTTCAACGTAACCATCTTCTAGAGATCGTTCAGTTAGCACATTTGAG  
CTCAATTAGAATTTTGCAATGGCAGCAATAGCAAACTTTGAACATTTATCGATAAAAATGAAAGGTAATATATC  
AATATAAACGGAGTGAGGGATTCTACGGTGTATAAGCCCTTGCCCTCAAATGTGCTTTGACATTTAATCGACGA  
TGCTGTGTAGTTGAAATTAGGCCCTCCTCAGTCTTTTCATTCTCTTGTAAAGGTTAATATTGTAAGACTTTCTCATC  
CATTGACATAGCATTAATGTGTTGTTATGATCACAATGTTGTAACCTAAA

Klon Mc7145 (T7-SP6)

TCTGTCCAACGCAATGTATAGCATCATGTCCAATCTATTGTTGTCCAGCGAAGAGACGAAGAAAAGTAGAAATTCG  
AAGAATCACGAAGCAGTTGATGCTGCATGGCGAAACCAACAGGCGATTGATTGAACTTTAACGCACACAGACTT  
GATGACGACTCGCTCTAGAGAATATCAGTGCATTTATGGACACTTCTTGGCAGGAATTAACATAATAGGCTTTTTT  
ATAGACGATGTGCCACAGCAGATAAAATTATTCGACACGAGCCAGAACTTATGCTTCAATAGACAGACTTTATTT  
ACTAACGTTTAGTATAGTAGCTGGCTCAAGATAGTTGTTATGTAGTGACTTCAACTTTAATGATCGAAACTTCAC  
AGCATTTTCTAAAAATGTTTTCAACGTAACCATCTTCTAGAGATCGTTCAGT

### Minicollagen Cl12648

03\_aurelia\_rc\_finalASM\_12648

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGAGTTGTGTCAATTATTCAGCTTTGGGTGGTCAAAGTTAGCTTCA  
ATCAAAATGGCAACTAACTAGTTATTGCAGTTATTTTATTCTGTGCCGTATCGGCCTACGCTAAACAAGATAAG  
AGAAGTGCTGACAAGAAAAGAAGATCAGCCGGCAAGCGATTCTTCTGTGGCGCAGCTTGTGCACCATCTTGTGCT  
CCAGCATGTGCTCCAACCTGTTGTGCGGCTCCACCCACCACCACCATGCCCAATGCCATGCCACCTCCACCACC  
ACCATGCCACCTCCTTGGCCACCACCACCAATGCCAGGCCACCTGGACCCATTGGACCTCCAGGATGTTGCGGT  
GGACCAGGACCAGTTGGACCCCGAGGTCTCCAGGTGGCCCTGGATGCCCAGGACCAATGGGACCTATGGGACCAA  
TGGGACCAGCCGGATGCCCAGGTGCTCCTGCACCACCAGCAGCCCATGCCCAACATCTGTCTCCATTTCCAAGC  
TCTCCTCCGTCAAGCACCTCCACCAGCACCAGTGTGCCCAACCGTATGTCCACCAACATGTTGTGCCCTCCACCAC

CACCTGCACCAGTCTGTGCTCCATCATGCGCACCAACATGCTGTGGCAAATAAGCTGAAGGAATGGTTCTATATCT  
GATAGATACTTGAAGATACTAAGGTGATGAGGATCGAAAGAAGAACTTCTCTTCGCAGAAGATTGAAATAATT  
TGATCGAACATAGTAGCTGAATTAATATGATTGCATTTTATTTGCTAATCGTTTTACTAGTCATGCAGATGTTG  
ATAGACTGAATTGATAATTAATTTATGACTTAACTTAC

Klon Mc12648 (SP6-T7)

CAAAATGGCAACTAACTAGTTATTGCAGTTATTTTATTCTGTGCGGTATCGGCCTACGCTAAACAAGATAAGAG  
AAGTGCTGACAAGAAAGAAGAAATCAGCCGGCAAGCGATTCTTCTGTGGCGCAGCTTGTGCACCATCTTGTGCTCC  
AGCATGTGCTCCAACCTGTTGTGCGGCTCCACCCACCACCACCATGCCAATGCCATGCCACCTCCACCACCAC  
CATGCCACCTCCTTGGCCACCACCACCAATGCCAGGCCACCTGGACCCATTGGACCTCCAGGATGTTGCGGTGG  
ACCAGGACCAGTTGGACCCCCAGGTCTCCAGGTGGCCCTGGATGCCCAGGACCAATGGGACCTATGGGACCAATG  
GGACCAGCCGGATGCCAGGTGCTCCTGCACCACCAGCAGCCCATGCCACCAATCTGTCTCCATTTCCAAGCTC  
TCCTCCGTCAAGCACCTCCACCAGCACCAGTGTGCCAACCGTATGTCCACCAACATGTTGTGCCCTCCACCACCA  
CCTGCACCAGTCTGTGCTCCATCATGCGCACCAACATGCTGTGGCAAATAA

***patched***

celera\_v01\_contig\_2599

GGGACCACTGTACAAATGTATCCTTACGTGTAGGTCAACTGTCAGAGTCAAGATGGAAGTAACTGACGGAGACAA  
CGAAAAAAGAACTGATGAAGGAACTGATGAAGAACACATTGTGCGATTTAAAGAGCCTAATATCCTTTCCGG  
ATATTTGGAACCAATATGTGGTATTGTTGCGGAGCTATCTTTCTCGTCTTGAAGCCTTCTTTGAAGTCATTGGAA  
GAAAAGTTGCGACGAATCCAAAGAAGACGATACTTTTTGCCATTTTTGGAGTTATTCTTTGTGCTGTCGGATTGG  
TTAATATCAGTTTTGAGTCACGTACTTCAAAGCTGTTCCGTTCCAGAAAATTCATTTTCCAGAGAATGCTTTATTGC  
TTGGTAAACCGTTTTTTCTCAACTCATTCAACACAAGAAGTGAAGAAATCATTCTTCTTCCGAAGAATGGATCAA  
ACATTTTATCGGAGTTCAACTTAAAGGAAGCCTTGTGGCTGATACGCAAGACTATGAACATCAGTGGGTACCAGG  
AACTATGTAAGAACGGCAACTATTCTTGAAGGGAGCAGACAATTTGTTTGACAAAGATGTTAAATGTTCTATGA  
TGAATCCGCTCGAACTATTACGAAACAAGGCAGAACTCGAACAGCTATTTTTTGGAGTTTTACTATGCTTTAA  
GATCAACACGGCGTGTATGTCAAATGGACGAGCCGCCGATTCAATGTGAATTATGGCCTAACCAACTTCAAGA  
TGAACAGATCAGCTTGGCAGTTTTCTGCAGATGCACTTCGAGTTTTGGTTTATATGAAGCAAGGCGAAAGCGCAT  
CAGAGAGGAAGCCTATTTTGAAGTGGGAGAAGGATTTCAATGACACAATGCAAAAAGTCAGTAAGCAGCTAAAA  
TACAACACATTATCATACTCAAGTGAAGAAGCCTAGATGATTCAATCAGTGACAGCTCAACGAGTGGCATTCCC  
TTGATCAGCATTACATTTACGATCATGATTACATTCTCCTGCTTTATGCTCGCCAAATTCATCAACCCCGTACGTG  
GTCATACCTGGTTAGCATTGCTCGGAGTACTCTCAACTGGGCTTGGTATTCTAGCAGGAATTGGCTTCACATCTGC  
TATGGGTGTTCTTTTATAGGCCTTGTGGAAATAGTGCCATTCTTGTTTTGGAGCATCGGCATAGATGACATGTT  
TATAATTTGTGATGAGTTTGACAGACAATCAAAGGACAACATCCCATCAAATCGTGTTGCATTTGCCTTATCTAA  
AGTTGGTGCTACAATAACGATGACCACTGTCACTGATATGGTTGCTTTCTTTGTAAGCGCTACAAGCGCATTCCC  
AGCTTTAAGATACTTCTGCATCTTCAACACAGTTTGCATATCGATCGAGTTTTTATTGCAGATTTTCAATTTTGT  
AGCTTTTCTCACATTTGACTCGTTAGAATATACAGAAACAGAAAGTGAAGTGTGCTGCTACGATGCCAGTCCGTGA  
CAGAACGTGCTTCAGATTGCCTAATAATTTCTCCTTCTCGTCAAATGGATGCAAAGATATGGCGAAAGGTTGCT  
GAAGAAGCCAGCCAAGATTTTCTGTTTGCATATTAACCTTTAGTTTTAGTCGGAGTCGGAATCTTTGGATGCATTAA  
TGTGATAACCAATTCAGTCGCAAAGCTCTAGCCCTCAAGGGATCATACTATTCAAATTTATCTTGACGAATTCAC  
TGCCAACTTCCCACAAACAATCCCAGTTGATATACAGATAACAACGAACTCGATTATTGAGCCCTAACACCAG  
AAAAGAAATTAATAAATTAGCATCAATTGCTTATGACACTGGATATTACTTGTCAAGAACTTCACATGGGTTCA  
TTACTTTGAGCAATTTACCACTATGTTTTCGAATAGATAGTAATGGCCCAAAGTTCAAGAAAGCATTATCAAAGTT  
CTTAAATCAGTACATATACAGCCAACACAACGTGACGTGATTATGAACGATAAAGGGGAGATAGAAGCAAGCCG  
TGCAATTGTCTTCTTGAAGGACAATACGGACGCAGTCTTCCGTAAAGACGCCATGTTAAAGCTTCGTGATGCACT  
AAAAAACGCAGCAAACCTAAGGTAACAGTTGCAGCTGATCCATTCCTCTACTTCGAACAATATGCTGTGCTTCA  
GCAAGAGATAACCAATAATCTAATTTTTGTTTCAATTTGATTATGGTAATGTTGATTCCATTTTGTATTTCATCC  
TCTCATCATCTTATCATCCTATTGAGCTTCGTGCTCTTGTCTTGAATTTTGGACTGATGTATGTGTGGGAT  
GTGCAACTCAATGCAATATCGATGATCAATATCGTGATGGCTGTTGGCTTTTCCGTTGACTACAGTACTCACATT  
GCGCATGCCTTTGTTACATCCAGAGAAGATACAGTGGACAAGCGCATCATACGAGGCTCTTTCAACAGTAGGAGG  
AAGTGTA

Klon Patched (T7-SP6)

CTTTCAGAGAATGCTTTATTGCTTGGTAAACCGTTTTTCTCAACTCATTCAACACAAGAACTGAGGAAATCATT  
CTTCTCCGAAGAATGGATCAAACATTTTATCGGAGTTCAACTTAAAGGAAGCCTTGTGGCTGATACGCAAGACT  
ATGAACATCAGTGGGTACCAGGAACTATGTAAAGAACGGCAACTATCTTGAAGGGAGCAGACAATTTGTTGAC  
AAAGATGTTAAATGTTCTATGATGAATCCGCTCGAACTATTACGAAACAAGGCAGAACTCGAACAGCTATTTTT  
TGGAGGTCTTACTATGCTTTAAGATCAACACGGCGTGTTATGTCAAATGGACGAGCCGCGTATTCAATGTGAAT  
TATGGCCTAACCAACTTCAAGATGAACAGATCAGCTTGGCAGGTTTCTGCAGATGCACTTCGAGTTTTGGTTTAT  
ATGAAGCAAGGCGAAAGCGCATCAGAGAGGAAGCCTATTTTGAAGTGGGAGAAGGATTTTCATTGACACAATGCA  
AAAAGTCAGTAAGCAGCTAAAATACAACACATTATCATACTCAAGTAAAAGAAGCCTAGACGATTCAATCAGTGA  
CAGCTCAACGAGTGGCATTCCCTTGATCAGCATTACATTTACGATCATGATTACATTCTCCTGCTTTATGCTCGCC  
AAATTCATCAACCCCGTACGTGGTCATACCTGGTTAGCATTGCTCGGAGTACTCTCAACTGGGCTTGGTATTCTAG  
CAGGAATTGGCCTCACATCTGCTATGGGTGTTCTTTTATAGGCCTTGTGGAATAGTGCCATTCTTTGTTTTGA

**Cl390**

390 rA\_c02\_390

GAGAAAACAGGCAAGCAGTCCAGGAAGGTGCGACAATGAAGGTCCTTTCTATCCTGATTCTGATTGGGTTATCAG  
TCTTTTCATGTGCTGCAACAAAAGACGCAGAGGAGAAGATAACTAAAGATGCAATTAGGACCGCCGGGACACCA  
TTGAGCCTGTAGAGAGTGATTCTGATGAGCCTGAGCAGGACCAAGATGAAAGTGAAGAGGAGCCTAATGAAGCTG  
AATCAACGAGCGATGACCAAGATGAAGAAAAGTTCTGCCACTACCGAAGCCTCATCAGATCCTATATTCTGGCGAC  
GGAGATCTACTCGACGTAGATGTTACTATGCTCGCAGAAGATACATTGCTCGCAGAAGATACATTGCTCGCAGGA  
GATGTTACAGAAGACGTTTCGTTTCAGACGCAGACTTTTCGTTTCAGAAGAAGATGGAGCAGAAGACGTTGGTTGAGAC  
GAAGATTTTCATACAGAAGAAGGTGGAGCAGAAGACGTTTCGTTGAGACGAAGATTTTCGTTTCAGAAGAAGAGGT  
TGAGCCTACAAAGATCTCTGAACGATCCACCATACTTATTTTTTTTAGCTTTATGAACCTTGAAAACCTTTAGCA  
GTGACATAATAGACATGTTTTATCTGATGTAGTGCTTTTTGGTTGACAATATGGTGGTTAATCTTTAAGAAAT  
GGCTGATTACTTATCCATGCCACACATATCAATATTT

Klon CL390 (T7-SP6)

CGACAATGAAGGTCCTTTCTATCCTGATTCTGATTGGGTTATCAGTCTTTTCATGTGCTGCAACAAAAGACGCAG  
AGGAGAAGATAACTAAAGATGCAATTAGGACCGCCGGGACACCATTGAGCCTGTAGAGAGTGATTCTGATGAGC  
CTGAGCAGGACCAAGATGAAAGTGAAGAGGAGCCTAATGAAGCTGAATCAACGAGCGATGACCAAGATGAAGAA  
AGTTCTGCCACTACCGAAGCCTCATCAGATCCTATATTCTGGCGACGGAGATCTACTCGACGTAGATGTTACTATG  
CTCGCAGAAGATACATTGCTCGCAGAAGATACATTGCTCGCAGGAGATGTTACAGAAGACGTTTCGTTTCAGACGCA  
GACTTTTCGTTTCAGAAGAAGATGGAGCAGAAGACGTTGGTTGAGACGAAGATTTTCATACAGAAGAAGGTGGAGC  
AGAAGACGTTTCGTTGAGACGAAGATTTTCGTTTCAGAAGAAGAGGTTGAGCCTACAGAGATCTCTGA

**Cl631**

631 rA\_c02\_631

AGAGTACGCGGGGAGTACGTTCTTGGAGCTTGTGAGCAAGAGAGTACATTGAATCAGTAGCCATATGAAAAGTTGC  
CTTGACGGTGAAAGATGAGGGCGTTTCATCACAGCATTGTTGCTGTTCTCCGTGCTTTGTGCACTGCCATGTGTCAT  
GTGCGAAGAAGATGAAAGTGAGACAAAGAACGAAAAGGATGAGGACGAGGTTTCCCGATACAAAGATGAGGACG  
AGGTTAGCCGATACAGAGAGGAGGATGCAAGCGATGCTGAATTAGAAGATGTTTCTAGTGCTGCCAAGAGAAGCG  
AAGAGGAAGAAGATGCCAAACCCTTCTAAATTTCTTGAATCGTGTGCTGCGCCGATTACTTCCCATAACAAAAG  
ATGTTTCTAGTGCTGCCAAGAGAAGCGAAGAGGAAGAAGATGCCAAACCCTTCTAAATTTCTTGAATCGTGTGCT  
GTCGCGGATTACTTCCCATAACAAAAGATGTTTCTAGTGCTGCCAAGAGAAGCGAAGAGGAGGAAGATGCCAAAC  
CCTTCTAAATTTCTTGAATCGTGTGCTGCGCCGATTACTTCCCATAACAAAAGATGTTTCTGGTGCTGCCAAGAG  
AAGCCAATGAAACAGGTATCTATCAGTATCTCCGATGAGGTTCAAAGCCCAAGACTTCATAGTGGATGAAGAAAG  
AAAGAATATCACAACTTGTTTTTTTTTAAACAATGTTACATGAACAATTTCAACAGACTCTGAAGAATTGACAAAA  
CCTTTTCATATGATATTCAGAAGGAGAAAATGTGTCAAAT

Klon CL631 (SP6-T7)



CCATATGAAAAGTTGCCTTGACGGTGAAAGATGAGGGCGTTCATCACAGCATTGTTGCTGTTCTCCGTGCTTTGT  
GCACTGCCATGTGTCATGTGCGAAGAAGATGAAAGTGAGACAAAAGAACGAAAAGGATGAGGACGAGGTTTCCCG  
ATACAAAGATGAGGACGAGGTTAGCCGATACAGAGAGGAGGATGCAAGCGATGCTGAATTAGAAGATGTTTCTA  
GTGCTGCCAAGAGAAGCGAAGAGGAAGAAGATGCCAAACCTTCTAAATTTCTTGAATCGTCTGCTCGCCGAT  
TACTTCCCCATACAAAAGATGTTTCTAGTGCTGCCAAGAGAAGCGAAGAGGACGAAGATGCCAAACCTTCTAA  
ATTTCTTGAATCGTCTGCTCGCCGATTACTTCCCCATACAAAAGATGTTTCTAGTGCTGCCAAGAGAAGCGAAG  
AGGAGGAAGATGCCAAACCTTCTAAATTTCTTGAATCGTCTGCTCGCCGATTACTTCCCATACAAAAGATG  
TTTCTGGTGTGCCAAGAGAAGCCAATGAAACAGGTATCTATCAGTATCTCCGATGAG

**BMP**

03\_aurelia\_rc\_finalASM\_4359 + RACE

GGTCTTCTATCAGCTTTAACCAGAAGTTGCACTCAATATACAATATGGCAGATTTCGTTTCGCTTTTATTGTTCTTG  
CTCTCCTCGCTTTGGTTTTGACAGCGCAATGTAGCCACTGCTTGGAGATGCGCCTTTCGTC AACCGTTTTAAGAG  
CACAGGACCCAGTGATGTTGACCTGGACACGAAGAATACATTACAGAAAAGAGATCTTGGATATATTTGGAGTTGA  
TCATCGACCAAGGCCAAGCATGTTTTATCGAGAAGCAGGAAAAGAGATTCAGCGAGAAAATACATGGTAGATTT  
ATACAACAGTGTTACAAAAATAAATTTGAAAAGTAAAATGATGATGAGACTGATGTGATTTTTCTCAAACACAA  
CAACAAATGATTCAAACGCAGTCAATGCTGACACTGTGCTCAGTTTTGTTAACCATGCTCTGATCCCAAGACCAA  
ATGCTTCTGATGTTGATGGCGCCTATTACTTTGATCTGGCAACTAGTGTGCTTATGAAGATATCCTCGCGTCAG  
AGCTGCGACTTTTCAGAAAAGAGCAGATATTGTCAAACCGAGCAAGACAAAGATATTTGAAAATCAAATCTATC  
AGATTGTTATTCCGAGAAAAGATTTATCAACTTGTGAAAACCCAAACAATCAGTTCGGACCAAACCGGATGGTTGG  
TTTTCAATGTTTCGAATCTCGTCAAATCTGGAAGCAAGTATCCGGATCAAACAACGGCCTCTTGGTCCATTGCG  
AAACCGAGTTGGTCTCAAGTTGAGCATAAAAAGAAGCCGTATCGTTGATTTCAAAGGACCCCGGATCAGATCC  
CGTTCCTGGTTTTCTATTTTAAGACACCGAAGACAGATGATATTTTGGTGGAACAAGTTCAGAAGAATGATGACC  
CACATAAGAGAAGTCGACGCAAAAACAAGATCAGTCCAAGTTTATTGCAAAGATATTTAGGACGGAATGGTCGCA  
AGCAAGAACTACCTGGCCCATCCATCACAGGTGCACGATTCAAACGCAACAAYAACGACCGTTGTCGACTTCATGG  
CCTCTATGTGAGTTTACTGACCTCGGTTGGGAGGACTGGATCATTGCACCTGAAGGTTATCCTGCATTTTATTGC  
CATGGAGACTGTCCCTTCTCTTGGTGCACATATGAATGCAACCAACCACGCCATTGTCCAAACTTTGGTACATT  
TGATGTCACAAGCAACCATCCCCAACCGTGCTGTGCTCCTGTGCAGCTCACCGCCATCACAGTTTTATTTTTGGA  
TGATCAAAGCAATGTTGTTCTCAAGAAGTACCAGAATATGGTTGTAAG

Klon BMP (SP6-T7)

GATGACCCACTTATAAGAGAAGTCGACGCAAAAACAAGATCAGTCCCAAGTTTATTGCAAAGATATTTAGGACGGA  
ATGGTGCAGCAAGAAGTACCTGGCCCATCCATCACAGGTGCACGATTCAAACGCAACAACAACGACCGTTGTC  
GACTTCATGGCCTCTATGTGAGTTTACTGACCTCGGTTGGGAGGACTGGATCATTGCACCTGAAGGTTATCCTGC  
ATTTTATTGCCATGGAGACTGTCCCTTCTCTTGGTGCACATATGAATGCAACCAACCACGCCATTGTCCAAACT  
TTGGTACATTTGATGTCACAAGCAACCATCCCCAACCGTGCTGTGCTCCTGTGCAGCTCACCGCCATCACAGTTT  
TATTTTTGGATGATCAAAGCAATGTTGTTCTCAAGAAGTACCAG

**Cl112**

112 rA\_c02\_112

AAATAGTCATCGGGGAACAAGAATATCGGGGAACAACGATATCGGGAAAAACAGAAATCGAGAAGCCACCAGTA  
TCAAGACAGCATTAAATCATCGAACAGCAGCTATGGATGCCAACAGGGCAATTCTCGCACTCGTGCTTATATGTT  
CTTTGATTCAAAGTGCATCTCTAGAAAAATCACAGCCAATTCAAACCGAGACTGGAGGAGGCGACTGCATTGATA  
ATGATGATTGTGCCAACAATGGAATTTGCAGAATAGAAAAAAAAGCAAAGAAAAGGGAAAAGTGCAACTGCTTC  
GTTGGATTTACCAAACCAAATTTGTGACGCGGAGAGTAAGGTGAAAAAATTTGAACCTGGTGTGAAGGGAAAAGC  
TGTTTCGACGCAATCATATTATCGACATGAAAGTGCATCAAACCGCTATGAAACCGGATCAGGGAGCTACGAAAG  
TGCATCAAAGAGCGACGAAACCGGATCAGAAAAGAACTTTGAGTATGATCCAGCATCAGATATCTTTGGCCTCAC  
ACCTAAAAACCTCGCTGACTCAGGGCAGGAATTCCTCATTTACAACCCAGACAAGAAAGTCTTCTTATTTCGTCTCC  
AAAGACATAAAGGCAACTGGCAAGCGCATGCCATACATAGAGGCAAGAGGAGATCGAGCAGGATTGAGGAATAT  
CTTTACATTTATGAAAGTGCCTGGGCAGGATGGCAAGTACTACATTAAGAACAAGACACCAATAAATTCCTTTA  
TGTATCGAATAGCAAATCTGGCTTTATCAAATATTGGAACAACAATGTATTGGGAGCTGATTCTGTTGCGACTGA  
CGACTCGAAGACAAAATACATTTTTGAGTTCGTAGATGAGGATGGTGTGTTCTATGAAATAAAGAATCAAG  
GAAAATCATTCTATGTTTCTAGTCATATGTTGGGAATCCCAATGTATAGATTGGTAAAAGCTACTGACCAAAAGG

AATTGGAAAGATGGAACCTCTCAGTTCTTCCAGTTTGTGCTTAAAGATAAAGCAAAGCAGTCAAATTCGCAACCA  
AAGGTGAACCAAGGAAAAGGCTTCAGACGGTGATTGATGCAGGACAAAGCTCAAAGTCATGTAACAAAGGAAAA  
TCGAAAACAGACAAGGAAGATGACGTACAAATACAATACAAGGAGACCAACACTGAAACAAGAACATACACACA  
GACACATGGATTCACTTTCAATGGGAAGCTACCAGATCCGTTTGGAGGAATGTCATTACATATTCAAATACGCA  
AGCGACGCAAGAAGCCAACACAAAAACAAAAGAGTTGACGAGAACCCTGGGATCAAAGTTCCTGTGAACAGATG  
CGTTGCATCACAATTTTCATACAAAGCCGTCGAGTATGATCAAGACTACGAAGTCACTGCTACGTCAAAAAGGAG  
CAAAGATTTGAAAGCGACTGGGCAAAGTGAAGGCCAGTCGTGGTGAATTTGAAGTTCATAAGAAGATGTTCA  
ATTATAAAGATAACTTTAAATGTCCATATGAAAAATAAAGCATAGAAACATAGTGGATAATTTGTCATTTTTAT  
AGCACTTGAAGATGGTTTATTTTGTATTGTAGGATATCAAGTAATGACAAAAGATGTATTGAGATTCATTCA  
AAGCAATCATACTTCTATCATATAGACATTGAATAAAGGATTGTATGTGCC

Klon CL112 (T7-SP6)

GCAACTGCTTCGTTGGATTTACCAAACCGAATTGTGACGCGGAGAGTAAGGTGAAAAAATTGAACCTGGTGTGA  
AGGGAAAAGCTGTTTCGACGCAATCATATTCATCGACATGAAAGTGCATCAAACGCTATGAAACCGGATCAGGGA  
GCTACGAAAGTGCATCAAAGAGCGACGAAACCGGATCAGAAAAGAAACCTTGAGTATGATCCAGCATCAGATATCT  
TTGGCCTCACACCTAAAAACCTCGCTGACTCAGGGCAGGAATTCCTCATTTACAACCCAGACAAGAAAGTCTTCTT  
ATTCGTCTCAAAGACATAAAGGCAACTGGCAAGCGCATGCCATACATAGAGGCAAGAGGAGATCGAGCAGGATC  
GAGGAATATCTTTACATTTATGAAAGTGCTGGGAGGATGGCAAGTACTACATTAAGAACAAGACACCAATAA  
ATTCCTTTATGTATCGAATAGCAAATCTGGCTTTATCAAATATTGGAACAACAATGTATTGGGAGCTGATTCTGT  
TGCGACTGACGACTCGAAGACAAAATACATTTTTGAGTTTCGTAGATGAGGATGGTGTATGGGTTCTATGAAATAA  
GAATCAAGGAAAATCATTCTATGTTTCTAGTCATATGTTGGGAATCCCAATGTATAGAATGGTAAAAGCTACTGA  
CCAAAAGGAATTGGAAAGATGGAACCTCTCAGTTCTTCCAGTTTGTGCTTAAAGATAAAGCAAAGCAGTCAAAT  
CGCAACCAAAGGTGAACCAAGGAAAAGGCTTCAGACGGTGATTGATGCAGGACAAAGCTCAAAGTCATGTAACAA  
AGGAAAATCGAAAACAGACAAGGAAGATGACGTACAAATACAATACAAGGAGACCAACACTGAAACAAGAA

**Cl160**

160 rA\_c02\_160

GTTGCCAAGATCCTAGCAACGATAAATGTTTGGCCCTTCTCATATTCAAAGGATTCAGCAAAGATTTTAGAGGTAC  
ACGGACGAAACATAAAGACTTAGTTTTACTGAAACATTGATACAAGAACGAAGATGAGGACGCACGTGGTCTTAA  
TGACATTAGTTGTTATGGCAACTGCTGTACAGGGAAAGGCCTCAATATTCAAATCTTTCTTGGGGAAACCAGCGC  
GTCAGATTTCTTTGGCGGAATTTTCAGCAAGGTGCAAGAGATCATCGCCACATTTAAAAAGAGTAAAGATGCAA  
GCCGACCGACCAGTCACCAGTTGCTTCAAACCAAATTTCTGCAAGAAAAGAGAGTGCCCCCGTTTGGCTGAGAAC  
AGCACTGATGATTATGAACTAAGGTGCTACGAGGCAGCTAAATGGGTTTCTACCAAAGCAAATGGACATCCAACA  
CCAATGGGCCAGACTAGCAGACAAATGTTCAAACAGTTATTCCATACATCGAAGGGAACAACGTGGCTGGTCAGA  
AGATTGACATGACAGTGCCTGTTCTCAATAGTATGCAGGTCTGGCGAGATGAAAGATCTCGTCATGAGTTTTTAC  
ATTCCAGAGAAGTTCCAAGCCGCACCACCTGCCCCAAAAGACCCTCAGG

CL160 (SP6-T7)

CAAGATTTTAGAGGTACACGGACGAAACATAAAGACTTAGTTTTACTGAAACATTGATACAAGAACGAAGATGA  
GGACGCACGTGGTTTTAATGACATTAGTTGTTATGGCAACTGCTGTACAGGGAAAGGCCTCAATATTCAAATCTT  
TCTTGGGGAAACCAGCGCTCAGATTTCTTTGGCGGAATTTTCAGCAAGGTGCAAGAGATCATCGCCACATTTA  
AAAAGAGTAAAGATGCAAAGCCGACCGACCAGTCACCAGTTGCTTCAAACCAAATTTCTGCAAGAAAAGAGAGT  
GCCCCCGTTTGGCTGAGAAGAACAGCACTGATGATTATGAACTAAGGTGCTACGAGGCAGCTAAATGGGTTTCTA  
CCAAAGCAAATGGACATCCAACACCAATGGGCCAGACTAGCAGACAAATGTTCAAACAGTTATTCCAATACATCG  
AAGGGAACAACGTGGCTGGTCAGAAAGATTGACATGACAGTGCCTGTTCTCAATAGTATGCAGG

**Cl1661**

1661 rA\_c02\_1661

GCGGGGCTTTCACCTCAAAGGCCACTGCAAAGACACAGTGAGTTTGTATTTGATAGAAGAGAAAAGGCGGTAAAACA  
CAACCCATACTCAACATGCCTAAAGCTGGTAAGAGGAAAAGACCCTAACAAACCTAAGGGCAAGAAAGGTGCATAC  
ATATTCTTCTCGAAGAACGACGTTTCACAGCAGAGCGAGAAGATGTCCTTTCTGACTTCTCGAGGGAAAACAGCA

GATGCTTGAAGATTTTGACTGCCAAACAGAAAGAGAAGTTCGAGAAGTTGGCCTTGGCAGATAAGAAGAGGTA  
CGAAGAAGAGATGGCAGACTACTCACCGCCTTCTTCAGATGATGATGAAGATGAGGGTACGAAGAAAAAGAGAA  
AGAAGAAGGAGAAAGATCCTAATCAACCAAAGAGAAACATGTCTTCTTACTTCCATTTCTGTGGTGAGCATCGTG  
CTGCAGTTCGTGAGGAAAGGCCTGGTGCCACAATTGGTGAGATTGCAAAAAGTCTTTCTGTGCAATGGAGGGAGT  
TGACGGATTACAGAGAAAAAGTATATGAAGAACTAGCCCGCAAAGACAAAAGAGCGATATATGAGAGACATGGAT  
GTTTACAATGGAAAAAAGCCTGGCAAGAAAGTGAGAGTGAAGAGTAACGTCATTTGATCAATTGATGGTCTAA  
AGTGATGATGATGTGAACACCCCATTTTGC AAAATTTTGGTTCAAATGTTGTGTATGAAGGACAATATGAACAA  
AATCTTTCAGTGGGGGTTTTACTCAACTTTGCACAAAATTTAAAAACCTAATAACGTTGCTTTCTTTGTTATAAGCA  
TACATTGTAATAACTGAATGGAGGTAGTGATAAATCTTGCCACTGGAAAAGACATGTAGCAATTATCCAGACTT  
TGATAAGTGCTGAAGATTATATTTCCCATGTTGAGTATTTTTGGAAGTCCACTGAAAAATGTGTTTTTGAAGTAT  
TCATTTGTTATATAATTGCAAAAATCTTACCAGCAATCAAAAAGTATGATGTTGTAGCCACAACATTAATTTCCAGA  
CTGCTGAAAATTGAGTGTAACACCATGACTGGCATTCAATTTAAGGTCAAATTGATACAAAATTTTATTTCTGGAC  
TGTGAATATGATTACCTTAAAATGCAACTATTAATTGCCATAAGATACAACAAATGATCATCCAATATACAAAAA  
ATGAAAAAGAAAGTATTTCTGCAAGGTCTTTTCCGTGCAAGTGCTCATGTTACTAAGTATTTGTTCACTTCTC  
ATCATTAAATTTTATGATCAACTTCAATTCGTGCTTATAAAGCATCATGTATATCAGTGCTTGTTTTAAAGTTCTC  
TTCCTTCTGTCCATATGTAAATGTTTTGATATATGTTTTTATGCACAAGAAGACAGCCTGAGTATGCCTTGAT  
CTTACTTATTTTCTGATGCTAGCAAATGG

Klon CL1661 (T7-SP6)

CACAACCCATACTCAACATGCCTAAAGCTGGTAAGAGGAAAGACCCTAACAAACCTAAGGGCAAGAAAGGTGCAT  
ACATATTCTTCTCGAAGAACGACGTTCCCAGCAGAGCGAGAAGATGTCTTTTCTGACTTCTCGAGGGAAACAG  
CAGATGCTTGAAGATTTTGACTGCCAAACAGAAAGAGAAGTTCGAGAAGTTGGCCTTGGCAGATAAGAAGAGG  
TACGAAGAAGAGATGGCAGACTACTCACCGCCTTCTTCAGATGATGATGAAGATGAGGGTACGAAGAAAAAGAG  
AAAGAAGAAGGAGAAAGATCCTAATCAACCAAAGAGAAACATGTCTTCTTACTCCCATTTCTGTGGTGAGCATCG  
TGCTGCAGTTCGTGAGGAAAGGCCTGGTGCCACAATTGGTGAGATTGCAAAAAGTCTTTCTGTGCAATGGAGGG  
GTTGACGGATTACAGAGAAAAAGTATATGAAGAACTAGCCCGCAAAGACAAAAGAGCGATATATGAGAGACATGG  
ATG

**RXR26884**

celera\_v01\_contig\_26884

ATTCAACTACAGATAGAGAAGAGCTGCATTTGCCCGAGAAAGTCCCTGGAATGGAGTATGCTTGCGAAGAAGATG  
GAAGCTCCATGAACATGGTGGATAGCTGCCTCCCCGAGCCTCCTCCATTAGAGAGCATCGATTACATACAGCCCGCT  
ATCTGGCAGTGACGGCACTCCGGGGAGCTCATCATCAAGTTTATCATTCTTCCCAACAAAACCTCAAGCCCCAACTC  
AAATGGTTTCAAGCGTCAAATGCTACCATGTGCCGTTTGTAGTGACAAAGCTTACGTGAAGCACTATGGAGTCGT  
TGCATGCGAAGGATGCAAAGGATTCTTCAAAGATCTGTGAGGAACAATCGAAAATATCAGTGCCTTGGGAATCA  
AAGATGTGATATCGACAGAAAATCAAGAAATAAATGCCAGTATTGCAGATTTTCAAGAAATGTATTGAAGTTGGAA  
T

Klon RXR2688 (T7-SP6)

TGCATTTGCCCGAGAAAGTCCCTGGAATGGAGTATGCTTGCGAAGAAGATGGAAGCTCCATGAACATGGTGGATA  
GCTGCCTCCCCGAGCCTCCTCCATTAGAGAGCATCGATTACATACAGCCCGCTATCTGGCAGTGACGGCACTCCGGG  
GAGCTCATCATCAAGTTTATCATTCTTCCCACAAAACCTCAAGCCCCAACTCAAATGGTTTCAAGCGTCAAATGCT  
ACCATGTGCCGTTTGTAGTGACAAAGCTTACGTGAAGCACTATGGAGTCGTTGCATGCGAAGGATGCAAAGGATT  
CTTCAAAGATCTGTGAGGAACAATCGAGAATATCAGTGCCTTGGGAATCAAAGATGTGATATCGACAGAAAATC  
AAGAAATAAATGCCA

**RXR16788**

celera\_v01\_contig\_16788

GGAAGCATCTCAATGAAACTTTCCGACAAGACCTCTTGAACCGTTACGTAAATCATTGGATTTCGCATCATTGCC  
GCCCGCCCGCCTTTTATTCTTGAATTAGCTCGATCTTTGTAGCTCGAGAGAGTTAAAATCCAGTACCCATGGATC  
TCTAATGGAAGAGGATTTCTTGTGATTTCTTTGTGAATATGCCAGGACTTTTACGAGATGATGATGATGATTT

TGCTGTTTCAGAAAGGCAGGATTCCGAAATCTCCATTAGAAGGTTCTATGGTTCGACCAATTTGGCACACTAACTAA  
CAGTTTCAATAATGGCAACGTCAACGGAATATCAAATGCTCAAACTTCATGTCTGCTTATACGAATCTATTACT  
CAGAGCTGATTCCTTAGCAAGATTCCAACAAACGTACAGCTACACAATATGGAATGTCGGGAACAGAACATGTTTA  
TGAAATGGCCGCGGGCTACTCTTCAATGCCGTTGATTGGGCGCGGAATGTCCCCTTCTTCTCGGCACTGGCAACG  
ACAGATCAAGTAGCACTGCTGCGGAATTGTTGGAGTGAGCTGTTTATATTGAGTACTGCACAGCATTGCAGCAGC  
TTTCAGTTTAATCCAAGAGCTCTTGCAACGTATGGGAATGGTGATAGCCAAAATGGTGGATTAATCAATGAAAAG  
AGATCACCAGAAGAGAATGGGAATACTAGTAATCAAGATAATTTGAAAATGTTTGAAGATCTGATTGAGAAATT  
TAAATCATTGCAAACTGATGCTGCTGAGTTTTTCATGCCTCAAGGCATTGGTATTATTCAATCCAGATACTCCTGG  
GATAAGCAATCCACAATTGATTGAGAATTTACAAGAAAAAGCACAAGCGGCATTAGAAGAATACCTGAGACAAC  
AACATCCATCTCAATCAAGCAGATTTGGCAAACTTCTCTTGAGATTACCTGCATTACG

Klon RXR16788 (T7-SP6)

TTCCGACAAGACCTCTTGAACCGTTACGTAAATCATTGGATTGCGATCATTGCCCGCCCGCCCGCCTCTTTATTCT  
TGAATTAGCTCGATCTTTGTAGCTCGAGAGAGTTAAAATCCAGTACCCATGGATCTCTAATGGAAGAGGATTTCC  
TTGATTTCTTTGTGAATATGCCAGGACTTTTACGAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
TTCCGAAATCTCCATTAGAAGGTTCTATGGTTCGACCAATTTGGCACGCTAACTAACAGTTTCAATAATGGCAACG  
TCAACGGAATATCAAATGCTCAAACTTCATGTCTGCTTATACGAATCTATTACTCAGAGCTGATTCCTTAGCAA  
GATTCACAACAAACGTACAGCTACACAATATGGAATGTCGGGAACAGAACATGTTTATGAAATGGCCGCGGGCTAC  
TCTTCAATGCCGTTGATTGGGCGCGGAATGTCCCCTTCTTCTCGGCACTGGCAACGACAGMTCAAGTAGCACTGC  
TGCGGAATTGTTGGAGTGAGCTGTTTATATTGAGTACTGCACAGCATTGCAGCACTTTTCAGTTTAATCCAAGAG  
CTCTTGCAACGTATGGGAATGGTGATAGCCAAAATGGTGGATTAATCAATGGAAGAGATCACCAGAAGAGAAT  
GGCAATACTAGTAATCAAGATAATTTGAAAATGTTTGAAGATCTGATTGAGAAATTTAAATCATTGCAAACTGA  
TGCTGCTGAGTTTTTCATGCCTCAAGGCATTGGTATTATTCAATCCAGATACTCCTGGGATAAGCAATCCACAATT  
GATTGAG

***patched II***

celera\_v01\_contig\_3071

AAATAATGCGTCAGACTGGCATGACCATTTTCAGGCATTGCACAGCATCTCCACTAGTCTAAATGACAGCCGTTA  
CCTGTACATGCCCTGCATGGCAGAATTTGGAGGCCAGTCAACCCCAATGTAGCTTTGGGTGGTTTTGATGGAGA  
GAAATACAGATCAGCAAAATCCATCATTGTGACTTTTATTGTAACAACCATGAAGATGAAGCAAAAAACAAAA  
AGGCAGAAGCATGGGAGAAAGTTTTTATTGAGTACATGAAAAATTTCAAGAAGAGCGGTCCAAAAGATTTCAAT  
GTCTCTTTTACATCAGAGAGGTCAATCCAAGATGAATTTGAATAGAGAGAGTGAATCAGATATCAAAACCATTTTT  
GCAAGTTACATGCTCATGTTTCTCTATATCTCGCTTGTCTTGGGCGATGGGAAAGCTGTGATGGGAAAAGGATA  
TTTGTGATTCAAACTGATTGTTGGACTTGGTGGTGTCTAATTTGCTCTGTCTGTGTTGCAAGTTCACTTGGT  
ACATTTTCATACGCTGGCATCCCTGCTACATTGATCATCATTGAAGTTGTGCCATTTTTGGTCTTAGCTGTGGGTG  
TTGATAACATCTTTATTCTGGTACAGACATTTTCAGAGAGATGTTTCGCTGCCACATGAACAAATAGCCCATCAA  
TTGGCAGAGTTTTAGGACAAGTCGCACCAAGCATGTTGTTGTCTTATTATCTGAATCAGTTGCATTTGGTTTAG  
GTGCAATGTCAACAATGCCTGCTGTTGCTGATTCTCCAATATGCTTCACTTGCTGTCTTATTGATTTCTTGCT  
CCAAATTTCTGCCTTTGTTGCACTGCTTGCATTGGATGCCAAACGACAAAGAAATCAAGATTGGAATTTCTGCTG  
CTGCATAAAACTCTCCAAGATGGACACGGAACAAGCTCCTTCAGCTTATCAAGGGGGACTTCTCTATCAACTATT  
CAAGAGATTCTATGCCCATTTCCATATGTTGAAGTCGGCCTAGACCAGAAGCTAGCCCTTCCAAAAGATTCATT  
TTTGTGGCATGGTTCTCAGACATGAACAAATACCTGCACACTGGACCGCGGTTTTATTTGTTGTCAAAGAGGG  
ATATAAGTACGAGGACCGGATCGATCAGAATAGGGTGTGCGGTGTTTCAGGCTGTGACCCAACTCATTAGTGCA  
ACAAGTTTTTTGTATCCTCGGAAATTAAGACTACTCAAAGATTGCACTGACAGCTTCGTGATGGATCGATGACTA  
CCTAGCATGGATAGATCCCCGTGGAGATGTGCCATGTTGCAGAAAGCTCGATTACATCTCATCAAATAGAACAGT  
AGGCAATAAACTGAAGAACATCGATGGTACCCTGGTCCGTTTCATCTTTTGTAAATTCGACGGTAGATAATTTCTAG  
CTGGCATTGCTCACCATGTAGAAATGTCAAGGAGACAGGTTCAAGACCTTCTGTGGCGGATTTTAGAAAATACCT  
TGGAGCTTTCTTTCCGATATTTCAAATACTGTCTGTACCAAAGGAGGGCATGCTGCATATGGATCTGCTGTGAA  
ACTCAACCAGAACACAAGTAACGATATAGTAAAAGCATCTTATTTCATGTCATACCATTCAATTTTGAACATC  
AGATGATTATACGAATGCATTGAAATACGCAAGGGAGTTATCAACGAATATGACAAAAGAAGTCAAGCATGAGG  
TTTTTCCATACAGCGTGTTTTACGTCTTCTATGAACAATATCTGACAATTTGCCATGACACGTGGGTTGATCTAA  
GTATATGTGGAGCTGCAATATTTGGAGTGACATTCGTTTGTCTTGGCTTCAACTTTGGAATAGCATTGATCATGA

CATTCGTCGTGGCAATGATAGTTGTGGATATGTTTCGGTTTGTATGTACGTGTTGGGGAATCTCCCTCAATGCTGTA  
TCACTTGTGAATCTTATCATGGCAGTTGGAATCTCCGTTGAGTTCTGTGCACATGTGCGCGGGGCGTTTCAGTGTCA  
GCCCCTTGCCTACAAGAATCGAAAGAGCTGAAGAGGCCTTAGCTCGAATGGGAAGCTCTGTGCTTACTTCAAGAA  
CGTTAACGAAATTTGTTGGAATTATTGTTCTGGCATTTCGCAAAGTCGCAGCTGTTTGTAGATCTTCTACTTCAGAA  
TGTACCTTGGTATCGTATTAATTGGTGTCTTCCACGGACTCGTATTTCTACCGGTATTCCTTTCCCTATGTCGGGCC  
TAGCTCTAGAGCATTGCCCTCAGCAACTCCCGTACCAGAAGACGAGCGAGTGGACGAAAAGCGAAGACTTTTAAA  
N

Klon Patched (T7-SP6)

CTCCCACTAGTCTAAATGACAGCCGTTACCTGTACATGCCCTGCATGGCAGAATTTGGAGGCCAGTCAACCCCAA  
TGTAGCTTTGGGTGGTTTTGATGGAGAGAAATACAGATCAGCAAAATCCATCATTGTGACTTTCATTGTAACAA  
CCATGAAGATGAAGCAAAAAACAAAAAGGCAGAAGCATGGGAGAAAGTTTTTATTGAGTACATGAAAAATTTCA  
AGAAGAGCGGTCCAAAAAGATTTCAATGTCTCTTTTACATCAGAGAGGTCAATCCAAGATGAATTGAATAGAGAGA  
GTGAATCAGATATCAAAAACATTTTTGCAAGTTACATGCTCATGTTTCTCTATATCTCGCTTGTCTTGGGCGAT  
GGGAAAGCTGTGATGGGAAAAGGATATTTGTTGATTCAAAACTGATTGTTGGACTTGGTGGTGTCTAATTGTCC  
TGTGCTCTGTTGCAAGTTCACTTGGTACATTTTACATACGCTGGCATCCCTGCTACATTGATCATCATTGAAGTTGT  
GCCATTTTTGGTCTTAGCTGTGGGTGTTGATAACATCTTTATTCTGGTACAGACATTTTCAGAGAGATGTTCTGCT  
GCCACATGAACAAATACCCCATCAAATTTGGCAGAGTTTTGGGACAAGTCGCACCAAGCATGTTGTTGTCTTCATT  
ACCTGAATCAGTTGCATTTGGTTTTAGGTGCAATGTCAACAATGCCTGCTGTTCTGTGATTCTCCCAATATGCTTCA  
CTTGCTGTCTTCATTGATTTCTTGCTCCAAATTTCTGCCTTTGTTGCACTGCTTGCATTGGATGCCAAACGACAAA  
GAAATTCAGATTGGAATTTCTGCTGCTGCATAAACTCTCCAAGATGGACACGGAACAAGCTCCTTCAGCTTATC  
AAGGGGGACTTCTCTATCAACTATTCAAGAGATTCTATGCCCCATTCTGATGTGGAAACAAGTCAGAGTTGTTG  
TGGTACTGATCTTCAGTGGCTTATTGATGGCATGCATCTC

**ETS**

celera\_v01\_contig\_CL4522

GAGTATAGCAAGTTGAACAGTCAACTCAGAGAGCAGGAAATTTGCAACAAACGAACGATCTATAACGAGGAATA  
TTATTTTAAATAAATTACACGACTCGACACGAACCGCTGATAAAACCAAGATGTTTGTGACCTCAGATCTTCAAGCA  
AATGTCGTTTCTGACCCAATATGTATGCACAGGAAGCATTGAGCATAGACTCGGTGCAAGAGCAGTCCCTGTTT  
GACCCTTACGATAATCAAAAAGTTCCAACGGGCAAGCCAATCAAAACAGGACCCATGGGGACCAAAGAAAAGATCC  
CTAGATCCCGACTTCGACGATTTCCACACTGCCCGAAAAAGCCAACATTTCTACGAGCCTCTTGATGAGAAACCT  
TCATGCCTGACTATGATGAATCAGAGAAAAGAGTTATTGTTCCCGCAGATCCAAACTGTTGGACCAAAGACCATG  
TTAAACAGTGGGTGAATTTGGGCAATCAAAGAGTTTAGTCTCAGAGATGTAGATGTTGACAAGTTTTCTATGACTG  
GCAAAGAATTGTGCCGATAACCAGAGATGAATTCCTCAAACCTTGCACCAGCATACAATGGTGACATTTCTTATGG  
CACATCTTTGCGTCTTGAGGAAAGCTCCACTTCCAACCTAACGACTGATGACATCGATAGTGTCTCGCACCAAC  
GTTGAATCAACTTTGCCCTACTCGTTCAGGAACAGCGTCACCAAGACCGTCCCTCCGAGTTGACCAGGAGAAACGA  
CCATGCTCCACCGTTGGCAACCTCTCTCGCAGCGTCCCGTTGACGTTAGTATGGAAGCGAGTATCTGACAAGCT  
GTGCGTTTTCAATCAAATAACGAATACAATTGTAGAGAAAGGGACTCAGTTGTACCCACTAAACCATTCTGCGAAG  
GATCATCAGGAGAATACTCAACTTGTTCACCCCAAGCAAGCCCTCACCTCTCGCTGGATCACTGCCGCCACCAAG  
TAACCAACCGGCAGCGGACAAATCCAACCTCTGGCAATTTCTTCTCGAATTTTATCCGACCCAAACAACAGCGGT  
TGTATCGCATGGGAAGGCAACAACGGTGAATTCAAACTCTCTGACCCTGATGAGGTTGCAAGGCGATGGGGAGAG  
CGTAAAAACAAACCGAACATGAATTACGACAAGCTCAGTCGGGCGCTTCGTTATTACTACGATAAAAAACATAATG  
ACAAAGATCCATGGCAAACGTTACGCTTACAAATTCGACTTCCAAGGACTCGCTCAACTCAACCAGCCAATCACAT  
CAGACGCTCAATTGCACGCCGCCAAGCTGCAGCATAACAGAGCTGAGTTCCATTCTACAGTGCCTACCCCGGCC  
ACCCTACGTCTACTCTGGTCCACCTGTCCAGGATCAAGTCAGTGTATTTGCGAATGGGACCAAACCCATACAGC  
GCTTCATGGGGTCTGTTGGAGGCCAGCACACGTACCTGGTACATACAGAAGTCAAATGGCATCATCGCTACCTTAT  
TTCTAAG

Klon ETS4522 (SP6-T7)

CTATAACGAGGAATATTATTTTAAATAAATTACACGACTCGACACGAACCGCTGATAAAACCAAGATGTTTGTGACC  
TCAGATCTTCAAGCAAATGTGCTTCTGACCCAATATGTATGCACAGGAAGCATTGAGCATAGACTCGGTNGAA  
GANCAGTCNCTGTTTCGACCTTACGATAATCAAAAAGTTCCAACNGGCAAGCCNATCAANCAGGACCCATGGGGA  
CCAAAGAANAGATCCCTAGATCCCAGCTTTCACACTGCCCNAAAAAGCCAACATTCTACGAGCCTC  
TTGATGAGAAACCTTCATGCCTGACTATGATGAATCAGAGAAAAGAGTTATTGTTCCCGCAGATCCAAACTGTT

GGACCAAAGACCANGTTAAACAGTGGGTGAATTGGGCAATCAAAGAGTTTAGTCTCAGAGATGTAGATGTTGAC  
AAGTTTTCTATGACTGGCAAAGAATTGTGCNNGATAACCAGAGATGAATTCCTCAAACNGACCAGCATACAAT  
GGTGACATTCTTATGGCACATCTTTCTCTCGCACCAACGTTGAATCAACTTTGCCCTACTCGTTCAGGAACAGCGT  
CACCAAGACCGTCTCCGCAGTTGACCAGGAGAAACGACCATGCTCCACCGTTGGCAACCTCTCTCGCAGCGTCCC  
CGTTGCACGTAGTGATGGAAGCGAGTATCTGACAAGCTGTGCGTTTCAATCAAATAACGAATACAATTGTAGAGA  
AAGGGACTCAGTTGTACCCACTAAACCATTCTGCGAAGGATCATCAGGAGAATACTCAACTTGTTC AACCCCAAG  
CAAGCCCTCACCTCTCGCTGGATCACTGCCGCCACCAAGTAACCCAACCCGGCAGCGGACAAATCCAACCTCTGGCAA  
TTTTCTTCTCGAACTTTTATCCGACCCAAACAACAGCGGTTGTATCGCATGGGAAGGCAACAACGGTGAATTCAAAA  
CTCTCTGACCCCTGATGAGGTTGCAAGGCGATGGGGAGAGCGTAAAAACAACCGAACATGAATTACGACAAGCTC  
AGTCGGGCGCTTCGTTATTACTACGATAAAAAACATAATGACAAAGATCCATGGCAAACGTTACGCTTACAAATTC  
GA

**EED**

celera\_v01\_contig\_14607 rev

TGGGTATGGCAAAAAGAAAAGGAGAAGGAGAATTAATCTGCAAAATCAGAAAACCAAAGAGTTCATACAAATGTA  
CAAATTTTCTAAAGGAGGACCACAAACAGCCTATCTTTGGTGTGCAATTTTTTCAACTGTTTCATGATGATGAAA  
AAGATCCACTCGTTTTTGAACCTGTTGGAAGTAACAGGGTTTTCAATTTACAAGTGTGAAGAAGGTTCTGGAAGGG  
TAACTTTGCTTCAAATTACTGTGACTCAGATCCAGAAGAAAATTATTACACATGTTTCATGGTCATATGATACAG  
AAAGTTGTGATCCAATTTTATCATTGCTGGTGTAAAAGGAGTTATTCATGTTGTCAGCATTGTGCGAAGACAAT  
GTACAAAGTACTATCAAGGACATGGCAGCAGCATAAATGAACTTCGTTTTTCATCCAGTAGATCCATGCTTACTTT  
TCTCAGCAAGCAAAGATCATTCTATCCGAATGTGGAATATTA AAACTGATATTTGCGTATCTGTGTTTTGGTGGTG  
TTAATGGTCACCGAGATGAAGTCTTGAGCATCGATTTTTGACATCCTTGGTACAAAATTAGTCTCATGTGGAATGG  
ATCATTCACTGAAAGTTTTGGTCTGTAGACACCGAAGAGTATAAACAGCACATTGAAAAATCATTCAAATATGAAC  
CATCATCGAAACCAGGAATTTTCTACCTCTGAATGTTCACTACCCAGCTTTTTCCACAAGAGACATTCACAGGA  
ATTATGTTGATTGTGTTTCGATGGTATGGCGACCTCATATTATCAAAGTCATGTGACAACAAGTTGTTCTCTGGA  
AGCCAAAATTGAAGATGGAAAACTACTCCAAAAGAAACATGAATCAGAGACGGGAGTATCAATTCCTCACAAA  
TTCGAGTTCAGTCAATGTGATATTTGGTTTTATCAAATTTGCACTAGATTACAATCTCAAGCTTCTGGCGGTTGGA  
AATCAAACCTGGAAAGATTTTCATTTGGGATTTGGATGTCAATCAACCTGCTAATGCAAAGTGTATACCCCTGGCT  
CATCCAAAATGCACAACAACGATAAGACAGACATGTTTCAATAAAGATGCCAGTATTTCTGGTTTTCAGTCTGTGAT  
GATGGAACAGTTTGGAGATGGGACAAGCAATCAAATGATTTGTTAAGAAAAGGAAGAAACCCAAAGGAACATT  
TTGCTTTCTTTTCATGCCAGAGGAATGTGAGAAAAGGCAAGAAGTGTACTGAACTGCAGTTGTGAATTCCTTG  
GTTGCTACAAATTGATTGAGTTTCCGTTAATCACATGGCGTGAACCATTCAAAAACAACAGCACAATGGCACTTT  
GTAATTTTGTAAA

Klon EED (T7-SP6)

GACCACAAACAGCCTATCTTTGGTGTGCAATTTTTTCAACTGTTTCATGATGATGAAAAAGATCCACTCGTTTTT  
GCAACTGTTGGAAGTAACAGGGTTTTCAATTTACAAGTGTGAAGAAGGTTCTGGAAGGGTAACTTTGCTTCAAAT  
TACTGTGACTCAGATCCAGAAGAAAATTATTACACATGTTTCATGGTCATATGATACAGAAAGTTGTGATCCAATT  
TTATCATTTGCTGGTGTAAAAGGAGTTATTTCATGTTGTCAGCATTGTGCGAAGACAATGTACAAAGTACTATCAA  
GGACATGGCAGCAGCATAAATGAACTTCGTTTTTCATCCAGTAGATCCATGCTTACTTTTTCTCAGCAAGCAAAGAT  
CATTCTATCCGAATGTGGAATATTA AAACTGATATTTGCGTATCTGTGTTTGGTGGTGTAAATGGTCACCGAGAT  
GAAGTCTTGAGCATCGATTTTTGACATCCTTGGTACAAAATTAGTCTCATGTGGAATGGATCATTCACTGAAAGTT  
TGGTCTTAGACACCGAAGAGTATAAACAGCACATTGAAAAATCATTCAAATATGAACCATCATCGGAAACCAGG  
AATTTTCTACCTCTGAATGTTCACTACCCAGCTTTTTCCACAAGAGACATTCACAGGAATTATGTTGATTGTGTT  
CGATGGTATGGCGACCTCATATTATCAAAGTCATGTGACAACAAGTGTCTCTGGAAGCCAAAATGAAAGATG  
GAAAAACTACTCCAAAAGAAACATGAATCAGAGACGGGAGTATCAATTCCTCACAAATTCGAGTTCAGTCAATGT  
GATATTTGGTTTTATCAAATTTGCACTAGATTACAATCTCAAGCTTCTGGCGGTTGGAAATCAAACCTGGAAAGATT  
TTCATTTGGGATTTGGATGTCAATCAACCTGCTAATGCAAAGTGTATACCCCTGGCTACCCAAAATGCACAACA  
ACGATAAGACAGACATGTTTCAATAAAGATGCCAGTATTTCTGGTTTTCAGTCTGTGATGATGGAACAGTTTGGAGA  
TGGGACA

### ***budhead***

02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_3545 rev

ATAGCAATGGCGATTCAAATGCGCCTGAAAAGAAAAGCACTCTAAGTGGAAATCTATCAATTTATTATGGATCGA  
TTTCCATATTACAGGCAAATAAACAAGGTTGGCAGAATTCAATTCGACACAATTTATCCCTGAACGAATGCCTC  
GTCAAATCGCCGAGATGATAACAAACCTGGCAAAGGCAGCTACTGGACTCGATCCCACAGCCTAAACATG  
TTTGGAAATGGAAGTTACCTTAGGCGCAGAAGAAGATTCA

Klon Budhead (T7-SP6)

ATAGCAATGGCGATTCAAATGCGCCTGAAAAGAAAAGCACTCTAAGTGGAAATCTATCAATTTATTATGGATCGA  
TTTCCATATTACAGGCAAATAAACAAGGTTGGCAGAATTCAATTCGACACAATTTATCCCTGAACGAATGCCTC  
GTCAAATCGCCGAGATGATAACAAACCTGGCAAAGGCAGCTACTGGACTCGATCCCACAGCCTAAACATG  
TTTGGAAATGGAAGTTACCTTAGGCGCAGAAGAAGATTCAAG

### ***frizzled***

03\_aurelia\_rc\_finalASM\_848 rev

ATCAGAATATGGACTCGTGTGCATGCCCAACTGGCATCAATTTACTTCCTAATGGAAAAACATGTGACACCAT  
GGGCAAAGACAAATGCGAGTCAATTACGTCCCAATGTGCATGAACGAAGATGATGAAGAGCAGGCAACATGGAT  
GTACAACTCGACAATGCTTCCGAATTTGCTTTACACAAAAATCAAATGACGCGGCATTGGAACCTCACCAGTT  
CTTTCCAATCGTAAAGTTAAATGCTCCGAGGTTCTGCAACAGTTCTTGTGCAACCTTTATCTGCCAAAGTGTTC  
AAGAAAGTGATCCCACCTTGTGCTTCAATTTGCCAGAAAGCACGAGATGGTTGTGAGCCACGATGATGAAATTT  
GGTTTCAATTGGCCTGATAATCTAGACTGCAAGCAGTTTCTGCGGACGATGAAGAAGAATTGTGTGTTGAAAC  
AAAAAACTTTATCAGACAAGAAAGAAGGTTTAAAAATGCAACAGAACCAAATATGGCACAGAAAAATTATAC  
TGAAACTGTTTGTACAATTTTCGAGTACCAGTGCATAACTGGCAAATGTATTCCAATGATTGGAGATGTGATGG  
CCAGGAAGATTGCAAAGATGGATCAGATGAAACACGCTGCACTGAATCGGTCCCTGAAAAGATCACAACATTGAA  
AGTGATTCTAAACCTGACTTCTCTGCAGTGGTGTCTGGTTTCCAACAGACTGTTAAACTCGGTGCCAGTGACG  
TCATTCACTGAACCTTAAGGAAATAAGCAGTGCATATAACCAAGTGAGACTGCAAGGACACCTCAGATCA  
TACATCGTGACAAATCTGAAACCACGTGGTATTTACGAGTTCTCAATCAAGGCTAGCAATCGTATTGGAATCAGC  
CCTTCGAGTGATCCTGTATTGATACGAATGGAAGTTGGGTTACCAGGGGAAGTGCTTTTG

Klon Frz (T7-SP6)

CCATGGGCAAAGACAAATGCGAGTCAATTACGTCCCAATGTGCATGAACGAAGATGATGAAGAGCAGGCAACAT  
GGATGTACAACTCGACAATGCTTCCGAATTTGCTTTACACAAAAATCAAATGACGCGGCATTGGAACCTCACC  
AGTTCTTTCCAATCGTAAAGTTAAATGCTCCGAGGTTCTGCAACAGTTCTTGTGCAACCTTTATCTGCCAAAGT  
GTTCCAAGAAAGTGATCCCACCTTGTGCTTCAATTTGCCAGAAAGCACGAGATGGTTGTGAGCCACGATGATGA  
AATTTGGTTTCAATTGGCCTGATAATCTAGACTGCAAGCAGTTTCTGCGGACGATGAAGAAGAATTGTGTGTTG  
GAAACAAAAAACTTTATCAGACAAGAAAGAAGGTTTAAAAATGCAACAGAACCAAATATGGCACAGAAAAAT  
TATACTGAAACTGTTTGTACAATTTTCGAGTACCAGTGCATAACTGGCAAATGTATTCCAATGATTGGAGATGT  
GATGGCCAGGAAGATTGCAAAGATGGATCAGATGAAACACGCTGCACTGAATCGGTCCCTGAAAAGATCACAACA  
TTGAAAGTGATTCTAAACCTGACTTCTCTGCAGTGGTGTCTGGTTTCCAACAGACTGATAAACTCAGTGCCA  
GTGACGTCATTCACTGACATTTAAGGAAATAAGCAGTGCATATAACCAAGTGAGACTGCAAGGACACCTC  
AGATCATACTCGTGACGAATCTGAAACCACGTGGTATTTACGAGTTCTCAATCAAGGCTAGCAATCGTATTGGA  
ATCAGCCCTTCGAGTGATCCTGTATTGATACGAATGGAAGTTG

### **DNMT**

F30U4RL01CQ90Z + RACE

CTACGGATGTTTGTGGTGTATGCAGAAGATGCAGTGGATGAATCAGTGGCGTTATGCAATCCTAAGCTTTCACTG  
TTTTAGATGGGGATATGGGCTCAGATGATTTTGTGGACAGGCCACAGCATAAGATTACAAATTTTAGTGTGTAT  
GACAAGAACACACATCTCTGTCTTTGACAATGGACTAATTGAGAAGAATAAAGAACTAATGATGAGTGGTTTC  
CTCAAACCAGTTTATGAAGAGGACCCATCCATTGRAGGTGGAATCGCAACGAAGAACATTTGGTCCAATTAATGAA

TGGTGGATTGCAGGATTCGATGGTGGGGAAAAGGCATTGATCGGATTTTCGACAGCATTTCGCTGAGTACATATTG  
ATGAAACCATCTGATGAATATGCAGTGTATGATGGATGCTGTTGTTGAAAAAATCTACATGAGYAAGGTCGTGATT  
GAATTTCTCACAAGGATCCTGAATCGAGATATGAAGACCTGCTTAATAAAGTACAGACGACAGTGCCTCCAGAA  
AACTGTCCAAGCTTCACTGAAGATGCTCTGCTGAGGCATGCACAGTTCATCGTGGAGCAGGTTGAGAGTTACGAT  
TCTGTGCTGACGAGGAAGAGAATTTACTAGTAACAACCTCCTTGTATGCGTGACTTAATCAAACCTGGCTGGTGA  
ACCCTTGAAAAGAGGAGAGCATTACGTGGCGTTTCGATTGAGACCAGACTCGAAAAAGAAAAGGACCAACCAAG  
GCAACAACCACTCCGTTAGTGAGATACATCTTTGAGTTGTTTTTCAAAGATCAAATTGCCAGTAAAAGTGACGAA  
GGACCGAGAAGAAAAGCGGTGTGGTATTTGCGAAGTTTGCCAACAGCCCGATTGTGGAAAATGTAAGGTTGCAAA  
GATATGAAGAAAATTCGGTGGTACTGGAAGGTCAAAGCAATGCTGTGTTTCATAGGAGGTGCCCGTACATGCTTCTT  
AAAGAGGCTGAAGAAAATGACGAGGCCGACGAATTTGACAATGATACAGAAAATTGTTTCTGCTTCATCACCACCA  
AAGCATAAGATTGGGAAGACCAAGATTATCAAGACAAAAGTGAAGTGGTTAGGAAGTCCCATTTTTGACCAAGAA  
AAGCCTATCTTACTATGACGCAGTTTCAATTAATGGCAAAGAGGTAAAAGATAGGTGATTTTCGTCAAAGTCTGCC  
CGATGATCCGATTTCGCCATTTGTTTATATGCCGCCTTGATACATGTGGGAAGATAAAGATGGAAAACAGATGTT  
CCATTCACAATGGCTTTACCGAGCCAGCGAAACAGTTCTTGGAGAAACTGGAGATGTGGCAGAAGTGTTTTTCTC  
AGATGATTGTGACGACAATCCACTTGGCTCTATCATGACTTCCT

Klon DNMT (T7-SP6)

AAGATGCAGTGGATGAATCAGTGGCGTTATGCAATCCTAAGCTTTCACTGTTTTTCAGATGGGGATATGGGCTCAG  
ATGATTTTTGTGGACAGGCCACAGCATAAGATTACAAAATTTTAGTGTGTATGACAAGAACACACATCTCTGTCCTT  
TCGACAATGGACTAATTGAGAAGAATAAAGAATAATGATGAGTGGTTTTCTCAAACCAGTTTATGAAGAGGACC  
CATCCATTGRAGGTGGAATCGCAACGAAGAACATTGGTCCAATTAATGAATGGTGGATTGCAGGATTCGATGGTG  
GGGAAAAGGCATTGATCGGATTTTCGACAGCATTTCGCTGAGTACATATTGATGAAACCATCTGATGAATATGCAG  
TGTTTATGGATGCTGTTGTTGAAAAAATCTACATGAGYAAGGTCGTGATTGAATTTCTCACAAGGATCCTGAAT  
CGAGATATGAAGACCTGCTTAATAAAGTACAGACGACAGTGCCTCCAGAAAAGTCCAAAGCTTCACTGAAGATG  
CTCTGCTGAGGCATGCACAGTTCATCGTGGAGCAGGTTGAGAGTTACGATTCTGTGCTGACGAGGAAGAGAATT  
TACTAGTAACAACCTCCTTGTATGCGTGACTTAATCAAACCTGGCTGGTGTAAACCCTTGAAAAGAGGAGAGCATTAC  
GTGGCGTTTCGATTGAGACCAGACTCGAAAAAGAAAAGGACCAACCAAGGCAACAACCACTCCGTTAGTGAGAT  
ACATCTTTGAGTTGTTTTTCAAAGATCAAATTTGCCAGTAAAAGTGACGAAGGACCGAGAAGAAAAGCGGTGTGGTA  
TTTGGCAAGTTTGCCAACAGCCCGATTGTGGAAAATGTAAGGTTGCAAAGATATGAAGAAAATTCGGTGGTACTG  
GAAGGTCAAAGCAATGCTGTGTTTCATAGGAGGTGCCCGTACATGCTTCTTAAAGAGGCTGAAGAAAATGACGAGG  
CCGACGAATTTGACAATGATACAGAAAATTGTTTCTGCTTCATCACCACCAAAGCATAAGATTGGGAAGACCAAGA  
TTATCAAGACAAAAGTGAAGTGGTTAGGAAGTCCCATTTTGACCAAGAAAAGCCTATCTTACTATGACGCAGTTT  
CAATTAATGGCAAAGAGGTAAAAGATAGGTGATTTTCGTCAAAGTCTGCCCGATGATCCGATTTCGCCATTTGTTA  
TATGCCGCCTTGATACATGTGGGAAGATAAAGATGGAAAACAGATGTTCCATTCACAATGGCTTTACCGAGCCA  
GCGAAAACAGTTCTTGGAGAAAAGTGG

**Pax 6**

F30U4RL02GHCJ6 rev

ACTGGTTCAATCCGACCAGGAGTTATTGGTGGAAAGCAAGCCAAAAGTTGCAACTCCTTCGGTAGTAAATAAGATT  
GCTGACTATAAGTTGGCGAATCCTACTATGTTTGCTTGGGAAATTAGAGACAGGCTATTGGCAGATAGTATTTGT  
TCACATGATAATGTTCCAAGTGTGAGTTCATTAACCGTATTGTAAGAAAATAGAATTAATGCGAATTGTGGGAA  
TGGGCAAGAT

Klon PAX6 28 (SP6-T7)

GGAGGTGTTAATCAACTTGGTGGTGTATTTGTCAATGGCCGTCCACTGCCTGACCCAGTACGACGTAGGATAGTA  
GAGCTTGCCACCAAGGTGTAAGACCCTGTGACATCTCTAGGCAGCTTAGAGTTTCCCATGGCTGTGTTAGCAAG  
ATTCTTGGGCGGTATTATGAGACTGGTTCATCCGACCAGGAGTTATTGGTGGAAAGCAAGCCAAAAGTTGCAACT  
CCTTCGGTAGTAAATAAGATTGCTGACTATAAGTTGGCGAATCCTACTATGTTTGTGTTGGGAAAATTAGAGACAGG  
CTATTGGCAGATAGTATTTGTTTACATGATAATGTTCCAAGTGTGAGTTCATTAACCGTATTGTAAGAAAATAGA  
ATTAATGCGAATTGTGGGAATGGGCAAG



**Tbx1**

03\_aurelia\_rc\_finalASM\_7593

AAAGACGTCATTTATCTTCATCTTCAGAGGATTCCAATCAATGTTCCGGATGCCAACCGTTATATTGAGAGGCCAAA  
CAGTCACCCACAAAAAACTGGCAGGACAATTGACACACAAATGGCACAGATTGCTTGTGATCTAGAAAATGAAAG  
CGTTATGGCAAGAATTTAATACACTTGGAAACAGAGATGATTGTTACGAAAGCTGGAAGGAGAATGTTCCCAACAT  
ATCAGATTGATTATCAGGAATGGATCCAAATCTGAGATATGTTCTCATGATGGACTTTGTGCCAGTCGATGACA  
AACGTTACAGATATGCGTTCCATAGCTCAAAATGGCTGGTTGCCGAAAAGCAGACCCTGCAGTCCCTGGGAGAG  
TTCATGTCCACCCAGATTCACCGAACACGGGAGCACACTGGATGAAGCAAGCTGTGTGTTTTGATAAACTAAAGC  
TAACGAATAACATCATGGACAAGAACGGACATATTATCCTAAACTCGATGCACAAGTACCAGCCTCGGTTGCATG  
TAGTCGTTTTGTGAAGGAGACAACAGCTCACAACCTGAACCACAGCTTCAACAGCAACAAATCAAATATTGAAAATT  
CCAAGAAGGATATTGCTCGAATGTTTTGTTTTCCAGGAAAAGTGAATTTATGGCAGTTACTGCATATCAAAATCACA  
TGATCACACAATAAAAATAGACCAGCAACCCATTTGCAAAAAGGATTTCAGAGACTGTGAAGCAGAAGCTTGCATT  
AATCAAGTAATGAAAGAAGGAACCCCAAAAAATGGAGGCAGAACGTACCCTCCTTCCCGCACTA

Klon TBX (T7-SP6)

GCAGGACAATTGACACACAAATGGCACAGATTGCTTGTGATCTAGAAAATGAAAGCGTTATGGCAAGAATTTAATA  
CACTTGGAAACAGAGATGATTGTTACGAAAGCTGGAAGGAGAATGTTCCCAACATATCAGATTGATTATCAGGAA  
TGGATCCAAATCTGAGATATGTTCTCATGATGGACTTTGAGCCAGTCGATGACAAACGTTACAGATATGCGTTCC  
ATAGCTCAAAATGGCTGGTTGCCGAAAAGCAGACCCTGCAGTCCCTGGGAGAGTTCATGTCCACCCAGATTAC  
CGAACACGGGAGCACACTGGATGAAGCAAGCTGTGTGTTTTGATAAACTAAAGCTAACGAATAACATCATGGACA  
AGAACGGACATATCATCTAAACTCGATGCACAAGTACCAGCCTCGGTTGCATGTAGTCGTTTTGTGAAGGAGACA  
ACAGCTCACAACCTGAACCACAGCTTCAACAGCAACAAATCAAATATTGAAAATTCGAAGAAGGATATTGCTCGAA  
TGTGTTTTTCCAGGAAAAGTGAATTTATGGCAGTTACTGCATATCAAAATCAGATGATCACACAAC

**chordin**

3169 fA\_c02\_1186

GATAAAAGTCAACGACTACTTAACTGACACTTCCTTCTATGTGCGATTTGACCAAAGAAGAGAATGATTACATCCG  
GGACATAGGGATTACTTATTATGGTGATCATGGACACAAAACAGCAGATACCTCACCAATGGAAGAAGGCAGTGA  
CCTTAAAGTAAGGAAAGCAGCAATGCCACAGCATTACCAAAAATCAGGCATTCTGAGAAAATACTCAATGGAGAA  
AATAGCTGCAAAATGAAGGGCCAATATCCATAGAGATGCCAGATATAAAGAAAGGCTCAATAGGATCATTGGAAG  
GCATAGAAGAAGGAGGAGGGGACTACACGGACAACAGAAAGCCTGTCTATGGTGAAAAGAATATCAGCATTGAT  
GGATCAATCAAATTCGACATTAACCTGGAATAATGCCAAAACCATATGTATGAAGATCTTCTCGAAGACATTT  
CATTGCAAGACGTGAACTCTGTACTGTATCATGAATCCCAGTATGATTTGTCAGGAAAAGACCTTAGAAGAAACAT  
TTGAATACAGTTTGA AAAACAAGAAAGCCAAGAGACATGAAATATACTTACTACAGTCTTAGTGTTGTTCTAAATG  
TAGGCTGGTGCCCTGACAAGAATTCTAAATTATGGGTGAGAAAACAAGATTACCTTCTGATGTACAGTCAAAG  
TTCAGTTGGAGGAAGACCAACACGACTACGAAATCAATGTTCTGCTGTTTATTATTGTAGGGGATCATTGTGCA  
GACATTCTCCAGAAGAAAGAAAGCCTACACCTCCCGTTTATAAGCCAACCTGCTGAGAAGGCTCCAGTTTTGTTG  
CTATTACAGTCACTGAAAAGAACAGAGAGCCCGTTATTTTCAGAAAAGACTTCCAACCAAGGAATACCACAAGTTG  
ATGATCTTTCATTA AAAATCACGCCGTTTACAGTTCTAGATAAGCTACCACAGTTTTGAAATGCATTGACCATG  
CTACTAAGAAAATATACAAGCCAGGTGATGAATGGTATGGTGATGATGACTGCATGCACTGTACATGCTCTGCAG  
ATGGCCTGACCGTCTGTGCTACACCAATGTGTGACTTGCCTTCTGCAAGACTGGGCCGGCCCTCAAACGAAAGG  
AAGATGCTGTCTATTTGCCCGGAGGATCGCACATGCAAACTGAGAAAAGGAGAACCCGAGTAGCCTACAAAAGA  
ACGATGGCAACAAGCTGATTGCAAGGTTTGTGAATGCACTAAAGATGGTATTAATGTGTGATCCTACAACATA  
GAAACAAAATTTGCGCTTATCCTGGACACTGGAATGGTAGATGCACACCTATCTGCATTGATGATGCATGCCTCC  
TCGACAAATAGAGGAACCCAAAGGATGCATAAAAACCAATGGAGTATTTGCACCATTTTCATCAAGCTGGAAAAC  
GAACAACTGTACAATATGCCGGTGAACAAGACTATGGTGTGATGATGCCAGAAAGATTGTACATTGAGTAAAGA  
TAACCTGCGAAAATCAATTTGATTTGCCAGGAAAATGCTGCCAGTCTGCTTATTA AAAAAGTGTCAATTTGATAA  
TTGGCATTATTCGCAAGGAGAGAAAATCACCAGAGAAGATGGTACAGCTTGCCAATGTGAGAGGGGAGTGGCT  
TTGTACTGAAAAGAACATGCAACTTGCAAAAGATCTTCTGGCAAAGACTACCAACTGGGTGAAAGTAGATTAGA  
AGATTGTAACACATGCAATTTGTTCTGAAAAGGGCGATGGCCCTGTACTACGATTGCTTCAAACGAAGCCTCT  
GAAGGATGATGCTGATCTACTAGATCTCCCATGAGATTTTCATCTCTGACGTGATCATTTCAGACCAAAAAGGAATG  
CCAATAGTGACAAGTTGATCATGTTTTGCCACATATTTAAATACTATAGTCATTTGCCAGAAAATTTATCTGTG

GA CTG TTTAAATTTAAGGCAGAACGGAAAAGATATATATTTCTTTTCTTTATAACCTGGGTCTCTGAATAGTAATA  
TTTCTCAAGTAGACTTTACTTTCAAGGGAATATATTATCCTTTTGTACCC

Klon Chrodin (T7-SP6)

GATCTTTCTCGAAGACATTTTCATTGCAAGACGTGAACTCTGTACTGTATCATGAATCCCAGTATGATTTGTCAGG  
AAAGACCTTAGAAGAAACATTTGAATACAGTTTGAAAACAAGAAAGCCAAGAGACATGAAATATACTTACTACA  
GTCTTAGTGTGTTCTAAATGTAGGCTGGTGCCTGACAAGAATTCTAAATFATGGGTGAGAAACAACGATTACC  
TTTCTGAYGTCACAGTCAAAGTTTCAGTTGGAGGAAGACCAACACGACTACGAAATCAATGTTCTGCTGTTTATT  
ATTGTAGGGGATCATTGTGCAGACATTTCCAGAAGAAAAGAAAGCCTACACCTCCCGTTTATAAGCCAACTGTG  
AGAAGGCTCCAGTTTTTTTTGCTATTTCAGTCACTGCAAAAAGAACAGAGAGCCCGTTATTTTCAGAAAAGACTCCA  
ACCAAGGAATACCACAAGTTGRTGATCTTTTCATTAATAAATCACGCCGTTTACAGTTCTAGATAAGCTACCACCAG  
TTTTGAAATGCATTGACCATGCTACTAAGAAAATATACAAGCCAGTGATGAATGGTATGGTATGATGACTGCA  
TGCACTGTACATGCTCTGCAGATGGCCTGACCGTCTGTGCTACACCAATGTGTGACTTGCCTTTCTGCAAGACTGG  
GCCGGCCCTCAAACGAAAGGAAGATGCTGTCTATTTGCCCGAGGATCGCACATGCAAAAAGTGAAGAAAGGAG  
AACCCGAGTAGCCTACAAAGAACGATGGCAACAAGCTGATTGCAAGGTTTGTGAATGCACTAAAGATGGTATTAA  
ATGTGTCGATCCTACAATAAGAAAACAAAAGTGCCTTATCCTGGACACTGGAATGGTAGATGCACACCTATCTG  
CATTGATGATGTCATGCCTCCTCGACAAATAGAGGAACCCAAAGGATGCATAAAAACCAATGGAGTATTTGCACC  
ATTTTCATCAAGCTGGAAAACGAACAACGTACAATATGCCGGTGCAACAAGACTATGGTGTGATGCCAGAA  
AGATTGTACATTCAGTAAAGATAACTGCGAAAAATCAATTGATTTGCCAGGAAAATGCTGCCAGTCTGCTTATT  
AAAAAGTGTCAATTTGATAATTGGCATTATTCGCAAGGAGAGAAAATCACCAGAGAAGATGGTACAGCTTGCC  
AATGTGACAGAGGGGAGTGGCTTTGTACTGAAAAAG

**melanocortin**

celera\_v01\_contig\_15429 rev

AAAGTAAACTTGGCTCTGCATGAAGTTTTAATTTACAGTAGGATGAACTCGAGTTCGAACTCAACTACAACGGCT  
GTCTGGACAATACACTGGTACATAAGTGCACGATGCTGGCTTGTCTTTGGATCAACAGGCCTAATTCTCAACATT  
ATCGAACTTATCTTTCTGATTTTCGAAAAGGAAAACATCATTTCAGTATTTCGGGGTCACTCTTCTTAGTTTATGTGCA  
GCTGACATTTTGGCATGTTTATCATTCACTTTTGTGGTCTGTTTCGCATCGCGAAGTACTCAGGGCGTTTGCCTG  
TAAAGATTCTGCCAAATACAACGTTTTATGAGATTTGGAAAGCAACGAACGCATTTATCGTTACGTCAGTGAGTG  
CTTCGGGCCTGCACATCACAGTAATTGCCATCCAGAGGCTGTGCTCAGTGTCTTGCCATTAAGATTTCGTTTCAGT  
GTTTACGACAAAGCGATGTGTTGCCGTGCTTGTAGCTGCATGGGTGATCAGTGCCACCGGTGGACTACTTGTTC  
TTTCATTGGATATGCCCTTGTGTTAGGGATATCATGTTATTTTCATGGCCGTAGTTGCCATCATTATTCGCTTATT  
TACACTGCCATCAGTATAAGGATTTGCCTCAAAGCAAGGGAGCGGAGGGTCATGACAAGCAGTGACGAAGGCTCC  
AGCCTTAGAGTTGTTTTTTCATTCTATAGCAGTGACATTAGCTTATTCAGCCTGCTCATTCCCATTGGTTGTTTATG  
TTCTGTTCTCGCAAGGAATTTGTCACTTTATGATATTGTTACCCCTCTTGTATGTATCAACCATTTTCGTGGACCC  
TTTGATATACTTTCTTCTGAACAATCGTAATTGTCAAAGACCGCACAGACCCGTTGGCCTAAATGCTGGAAGGAG  
GAAAGACTCGCTTGAGAAAGAATAACTACAGCAAATGTCATTTGAAGTGATGAATATTCTCAATCTTCTTTTCA  
TTTTGAGAAGGGAAGACATGTCTCATTGTTGTTTCAGAGCATGGGCTTTAGGAAACGCTGAATTTGAAAGAAGGT  
TTATATATGATACATCGAGTCATTCTATTCTAATTTATTATTTCACTCGT

Klon Melanocortin (T7-SP6)

GGACAATACACTGGTACATAAGTGCACGATGCTGGCTTGTCTTTGGATCAACAGGCCTAATTCTCAACATTATCG  
AACTTATCTTTCTGATTTTCGAAAAGGAAAACATCATTTCAGTATTTCGGGGTCACTCTTCTTAGTTTATGTGCAGCTG  
ACATTTTGGCATGTTTATCATTCACTTTTGTGGTCTGTTTCGCATCGCGAAGTACTCAGGGCGTTTGCCTGTAAA  
GATTCTGCCAAATACAACGTTTTATGAGATTTGGAAAGCAACGAACGCATTTATCGTTACGTCAGTGAGTGCTTC  
GGCCAGCACATCACAGTAATTGCCATCCAGAGGCTGTGCTCAGTGTCTTGCCATTAAGATTTCGTTTCAGTGTT  
TACGACAAAGCGATGTGTTGCCGTGCTTGTAGCTGCATGGGTGATCAGTGCCACCGGTGGACTACTTGTTCATTT  
CATTGGATATGCCCTTGTGTTAGGGATATCATGTTATTTTCATGGCCGTAGTTGCCATCATTATTCGCTTATTTCAC  
ACTGCCATCAGTATAAGGATTTGCCTCAAAGCAAGGGAGCGGAGGTCATGACAAGCAGTGACGAAGGCTCCAGC  
CTTAGAGTTGTTTTTTCATTCTATAGCAGTGACATTAGCTTATTCAGCCTGCTCATTCCCATTGGTTGTTTATGTTT  
TGTTCTCGCAAGGAATTTGTCACTTTATGATATTGTTACCCCTCTTGTATGTATCAACCATTTTCGTGGACCCCTT  
GATATACTTTCTTCTGAACAATCGTAATTGTCAAAGACCGCACAGACCCGTTGGCCTAAATGCTGGAAGGAGGAA  
AGACTCGCTTGAGAAAGAATAACTACAGCAAATGTCATCTGAAGTGATGAATATTCTCAATCTTCTTTTTCATTT  
TGAGAAGGGAAGACATGTCTCATTGTTGTT

**MSX**

02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_13042 rev

AACACGCGAACCCGTTCTCGGTTGAATACATCTTGAGTTGCGAAAAGTTCGAAAAAAGTGCAGTACGAAACATAA  
CACAGGTGGAGAATAAAACAATCAAGGGAGGCTCTTGATTATTCATATGTAACAAAGGTTACAATTCTATGGGAT  
ACACTCAGCCACCAGCGGCAACAACGCCATCAGACGTCGAAACAATAGAGTTCAAATGGGACTTGACGAAATGCT  
TTCTACGCAAACACAAAGCCAACAGAAAGCCAAGGACACCATTTTCAGCAACACAGCTGCTCTCCCTGGAACAGA  
AATTCAAACGAAAGCAATATCTATCGATAGCCGAAAGAGCAGAACTTTCTGAAAATCTCAATCTATCTGAACAGC  
AAGTAAAAATTTGGTTCCAAAACCGACGAGCGAAAAGAAAAGAAGAACTAAAAGAAGCTGAAATGGAGAAAATGA  
GA

Klon MSX (T7-SP6)

AATACATCTTGAGTTGCGAAAAGTTCGAAAAAAGTGCAGTACGAAACATAACACAGATGGAGAATAAAACAATCA  
AGGGAGGCTCTTGATTATTCATATGTAACAAAGGTTACAATTCTATGGGATACACTCAGCCACCAGCGGCAACA  
ACGCCATCAGACGTCGAAACAATAGAGTTCAAATGGGACTTGACGAAATGCTTTCTACGCAAACACAAAGCCAAC  
AGAAAGCCAAGGACACCATTTTCGGCAACACAGCTGCTCTCCCTGGAACAGAAATTCAAACGAAAGCAATATCTA  
TCGATAGCCGAAAGAGCAGAACTTTCTGAAAATCTCAATCTATCTGAACAGCAAGTAAAAATTTGGTTCCAAAAC  
CGACGAGCGAAAAGAAAAGAAG

**CL5**

aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_5

AAGCAAAGTAAGGTAAATAACAAACGRSAAGMAGTAVGTMGGGGGAAGCAGTGGTATCGGGGGCAGAAGCTTCT  
TATGGGAGCAGAGCGTCAGAGCGCGGAAAAGAGAAAGAAGGCGTCTGAAGAGCTGTTTGCAAAATGAAGATCCTT  
GCATTGATCCTGTTGATTGGTCTCTCGGGCATAGTTATATGTA AAAAGTGCAGAGGAGATTGGCACTGATGAAGCA  
GCCGTCGCTGAGGAAAATGAGCCAATCGAGGCTGTAAAGGAGGATCAAGACGAGGATGAGCTAACCGAGCTAAAA  
GAAGCCGACGATGAAGACCCAGCAGAAAACGGAGGACAGTGATGAAGGTGCAGACGCCAAGCCGTTCTGGAGACGA  
CGCAGAAGACGCAGACGTTATGTAAGACGCAGACGTTATGTAAGACGCAGACGTTATGTAAGACGCAGACGTTAT  
GTAAGACGCAGACGCAGAGGTGTTGTCCGCCGTGTTGTCCGCAATGCAAGGAAATGGGTCAGCGGAAGAGGCAGA  
AGATGGTTTCGGCAAAAAAGACACTATGCCGCGTGAGTAGGCATTTATCGGACTGACAATTCTCAGCTTGTTTTTT  
CTTTTAATTTTGGTAGCTACTGTCATTAATTATAATCTTACGTATTCAACGCTGCTGATTGCAACGAAAA  
AAAA

Klon CL5 (T7-SP6)

CAAATGAAGATCCTTGCAATTGATCCTGTTGATTGGTCTCTCGGGCATAGTTATATGTA AAAAGTGCAGAGGAGAT  
TGGCACTGATGAAGCAGCCGTCGCTGAGGAAAATGAGCCAATCGAGGCTGTAAAGGAGGATCAAGACGAGGATGA  
GCTAACCGAGCTAAAAGAAGCCGACGATGAAGACCCAGCAGAAAACGGAGGACAGTGATGAAGGTGCAGACGCCAA  
GCCGTTCTGGAGACGACGCAGAAGACGCAGACGTTATGTAAGACGCAGACGTTATGTAAGACGCAGACGTTATGT  
AAGACGCAGACGTTATGTAAGACGCAGACGCAGAGGTGTTGTCCGCCGTGTTGTCCGCAATGCAAGGAAATGGGT  
CAGCGGAAGACACAGAAGATGGTTTCGGCAAAAAAGACACTATGCCGCGTGAGTAGGCATTTATCGGACTGACAAT  
TCTCAGCTTGTTTTTTCTTTTAATTTTGGTAGCTACTGTCATTAATTATAATCTTACGTATTCAACGCTGCTG

**mesoglein**

Cl3975 fA\_c02\_5805

GGGGACTCTTCTCCTGGCACAGACAAAGACAGAAGAGGTCAGTGGCGCAAAAAGAGGTTCTTTTTGGCACAGAGGG  
CATCAAAATGAAGTTGCTTGTCTCCATTGTTATTTTTGCTTTTCATCTTTTCGAGATCTCCTTGCAACAACAGGTTGCT  
AAAGCATGCGTGGCCCGAGATGATGCACAGGGGCATTATACATGTAATGATGATGGAACCAAAAAATGTATGCCA  
GGCTGGTCAGACCAAGCAACAACACTGTTTACAAGATTTCGAGATCAGAAGTATCCTGTGGAATAAACTTCATGAGG  
ATTGAGATCGACAGAAAGTACTTTCGACCCAACTAAATATTTCCCGCATTAGCTTGAAGGACGAAAAGTTGTAAGTCT  
TCTCTCTCGGAGACAAAAATCGTCTTGGATTACAGACCACAGAAATGTGGATCAACAAAGATTGAAAACGAGAAT  
TACATCATCTACCAAAACGAGGTTTACATGAAAGCAATCCCAACTGGTAAAAATTTGTGACAAGGGAACATGACATC  
AGGGTCAGTTTTTCATGTTTCATACAACAAATCTGGCATGGTCAGCATTCAAGCTTTCACTCCAATAACTATTGTT

GATGTCAAAGAAGATGGCTTTGGTGAATTCAGTTTCATTTCAAATGTTCACTGACAACACCTACAGCAGCGCA  
CATAAGAAATACCCAATCGAAGCGAGATTGACTGACAATTTGACTTTGAAGCAAACACGACTGCAAATGATAAT  
GATTTGGTGATTTTGGATTGATCAGTGTTACGCAACACCTACCATGGATCGTAACAATGCTCTCAAATACACTTTC  
ATAGAGAACAGATGTGCTTTGGAGGACAATGTCAAATTCGTGAAAGCAGAACGCAAGAAGCAAAGATTGAGCAT  
GCAAGCATTACATTCATCCAAGAAATTTCAACAGTCTATGTTTCATTGTGTGCTATTGATGTGTAGAAAATCGGC  
GACATCAGGACAGTGTGTGAGTGGATGTGAAGGAAATAATATCAACAGGGCTCGTAGGGATCTTTCAAGCTACGG  
TAGTGCTGATAAGAAATCTTATTCCAAATACAAGTTGCTGGATATTGGACCAATTCACAGGAGAAAACGTAGCAT  
TGGTTCTGGAAACAGTGGTGCACCAAAAAAGCAGTCTTTGTTCAAGAGCTGGACAATCGTCGGTTTGGTGACCGG  
TGTTGCTGTCTTGGTTTGGTTCATTGCAGGAATGGTTCTGAAAATGAGAAGATCCAGACGTGCAAATAATATTCC  
AATCCATGAAATCGTCGCTGAGCCACAAGAAAAATCTGATAATCAAATCTGATTTAATCAAGAGACGAATCATT  
ATTAATCACTATGAAACATTGATTTGTTGATTTATCAAAGATCAGCATAAATAATTGAATGTTGATTTTATAAACC  
ATCACAATCCCTTTTATTTCTTACGGATCCTCCGTTGGATGGGCTGAAAATATCCTTGTTACTTTTAAATTTCT  
GTTTCTTCTTTCAAATA

Klon Megl (T7-SP6)

ATTGAGATCGACAGAAAGTACTTCGACCCAATAAATATTCCTCGATTAGCTTGAAGGACGAAAGTTGTAAGTCT  
TCTCTCTCGGAGACAAAATCGTCTTGGATTGAGCACCACAGAAATGTGGATCAACAAAGATTGAAAACGAGAAT  
TACATCATCTACAAAACGAGGTTTACATGAAAGCAATCCCAACTGGTAAAATTTGTGACAAGGGAACATGACATC  
AGGGTCAGTTTTTTCATGTTTCATAACAATACTGGCATGGTCAAGCTTTCACTCCAATAACTATTGTT  
GATGTCAAAGAAGATGGCTTTGGTGAATTCAGTTTCATTTCAAATGTTCACTGACAACACCTACAGCAGCGCA  
CATAAGAAATACCCAATCGAAGCGAGATTGACTGACAATTTGACTTTGAAGCAAACACGACTGCAAATGATAAT  
GATTTGGTGATTTTGGATTGATCAGTGTTACGCAACACCTACCATGGATCGTAACAATGCTCTCAAATACACTTTC  
ATAGAGAACAGATGTGCTTTGGAGGACAATGTCAAATTCGTGAAAGCAGAACGCAAGAAGCAAAGATTGAGCAT  
GCAAGCATTTA

*myosin tail*

03\_aurelia\_rc\_ephyra\_finalASM\_3300

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGGGCCCTTTGGCAACTTCGAAGAGATGGTTGTTAGGTAGAACATGCCAA  
TGGAGAAAATCGAAGAAGAGTCTGAAGACTCTCTGGAACGTGGAAAGCACGTTACCGACATCTAGAAGATGAAT  
TCAAGAAGGAAAAAAGATTGAGAGATAAGATAGAAAGATATTGCAATGACAACCACTGCGGGGATCATGGCAGC  
CATGCACCTGACTCGGTACGTTGAGAGATGTACAGACAACGGGAAAACAGAAAGTGGCAAAAATACGAACATAAGATT  
GAGTTGGCCATGAATTTCTCATGAAGAAGCAATGTCAATGGCCAAAATTTCAATTTACTGAGGAACTTGATCGCCTT  
CAACGGGAATTCGACTATCAAGGAACCTAGTGCTACACAGCAAGCACCGAACGAAGAAGCATCTGTCTCGATG  
ATCGAAGCAAATTTTGAAGTCAAAAATCGAGATTGAGCTTGAAGAAGTTCACCAACAAAAGACAAGTCTTGAG  
TTCGAAATCAAACGACTTCGAGTACGGCTCGGCGAGGAGACCAAGGCCAAGGAGACATTCGAAGAACAATGAAA  
GGTGCTATGGATGAGTTAGATGTGATGCATAAAAAGATTGGACGAAGAACAATTCGAAGGAATGAATTGAAAAG  
GAGTTTGAAGCCGCTGCGGAGGAACTTGAAGAATGGAAAAGTCAACAATCAAGTCTGGCCCTGAGCGACGTTT  
GAGCATCAGAATGCAGGAAATTTGATGATGCAATTCAAAGAGCTGAAAGTACTTCAATGACTATGGAAAGAGTTA  
AAGTCCAAGAACAATGCTGAGAGCAGAAATCAATTTGGATGTCAGTACATCTCCAGAATCGGGAAAGAAAGGA  
TTGACAGGATTTGCATTAGAACAAGAGTTACAGGAATTCAGATCAAATTTGCTGATTCTGAGCAACAACCTTCGA  
GTCTGGAAGAAGAAATATGAAGAATTGAATTACGTCAAAGAAGTTTTGGATGAAGAGGTTGCAATGAAAAAAGA  
CCAGATCAGAAAATGGGAAAAGACATGCGAAGAATCAATCAAAGTTAATTGAGATGGAGAAAATCAGACACG  
AGAAGATTGCACTGGAAGGAAAAATTAGAGACATGACTTCGTTTGTGGAAAGAACAGAGGGATTGATTGATGAA  
CTGGAACAAGCAGAATTTGACAAGAAAGCTCTCAGAGTTGAGATCAGAGATAGAGAAGATCAGATTTCCAACCTC  
GAAGACAGTGCATTAGATTTGAACCAACTCATTGAACAATGAATAAACAGATTTCTGAGAAAGATGGCAAGAT  
CACAGATCTGAGTGTGAAAATGAAAAGATTGAATATTACATTTGGAAGGAATTCGATCTTCTTTTATCTTCAGGG  
AATGGGAAAAGAGTGCATTGGAACAAAAAGTGCACCAGTTAAATGCAAGACTCGTTGAGATCCAAGGCAAATATG  
TCAATGAGCAACAAGAAAAACAAGAGTTGAGAAGAAATTTTTCAGAGAATCGACTGTCCGGAGTTGTTCAATGAAA  
GCAAAAGTTGAATGCGAAAAATCAAGAATGTTGATGATTATTATGGATTGAGAATGCAGCTCATCCAAAGATT  
GACTGACACTGAAAATGTTTTACGGATGCTCAGCACAGAGCAAGAGTGGAACTTCGGTGAACCAACAATCAGC  
CCGTGCAAGTGTAGGTCTTCTGCCTCAACCACATCTCTCCAGATAAACAGGACTACGAAATCATGGAATGGAA  
AGGAAAGTATGATGAAGTCTGTCTGAAATCGAGAAAGCAGAAGACGAAGTAAAAGTTATGGCAGCACAGGTTG  
CAAGACAACAAGTTGAACTTGAAGAAAGGACCGATGAACTTCAAGAAGTACGGATGAAAAGGCTAAAGTTGAT  
GAAAAAATGACGATACTAGTTTCAAGAAATCCGAGAATGAAAATCGAAATTTGAAGACCTCAAAGAATACAACAC  
AAAGCTGAACGAAGACATCGTGAATTTGGATAATACAATCAAGGATATGGAAGCTGCGTTTGAAGAAGATGCCA

ATGCTAAAGTTATTGAAATTGCTGAACTGAAAACAGCAAACGAAGATTTGCAAGATGCATTGGATATTGTTTCTA  
AAGAAGCTGCCAAAGTCAAGAAAGAAAACAGTGAGCGTGCATCAAAAACGAAAGAAATTGGAAATGAAGTAGAA  
GATCTCAAATTTGAAAACGAGAAACTACGGGATTTGAAGAGAGATCTCGAATGGAAGATAAAGAACCAAGCCAT  
TTCCCTTGAAGAAGAAACAAAGGCACACAAAGAAACTGACGCTGAAGTCTTGCAGGAGAAAAGAAAATCAAAG  
AATTGCAGAAATTAAGGAGCTAGAAAGCAAGGAAGGTGATCCGAAGAGAATGAAAAGAAAATGAACAGAAA  
ATGACGGATTTGAAGAACAATTTGAAAGCAGAAAAAGAAAGAAAGTGAAGATTTAGAAAGCAGAAAATAGTAAAT  
GAAAAAGAAATTAAGAGATGCAAGAACCGAGGTCGAGGAAGAAATGGCTGCCAAGGATGAGGAGATCGTGGAAC  
TGAAACAGAGTGCTAAGGATGCAACGAAACAATCAAAGGAGATGAAGCTGAAGCTGAAAAGAAAGCTACTGATGCG  
CAGGAGCTTGCCGAAGAAGTGAAGAAAGTAGAAAAGAAATTTAAAGCTGCAACCATCAAAATGGAAGGACT  
TGAGAAACCTGATAAGTATACACCTGATGCCCTGGAATCTCATCGAGAGCTGACTAGGAAAATTTATGGACTTACA  
GACTGCTTTAGACGAAGAACTGATGCAAAATGAAAGGGCGAATGACCAAATCAAAGAGCTCAAAAATAAACTCA  
AGGGTGTCAAGGCCTCAGATTCAGAGCTGGAGACACAAGTCAAGGGCTAAAAGACTGCACTTGACGAAGAACAGA  
TAGCGCATAAGAATACAAATGACGAATTTGGTTCTTGTAGAAAGACGTTGAAGGAACTAGGAAGTTACTTGAT  
GAGGAGCGATCTGGAGCAACCAAAAAGAAAGGCTTTGAAGCTCCAAGAAAGTGTGATGAATCAAGTCAGCTTTG  
ATAGAGGAGAAAAGAGGATCATGCCAAAACCTGACAATTTGTTGAAAGAAATTCAGAGAGAATTTGAACGACGCCAA  
CAAGAAGATTAGCAGATTGAGAAATGAAGTTGAGGATGGACAAGAGAGTGAACAAGACGCAGCAGCTCTTCAA  
GAAGAATCAAGTCCCTCGAGAGGTCATTGGATGAAGAACAGGAGAGTCATGAGAAGACAGATCAAGAATTACAG  
GACACAAGAAAACAACCTGAAATCTGCTATGTGGCAAATCTCTGACTTAGAAGGACAACCTTGAGAATGCTGCACCA  
TCTTCAAAGAATGACAATGAAGACACAATCGCCTTGAAGAGAAAAGTGAAGGAGCTTCAAGACATTTCTGCGGAG  
GAGCAAGCAGATCATGAATTTACAGAAAAGAAATTTGAACAAAGCGAAGAAAGATTTAGAAAATGCAAAAGATGA  
AATGATGAAAATCAAAAAGAGTGGAGCTGGAACAAAAGAATCCAACGATGAAGTGAAGTGAAGGAAAATTTGAGGGAAC  
TCGAAGAGCGCTGGAAGAAGAGAGAAGCAATGCTCAGAATGCAGATAGAAAGATGAAGGAAAATTTGAGCAGAC  
TTGAAGGAAGCAAGCAAGCAATATCCATGAACTTCAAGAAACGGATGATGCAAAAAGCTACACAGGAAACCAAGG  
GCTGTGACGAAAAGATTTCTGAATTTACAGCTTGAACCTTGAAGAACAAAATCAAACAGTCGATGAATTAATGCAAG  
TCTGAAAGATGAAATATCGAAAAAGAAAGCGTTGAGTGATTTGAAAGCACTTGATGAAGATAAAAGAGATA  
TGGAGGAACGTCTAAACAAGAAGATCAACAAAACCTAAAAGATGATATGGAGGACCTTCGTGCAGACTGGCAAGATC  
AAAAGAATCTCGTAGCTGATCTTGAGACTGAATTTACATCGTGCAGACAGACGTTGAAGCAAATGCCAAAGAAGAGC  
TAGAGGAATTTCAAGAACTTGAGGGGCTGGATGAAGACAATTTCAACCCAAGGAATTTGCAAGTTTTCGTAGAAAAG  
CTCGAGAATTTGCATACAGCATTAGACGAAGAAATGAGTGCTCATGAAGAACTGAAAAGGAATTTACGCAAATTT  
AGAACAGAAATATGAAGTAGCAGAGAAAAGATTGACGAACTTCGTGAGGTCAAGAGTGAGGGTAAGAAGGATC  
TTGTCAAGTCAACGATGACCATTGAGATGAAATTTGAAGAAAATGGAAGACGAATTTGGACAAAAGAAAAGGAAAGCT  
CACCAAGAAACGATTGATGCTTTGACAGACTTCAAGAAAAGGCAAGGTCACCTTCGATCAAACCTGAAAACCTC  
AAAACCAATCTTCCAAAGGACATCGTTGATGGTATCACAGCTGAGGAGACAAATGAAAAGATTTTGGGCTTGGAG  
ACTGCTCTGGAAGAGGAGAAGGCAGCTTACGAAGAATGCTTGGCAGATTTGGAAGGAACACAGAAAAGTTGAA  
AGCAGTTAGAGTTTCACTTACTGCTGCTAGAGCAGAAGCTGAAGGGGCAACTGGAGGAGGTGGAACAAAATACAC  
TTCTGAATTTGAAAGTTCAACTGAAGAACCTTCAAACCTGCTCTTGGATGAAGAAATAGCGTCACATGAAGAAACACA  
ACAAAATCTTGGGATCTCAAACATGAACATAATGCCCTTACTGGAGAAGTTACCAAGTTGAAAGGAAAACCTCG  
AAAATATAGTTCTGCAACGATTTCCCTGGAAGAATTTACAGGAGAAGAAATGAAACGCTCCAGAAAGAGAATGAAA  
AATTCAGAGTTGAGATCCAAGTTTTTCAAGAGCTGAAAATGCCACACTTGATGATGAGCTCAACGAAATTTCTGATAA  
AGTACAAAGCTGGCCAAGTTACAATCCAAGAATTTGAAGGAACTAAAACCGAATTTGGAAGAAGAGAATGAAGAA  
TTGAAAGGATTTGTGCAGGACTTGGAGCTAGAATATCAGAGTACAAAGGAAGTGGGATGCCAAGTCAAAAAGT  
TGTTAGACGCAAAAGTTTCACTTACTGCTCCAACCGAAGGACCAGATAGAAAACAACCTTGTGCGAGAGAACAAGGGCT  
CAAGCAGCAGATAACTGATTTAGAGGATGAGCTCGATGATATTAACGAAAATCGAGAAAACCAAGATGGATG  
AAGATGAAGCAGCGGCAATGGTACAAGAAATGCAGGCACATCTCAGCGAAGCATTGATGCAGCTTGAAGCTGTGG  
AGGAGATACTTGAAGCGGAGGATTCATTTAGGGGTGAACTGAAAGTTACATTTAGAGATTTCAGCCAAAGATTTG  
GATAAGATTTAAAGTAGATTACGATGATGTAAGTGAAGGTTCTGGAGAGCAATCAGCTAAATGGATCAAGATTTCA  
GCGACGATTTGGCAATCGTATGTCAGATTTAGAGGATGCTCTTGGCGAGTCTCAAACCAAGATCAAAAACCTGTTGA  
GAAGTACAAAAGTAAAGATTGCAGATTTAACCAAGGAAATCAGAGCCTACCTTGACGAGGTTGGTGGCAATCAAGG  
AATGTCAGCCTACAAATGGAAGGCAAGTATGATGCTTTGCTGTTGAGTTTGAAGATCGGAGAGGGAACTTGC  
AGCCACCAGAGAGGAGCTTGGCTTCAATGACACGTGCTCATGGTGACGTCACACTACAGAAAATGCAAAAACCTACAGAAG  
AGAGACTAGACTTCTTACTGATCGCATTGATGAATTTGAAAGAGATTTGAAGCTTTGAAAAGAAAATCATTTG  
AAATGGAATTTGAAAAAAG

Klon Cl3300 (T7-SP6)

AAACTGCTCTTGATGAGAAATAGCGTCCATGAAGAAAACACAACAAAATCTTGGGATCTCGAACATGAACATAA  
TGCCCTTACTGGAGAAGTTACCAAGTTGAAAGGAAAACCTCGAAAATATAGTTCTGCAACGATTTCCCTGGAAGA

ATTACAGGAGAAGAATGAAACGCTCCAGAAAGAGAATGAAAAATTCAGAGTTGAGATCCAAGTTTTTCAGAGCTG  
AAAATGCCACACTTGATGACGAGCTCAACGAAATTCGTATAAAGTACAAAGCTGGCCAAGTTACAATCCAAGAAT  
TGAAGGAAACTAAAACCGAACTGGAAGAAGAGAATGAAGAATTGAAAGGATTTGTGCAGGACTTGGAGCTAGAA  
CTATCAGAGTACAAAGGAAGTGCAGTCCAAGTCAAAAAGTTGTTAGACGCAAAGTTCAGTTGCTCCAACAGAA  
GGACCAGATAGAAAATATCTTGTGCGGAGAACAAGAGGCTCAAGCAGCAGATAACTGATTTAGAGGATGAGCTC  
GATGATATTAACGAAAATCGAGAAAACCAAAGATGGATGAAGATGAAGCAGCGGCAATGGTACAAGAAATGCA  
GGCACATCTCAGCGAAGCATTGATGCAGCTTGAAGCTGTGGAGGAGATACTTGAAGCGAGGATTCATTTAGGGG  
TGAAGTAAAAGTTACATTGAGAGATTCAGCCAAAAGATTTGGATAAGATTAAGTAGATTACGATGATGTAAGTG  
AAGGTTCTGGAGAGCAATCAGCTAAATGGATCAAGATTCAGCGACGATTTGGCAATCGCATGTCAGATTTAGAGG  
ATGCTCTTGGCGAGTCTCAAACCAAGATCAAAACTGTTGAGAAGTACAAAGTAAAGATTGCAGATTTAACCAAGG  
AAATCAGAG

**Cl2**

db454\_aurelia\_celera\_v01\_contig\_4176 (CL2)

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGAAGCAGTGGTATCAACACAGAGTACGTCGGGGGAGTGGTGGC  
TGGAAGTGAAGAAGAAGGTGTTCCGAGGCTGCTGCTAATAAGCGAAAGGCTTCAAGATGAAGCTCATTATCTTG  
CTTATCCTTGGCTTGGCTCTTGAATAACTGGTGAACCGATAGCTGAAACTAACACCGTACTCGACGAACCCGTTG  
CTGATTTGGAGGGGAAATCAGATGAACTCATTGCCGATGGGGAGGAGAAATCGGATGAACCGGCTGCTGATGTAG  
ATGGGACATCAGATGAAGATGCCCTTCCCGAAGAAGATACCCTTCCCGAAGAAGATACCCTTCCCGAAGAGGATA  
CCCTGGCTGATGATGATGGTCTTAGCGAAGAGGAGCTAGATGCTTTTGAAGATCCTAACTATTTGGAGGAAATGG  
AGGAGTCCGATGAGGTGTAAAAAGACCCTATTGTTGTGCTTCTATCAAAGTTTACTGCAACTATTGCAAATATG  
CGAAAGCGTGCAAGAGAGTGACTCGCAAGTGCAGCCATAAATGCTAGACAAGGCTAACAGAGGGTGCAAGTACT  
GCAACCCGCTACGTACTTGAATTTGCTAAAACGAGTCAGAATCAGAATCAGAGTGAGAGTTTTTGGCCGCAGAA  
GACGTGCGAGAAGAAGAAGAAGANA

Klon Cl4176 (T7-SP6)

GATGAAGCTCATTATCTTGCTTATCCTTGGCTTGGCTCTTGAATAACTGGTGAACCGATAGCTGAAACTAACAC  
CGTACTCGACGAACCCGTTGCTGATTTGGAGGGGAAATCAGATGAACTCATTGCCGATGGGGAGGAGAAATCGGA  
TGAACCGGCTGCTGATGTAGATGGGACATCAGATGAAGATGCCCTTCCCGAAGAAGATACCCTTCCCGAAGAAGA  
TACCCTTCCCGAAGAGGATACCCTGGCTGATGATGATGGTCTTAGCGAAGAGGAGCTAGATGCTTTTGAAGATCC  
TAACTATTTGGAGGAAATGGAGGAGTCCGATGAGGTGTCAAAGACCCTATTGTTGTGCTTCTATCAAAGTTTA  
CTGCAACTATTGCAAATATGCGAAAGCGTGCAAGAGAGTGACTCGCAAGTGCAGCCATAAATGCTAGACAAGGC  
TAACAGAGGGTGCAAGTACTGCAACCCGCTACGTACTTGAATTTGCTAAAACGAGTC

**Toxin**

03\_aurelia\_rc\_polyp\_finalASM\_1270 rev

TCGGGGTACTTTTCGTCTATTTTCATTTTCATGGAAAGAGGTGCCTTCCAAGGAGCTCTTCTCTAGTCATTTTAGTGT  
CTGAAGCAACTGAAGTTTGTCTTGAAGCTGAAAATGGCTCTCAAAGTCTGCTGTTTCTCCTTCTGCTGACATTCCTT  
GTTACAAATGGAAACGTGACAGATCAAGAACTAGATGATGCGTTCAATGAGCTGGAGAGACAGTTGAATTACAA  
GCAAGAAGTCAAAGATCTCATCAAAGAGATAAAAAGATGAAGTGACGAAGAAACCTGATATCACTGCAAGAACTC  
TTGGAATGGCAAAAAGCCCTCAATCTGGCAGTTCAAAAATTTCAAAGTGGTAGAAGTGTGACATTGCGCAGGGTA  
TACTGAACGTGGTTTCTGGAATTGCCGAGAATCTTCCATTTGGCCAATTTATTGCACCAATTGCATCCTTGATAT  
CAAGTATCATTGGCATCATTTCTGGAGCTAAGGCAGAAGCAACGATGCGTGACGTGATCCAAGAAGTTGTTCCGCC  
AGGAATCCGATCACGTGTTATCAAGCGCGGCTGCAGCTAGCAGGCAAGAATTAACCGCTGCATTGAGTTACATTA  
CATCGAAACATAAAACAACTTTGGACAAACATGATGTGACAAGAATGGTCAGCCAAGTTCCAGTTACAACAGGAG  
TTGGAATTTCTGGCACTGTTGGAAAGTCGTATACAAAACAGGGCAACAACAACGGTTGAAAGCGAAGCAAAACAAT  
GCTTTTCGATTTCTGCGTGTGTACGCACAAATCGCGAGTTTCCGCGATATGGTGATCAGTGATTTGATTTATCAA  
TAAGAAGAGCTGGGGACAATGATGAAGCACACAGCTATGAAATTTGCGAAGGCAGGTTTTATCAACAGATATAAA  
CTGGCCTTGAATTTCTGAATCATCCCAAACCTGAACAAGCTGGAGTCGTCCATTTGTTTTCGTCCTGGGACATT  
CTGCAGAAAGCAAATATCTCCAAGCTTTTATGAAAATGTCAGGAGTTGCACCGATCCAAAAGATGGGAAGATCTG  
CTCACATTTCTGCAAGATGTCAAGTCACCCAAATATCACGCTTTTCTCCACAACAGTGGCTTTGTGAGACTATCAAT

GGGCTTGGTGATAAAAAGCCAAGTACTTTTCATACCGAGATCTGATGGCTACTGGAAGTTGAAAGG  
CAAATGGCTTTGGATCAACGATGGTTATGATACATCCTATGTTGCTGCAAAGTCATCAGAACCAGATCAAAGAGG  
GCAGTTTGTGTTGTGCACATACCCCAACAATATTGTACGATTGCAAACAGAAAATGGCCTAACAAGTTTGGAA  
AGATGAGTCGGGCTCGTATTACGTGCGTGTAAAGAGATGGAAGCTCGGGTGTGACACACGATTCCGCTTAGGCC  
ATGCAATGATAGAGGCACT

Klon Cl1276 (T7-SP6)

AGTTTGTCTTGAAGCTGAAAATGGCTCTCAAAGTCTGCTGTTTCTCCTTCTGCTGACATTCTTGTACAAATGGA  
AACGTGACAGATCAAGAAGTACTGATGATGCGTTCAATGAGCTGGAGAGACAGTTGAATTACAAGCAAGAAGTCAA  
AGATCTCATCAAAGAGATAAAAAGATGAAGTGACGAAGAAACCTGATATCACTGCAAGAAGTCTTGAATGGCAA  
AAGCCCTCAATCTGGCAGTTCCAAAATTTCAAAGTGGTAGAAGTGTGACATTGCGCAGGGTATACTGAACGTGG  
TTTCTGGAATTGCCGAGAATCTCCATTTGGCCAATTTATTGCACCAATTGCATCCTTGATATCAAGTANCATTG  
GCATCATTTCTGGAGCTAAGGCAGAAGCAACGATGCGTGACGTGATCCAAGAAGTTGTTCCGCCAGGAATCCGATC  
ACGTGTTATCAAGCGCGGCTGCAGCTAGCAGGCAAGAATTAACCGCTGCATTGAGTTACATTACATCGAAACATA  
AACAAACTTTGGACAAACATGATGTGACAAGTCGCGAGTTTCCGCGATATGGTGATCAGTGATTTGATTTATCAA  
ATAAGAAGAGCTGGGGACAATGATGAAGCACACAGCTATGAAATTTGCGAAGGCAGGTTTTATCAACAGATATAA  
ACTGGCCTTGCAATTTGAATCATCCCAAACCTGAACAAGCTGGAGTCGTCCATTTGTTTCCGTCGCCGTTGGGACAT  
TCTGCAGAAAGCAAATATCTCCAAGCTTTTATGAAAATGTCAGGAGTTGCACCGATCCAAAAGATGGGAAGATCT  
GCTCACATTCTGCAAGATGTCAAGTCACCCAAATATCACGCTTTTCTCCACAACAGTGGCTTTGTGAGACTATCAA  
TGGGCTTGGTGATAAAAAGCCAAGTACTTACNTTCATACCGAGATCTGATGGCTACTGGAAGTTGAAAG  
GCAAATGGCTTTGGATCAACGATGGTTATGATA

### Toxin

03\_aurelia\_rc\_polyp\_finalASM\_1549

GCGGGGGTATTCTGTTGACTTAAAGGTACAAGTTGGCAGTTTCCATCATGAAGCTTGAATAGTC  
ATCTTACATGTCTGTTTGTGGCCATAACTGGACAGACAATCAAGAGAGAGAAAAGATCTCTGTCTACATGCACAC  
AATGTCCTGAGGTCCTACACGAGAACACAGGTTCCAATGGTTTGGGATGATCAGTTGACAAGGGGAGCTGAAGAG  
TGGGCCAGGAAATTTGGTGAATGAAAGAGGGTTGAGACATTCGAGAGGAAATTATGGGGAGAATCTGTATGCTGC  
TTGGGGGCAATCTGCTAGCTGCGCAAAAGCAACTTTATCTTGGTACAGCGAAAATCAAAGACTACGACTTCAACCG  
AGGTGGATACAAATCTGGCACTGGTCATTTTACTCAAATCGTTTGGAAAAGGAAGTACAAGGCTCGGTGTTGGCAT  
AGCAACTAAGGGAAGCAAAGTTGTTGTTGTTGCAAGATATTCACCAGCTGGAAAATTCATGAGAAGATTTAGAGA  
ACATGTTACAGGCAAAAACCTGGCGCAAGAGTCCCTTCATTGAGTGAATTAGAAAATGGTTGAGTAAAGCCTCG  
TACTGACGGGCCACCAATGCCACAACTAACCGCCCCAACCCACCACCTGAACCAACTCAAGGACCCGGACCA  
AATCCTCAACCAGGAACAAACAATCTCTGCTTACATGCACACAATGTTCTAAGAGCACTCCATCAAAAACACTGGC  
CAAATGGTATGGGATGATGAATTAGCACGTGGATCCGAACAATATGCCAGACAATTAGCAAGTGAAGGAGGATT  
GAGACATTCAGAGGAAATTTATGGTGAATAATTTGTATGCTGCTTGGGGACAGTCTGCTAGCTGTGCAAAGGCAAC  
TTTGTCTTGGTACAATGAAATAAAGGATTACAATTTCAACCGTGGTGGATATCAATCAGGCACCGGTCACTTAC  
TCAACTTATTTGGAAGGGAAGTACGAGACTTGGTGTGGAGTAGCAAAGAGAGGCAATATGGTTGTGGTTGTTGC  
GAGATATGCACCTCGGGGAAACTTCATGGGTAGATTGCGAGAGCATGTACATCGACAAAATTTATGGAGCAAGAGT  
GCCCTCTTGGTGAATTTGAAAGTGGAGTGACAAATCCGTCAACTGGTGGACCACCTGTCCCGCAAGGACTCAC  
GGACCGCGCCTGAACCACCTCCAACAGATTGCAAAGACCAAAAAGTGGAAATGCCGATATTTCCGAAGCAAATGC  
AACAGGGTTTTCATGGATTTCGTGACATGTGCAAGAAAACATGCGGAGTTTGTAAACAATTTGTATCAAATCCTTG  
CTTCTTCTGTTATTTCTAAATTTCTCCTGAAGTCTGCTGATTGTTAATACATTAATAACTAAAAGTCAAGGAAAAT  
TATTTAGAAATTTGAAGGCGAAAATTTGTGAAAATGTACCAG

Klon Cl1549 (SP6-T7)

AAAGGTACAAGTTGGCAGTTTACAAGTTTCTCCATCATGAAGCTTGAATAGTCATCTTACATGTCTGTTTGTG  
GCCATAACTGGACAGACAATCAAGAGAGAGAAAAGATCTCTGTCTACATGCACACAATGCTTGGAGTCACTACAC  
GAGAACACAGGTCCAATGGTTTGGGATGACCAGTTGACACGGGGAGCTGAAGAATGGGCCAGGAAATTTGGTGAAT  
GAAAGGGGGTTGAGACATTCGAGAGGAAATTTATGGGGAGAATCTGTATGCTGCTTGGGGGCAATCTGCTAGCTGC  
GCAAAAGCAACTTTATCTTGGTACAGCGAAATCAAAGACTACGACTTCAACCGAGGTGGGTACAAAATCTGGCACT  
GGTCATTTTACTCAAATCGTTTGGAAAAGGAAGTACAAGGCTCGGTGTTGGCATAGCAACTAAGGGAAGCAAAGTT  
GTTGTTGTTGCAAGATATTCACCAGCTGGAAACTTCATGAGAAGATTTAGAGAACATGTTTACAGGCAAAAACCT  
GGCGCAAGAGTCCCTTCATTGAGTGAATTAGAAAATGGTTCAGTAAAGCCTCGTACTGACGGGCCACCAATGCCA  
CAAATAACCGCCCCAACCCACCACCTGAACCAACTCAAGGACCCGACCGAATCTCAACCAGGAACAAACA

ATCTCTGCTTACATGCACACAATGTTCTAAGAGCACTCCATCAAAACACTGGCCAAATGGTATGGGATGATGAAT  
TAGCACGTGGATCCGAACAATATGCCAGACAATTAGCAAGTGAAGGAGGATTGAGACATTCCAGAGGAAATTATG  
GTGAAAATTTGTATGCCGCTTGGGGACAGTCTGCTAGCTGTGCAAAGGCAACTTTGTCTTGGTACAATGAAATAA  
AGGATTACAATTTCAACCGTGGTGGATATCAATCAGGCACCGGTCACCTCACTCAACTTATTTGGAAGGGAAGTA  
CGAGACTTGGTGGTGGAGTAGCAAAGAGAGGCAATATGGTTGTGGTTGTTGCGAGATATGCACCTCGGGGAAACT  
TCATGGGAAGATTTCGACAGAGCATGTACATCGACAAAATTACGGAGCAAGAGTGCCTCTCTTGGTGAAATTTAAA  
GTGGAGTGACAAATCCGTCAACTGGTGAACCACCTGTCTGCAAGGACTCACGGACCGGGCTGAACCACCTCC  
AACAAATTGCAAAGACCAAAAATGGAATGCCGATATTTCCGAAGCAAATGCAACAGGGTTTCATGGATTTCGTGA  
CATGT

*nanos*

03\_aurelia\_rc\_finalASM\_12850 + RACE

CGATAGAACATAATACCATCTGTCCTGCGTTGAGTTCACACAAGGTATTCAGAGCACCCTACTATTTAACGGTT  
ATAAGCACCTGAACCAATTCGTTCCCTGTTAATTGCCAAATATTCATCTACCGTTCACACTGGAGCTACGAACGTA  
TCAATTTAAATTTGGAGAGACGCTACTTTTCRTGGAATTGGTGTGCGTGCCTTGGAAATTCGGAGTGAGAATTGAT  
TAGCGCGCATTATGCTGAGACAGAATTTATGAATGAACGGTTTATTTTAAAAGCATTCTGGGAAAGAGTCGAG  
TAGTGTAGAGTTGCAGAGAGGAAAGTTATTTGCACGAGGAAAAGACAGGAAAACAGATTCCTATTGTGTGGGAA  
ACTTTAATGAGAAAAAATCGTTACAATTCCTAAAATAGATAGAAGAGAAATCAAGTTTAAATCTGGTAAGATGGG  
AGATCAGATGTTAGGGACGCTATATACAACCTGACTTTGTGTTGCTACGAAACACGTGGAGGGAGACGACAAGGA  
AAACATGCAGATCAAGAGCGAATTTTCGAGTTTTTCGCGATTATTTAGGATTAATCAATTTAGTGCAGCCTGAAGG  
ATTGTGTTACCGTACGAAGATATGAGAGCGCCAATAATGTGCGACTATAGCACAGAAAGTGACAGCAGTATTGG  
ATATTCAAGCGATTGTGCTGTGCGAATGCCGAGCCGAAAAAGACTCGACAGCCTAGATTCTGATAAAAAGTGAGAA  
TTCACTCGGAAGTCGTGGGGATGGAGATATCAGTTTTGATATTCGATTCAATAAGTTCACAAGAATTCGACCATT  
TAAGCCGTCATCATAGGAGATTCTGTGTCAAGATCAGAGCTATTCTCAAATAGAGTGGGTGGGAAAAATCGGAAG  
AGCAGCGAAATCCACGACAGCTCTTTTGCCTAACGAAAAGCAGAGGGCAAATCAACGGCAAGTATGTGTTTTCTG  
TAGAAATAATGGAGAAAAGCAGAGAATTTTATAGTGGTCACACCTTAAAGGATGCTGAAGGGAATACTTCATGTCC  
AATTTTGCAGCATAACATGCCCCCTTTGCAAGGCTTGTGGGGACAAATCACATAACATAAAAATATTGTCCAAA  
ATATACCCCGAAACCAAGGACAAAATTTCTGCCAATTTAGACTGAAGCAAATGAACCCGAAATGAATATTTATT  
GTTGATGAATAAGTAGGCTTAATAAATGCATTTGTTGAATGAAAGAAATGAGATTAGAATATCGCCCATAGCAC  
TGGGTTTTATTGAATTTAAAGAAACAGAACATTTCAAATTTGTAACCGCGTTAATAAAGTATCAAATTTCTGT  
TTTTTTTTTTGAATGTTAGGTTGAGTAAAATTTTTTTTACTTTAGGAGAAGTGTTCGATGTTGTAIAAAAAAAAA  
AAAAAAA

Klon Nanos (T7-SP6)

AACATAATACCATCTGTCCTGCGTTGAGTTCACACAAGGTATTCAGAGCACCCTACTATTTAACGGTTATAAGC  
ACCTGAACCAATTCGTTCCCTGTTAATTGCCAAATATTCATCTACCGTTCACACTGGAGCTACGAACGTATCAATTT  
AAATTTGGAGAGACGCTACTTTTCATGGAATTGGTGTGCGTACCTTGGAAATTCGGAGTGAGAATTGATTAGCGCG  
CATCATGCTGAGACAGAATTTATGAATGAACGGTTTATTTTAAAAGCATTCTGGGAAAGAGTCGAGTAGTGTA  
GAGTTGCAGAGAGGAAAGTTATTTGCACGAGGAAAAGACAGGAAAACAGATTCCTATTGTCTGGGAAACTTTGA  
TGAGAAAAAATCGTTACAATTCATAAATAGATAGAAGAGAAATCAAGTTTAAATCTGGTAAGATGGGGGATCAG  
ATGTTAGAGACGCTATATACAACCTGACTTTGTGTTGCTACGAAGCACGTTGGAGGGAGATGACAAGGAAAACATG  
CAGATCAAAAACGAATTTTCGAGTTTTTCGCGATTATTTAGGATTAATCAATTTAGTGCAGCCTGAAGGATTGTGT  
TCACCGTACGAAGATATGAGAGCGCCAATGATGTCGAGCTATAGCACAGAAAGTGACAGCAGTATTGGATATTCA  
AGCGATTGTGCTGTGCGAATGCC

*cnivi*

F2X1FZH02JK691 & F2X1FZH02H0IRU rev

GAACTTTGGGCTTGGAGATTCCAATGCGATCCGTAATGGTAGTCGGTATCGATGTTTACCATGATGCTGAAAAG  
GGAGGCAAGTCAATTCAGGGCTCGTGGCATCAACGAACAAGCAGTTCACCCGTTGGTATTCACGGGTTTGTAAA  
CAACAACCAGGACAAGAATTAATTGATAGTTTAAAAGTCAGCTTCGAGATGCATTGAAGAAATATCATGAGATT  
AATCATGATTTGCTGAGAGGATCATTGTGTACCGGGATGGTGTGGGTGATGGGCAACTTCATATCGTTGCCAAT



## Kapitel 9: Anhang

---

TATGAGGTGTAGCAACTCTCAGAAAGCTTTGCACTCTTTGAGTCATATAAACCAAAGTTGGCCGTCATCGTTGTA  
CAGAAGAGGATCAACATGAGAATCTTTGCTGCTAATGGAAATGGAGGTGGTCAGAGAAAACCTTGATAACCCTCCA  
CCAG

Klon Cniwi (T7-SP6)

GATTCCAATGCGATCCGTAATGGTAGTCGGTATCGATGTTTACCATGATGCTGGAAAGGGAGGCAAGTCAATTGTC  
AGGGCTCGTGGCATCAACGAACAAGCAGTTCACCCGTTGGTATTACCGGGTTTGTAACAACAACCAGGACAAGA  
ATTAATTGATAGTTTGAAAGTCAGCTTCGCAGATGCATTGAAGAAAATATCATGAGATTAATCATGATTTGCCTGA  
GAGGATCATTGTGTACCGGGATGGTGTGGGTGATGGGCAACTTCATATCGTTGCCAATTATGAGGTGCAGCAACT  
CTCAGAAAGCTTTGCACTCTTTGAGTCATATAAACCAAAGTTGGCCGTCATCGTTGTACAGAAGAGGATCAACAT  
GAGAATCTTTGCTGCTAATGGAAATGGAGGTGGTCAGAGAAAACCTTGAT

### *sox II*

02\_aurelia\_rc\_final\_rsASM#1\_4675 rev + RACE

ACCAATGAACGCGTTTATGGTGTGGTCACGTGAAAGAAGAAGAAAGATGGCGCAACACAACCCTCGAATGCATAA  
CTCGGAAATTTCAAAAATTTCTTGGTGCAGAATGGAAAAGACTTCCCGATTTCAGAGAAAAACCCCTATATTGACGA  
AGCAAAGCGACTACAAGCTGAGCACAGTAACCAACATCCTAATTACAAATATAAGCCAAGGCGGAGAAAAGCGAA  
ACAGATAATGAAGAAGGATAAAATGGGGTTCACCATACCCCTGGTGCAGACCCAAACATGGCAACAACGATCAAATTC  
CCATACCCATCACCGTTTCCCTCAAGATCCAATGTACCCCTTGTATAATATGACACCCGCTGCGTATCCACTGTATG  
ATACATGTGGGACTTTGACAGCCTTACCAAGACAGACCATGATCTCCCGCCTGGACAACCTCGACATTTCCAGCTC  
ATCCAACACGCATGATTTCTACACGTCAATGGCCATGCAATCAAGAGGTGCGGCTTCTACTGCCTCGGAGGTGAT  
GTCCTTGCAGACGCGTTATGCTAACCCATGGATGTAGCTGTTACCCAGGCTCCTTTCACAACGACGCAGAGCATG  
CATGTGCCTGCACAAGATTACCAASGGTCAGCAGTTATTCGCAGATGTATGCGCAACGACATTTGTAAGGAGAT  
TTTGGGAAGACATGAMAGACCGAGAATTTTGGTGGCTCGATCGTTGGATTCTATAAACTAAACAGTGAGAT  
CATAACGAACAGAGAGGCAAGGAGAGAAGATAATTCAGTATGCTTGGACAAGCAGCAGATTTTTTAACAATA  
AGAAATAAGATGTACTCAATTGATATTAGCAAAAAGTACTTTGCTAGTCGCYCGGATGTATATGTTTTTACAGA  
CAGGGAATAGTCGTTGAATTTTTAGCATTAAAGTACGTTTTTTGGCAGTTAAGCATTAACTCAAGTTATCGTGT  
TAATTTGCATTATAGATAATTAGAATGTGGGGGATGAAAGTGTTTTATTTTCATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAATTTCTCGGCGCGG

Klon sox II (T7-SP6)

TCACGTGAAAGAAGAAGAAAGATGGCGCAACACAACCCTCGAATGCATAACTCGGAAATTTCAAAAATTTCTTGGT  
GCGGAATGGAAAAGACTTCCCGATTTCAGAGAGAAACCCCTATATTGACGAAGCAAAGCGACTACAAGCTGAGCAC  
AGTAACCAACATCCTAATTACAAATATAAGCCAAGGCGGAGAAAAGCGAAACAGATCATGAAGAAGGATAAAAT  
GGGCTTCCCATACCCCTGGTGCAGACCCAAACATGGCAACAACGATCAAATTTCCCATACCCATCACCGTTTCCCTCAA  
GATCCGATGTACCCCTTGTATAATATGACACCCGCTGCGTATCCACTGTATGATACATGTGGGACTTTGACAGCCT  
TACCAAGACAGACCATGATCTCCCGCCTGGACAACCTCGACATTCAGCTCATCCAACACACATGATTTCTACAC  
GTCAATGGCCATGCAATCAAGAGGTGCGGCTTCTACTGCCTCGGAGATGATGTCTTGCAGACGCGTTATGCTAA  
CCCTATGGATGTAGCTGTTACCCAGGCTCCTTTCACAACGACGCAAAGCATGCATGTGCCTGCACAAGATTACCA  
ACGGTCAGCAGTTATTCGCAGATGTATGCGCAACGACATTTGTAAGGAGATTTTGAGAAGACATGACAGACCGAG  
AATTTTGGTGGCTCGATCGTTGGATTCTATAAACTTAACAGTGAGATCATGACGAACAGAGAGGCAAGGAGA  
GAAGATAATTCAGTATGCTTGGACAAGCAGCAGATTTTTTTAAACAATAAGGAATAAGATGTACTCAATTGATA  
TTAGCAAAAGCTGACTTTGCTAGTCGCTCGGATGTATATGTTTTTACAGACAGGGAATAGTCGTTGGATTTTTAG  
CATTAAAGTACGTTTTTTGGCAGTTAAGCATTAACTCAAGTTATCGTGTTTTAAATTTGCATTATAGATAATTAGAA  
TG

### **KLF13**

F2K13CN02GKLVA

ATACATGTTTGTTCATATGAAGGATGTGAGAAAGTGTATGGTAAAAGTTCCCATCTAAAGGCACATTTACGCACG  
CATACCGGCGAACGCCCCGTTCCATTGCAATTGGAATGACTGTGGGAAAAAATTTGCGCGATCGGATGAACTCGCG

## Kapitel 9: Anhang

---

CGTCATTACCGCACGCATACAGGCGAAAAAAGATATGTTTTGTCCCGTTTGTGAAAAGCGTTTCATGAGGAGTGAT  
CATTAAACAAAGCA

Klon KLF13 (T7-SP6)

CATATGAAGGATGTGAGAAAGTGTATGGTAAAAGTTCATCTAAAGGCACATTTACGCACGCATACCGGCGAAC  
GCCCCGTTCCATTGCAATTGGAATGACTGTGGGAAAAAATTTGCGCGATCGGATGAACTCGCGCGTCATTACCGCA  
CGCATACAGGCGAAAAAAGATATGTTTTGCCCGTTTGTGAAAAGCGTTTCATGAGGAGTGATCATTAAACAA

### RFamid

celera\_v01\_contig\_11246

ACATTCATCCGGTAAAATCACACCTACAGGGTTGCACATAGCTCAACGGCTTCATATAAGTCGGAACAGAGAGAG  
GTACGGACAGCTCAAGAACGAAAGGACAGTGAGAAGATCTCGTCATAAAGAAGACCTTCCAACACAACCTTGTCAT  
CACAGAAAAAAGAACTTGGCCTGGCTCCAAGTACAATCAAATACTGGGACATACAATACGAGGTGTATTCGAA  
AATCTCAAGATGAACTCACCTTGCAAATAGTGCTGTGCGCTATTTTTGTAACCTTATGCTCTTTGTGAGTCAACT  
GAGAAGAAAGAAACAAAGGAGGCTCAATCCGAGAATGAGAAGTTGGGACCAGCTAAGAGGGCACTTGAGCAGTG  
GCTCCGAGGCCGATTTGGAAGGGAGTCAGGAAAAGAACCAAGAGAGTTAGAGCAATGGCTTCGTGGCCGCTTTGG  
CAAAAGGGAAAACAGCCAATGGCTTCGAGGTGCGTTTGGAAAGGAGGCTGAGCAATGGCTGAGAGGCAGGTTTGG  
AAAAGAAGCAGGCGAGAACGAGGAAGCCCTTGAGTCAGAATTTGAGCAATGGTTAAGGGGTAGATTTGGAAAGG  
AGGTTGATGAACAGTGGCTTAGAGGTAGGTTTGGAAAGGGAGGCTCTGCAATGGCTTAGGGGGCGATTTGGACGTG  
AGCTTGCTGAGCAATGGCTTCGTGGAAGATTTGGAAAAGAGGCTGAGGAGCAATGGCTGCGTGGGAAGATTTGGAA  
AGGAGCTGAGGAGCAGTGGCTGCGTGGAAGATTTGGGAAGGAGACTGAGGAGCAGTGGCTGCGTGGGAAGATTC  
GGTAAAGAATCAGAAGATGAGGCGGAAGAAAGTCAATGGTTACGAGGGAGGTTTGGAAAAGAGGCTGAACAGT  
GCTTCGTGGGAGGTTTGGGAAGGAGCAGCAGACCAATGGTTACGCGGGAGGTTTCGAAAAGGAGGCTGCTGACCA  
GTGGCTCAGGGGTAGGTTTGGTAGAGAGGCTGATAAGCAGTGGCTTAGGGGTAGATTTGGTAAAGAGGTGAATG  
AGCAATGGTTGAGAGGCAGATTCGGAAGAGAGGCAATGGGCAATGGTTGAGGGGAAGATTTGGGAAAGAGGCA  
GACAAGCAGTGGTTGAGGGGAAGATTTGGAAAAGAGGCAGACAAGCAATGGCTTCGCGGCCGTTTTGGAAAGGA  
GGTTGATGAACAATGGCTTCGCGGAAGATTTGGCAGGGAGATTTAGCAATGGCTCCGTGGTTCGCTTTGGGAGAGA  
AGAAGGTCATGAGAAAATGACAAGGGAATTTGAGCAATGGCTACGTGGTTCGTTTCGGAAGAGATGCTGCAGATC  
AATGGCTGCGTGGTTCGCTTTGGAAGAGGAGAGAAAACATCCGAGGCCCTTGCCAAAGAGAACTGATGCCAAAGATT  
CGAAGACACACGAAAAGAAAAGTGACGATAGATATGAAAGTGAATTAACCTCCGCTGTAAGAGCAGCAAAAAGT  
AGTTGAACTGGTCATTTCAAAGAAAATTAGTATGGCAAGAAAATATAATTAATTTGTGCATTCTCTTAAGAAAA  
AGACCTTCTTTCATCGAACTATGGACTAAATGTAAATTTGATTTATAACAGAGAATCATGTTACTAATATGTTAT  
TATATGCTTTCAAGAGGTTATAGCCTCGCAGAGTTTCGTAGGGTATCAGTGGTATTAATAATCTGCTTACGTAGAG  
GACGGGTTAGAGATCTTCATTATCAGTAGCAGAATCAGTTGAGCAGAAATTTAATGAAATTAGATTTGGTTCTAA  
CTTATTTCTCCTTCTTTTACTATCGATGCCATAGAGCCATTGCTCAATCTCCCTAGCCAAAATAATGAGCATAGT  
GATCAACTGTAGTTCTGTACCCATGCATTTTAGCAACTGGGTTACTAGGACCCAGTCCCCAAAATTACATGGCTT  
TTACATGACGACATAAAATGGCGGAGTTGAAACTCAGTTCAGCAAGTTGGAACACGATGGTACCAGTTTTAAT  
AGCTGCACACTGCAGTGCAGAAAGACAAGAAATCTATGCCTCTGTGTGGTGTGGCAGGGCGATTGTGTTGGAAG  
CTTGA AAAATGACCAAAAATAATGGCACCTCAGTCACATTAACGCTTCACTACATTTGAACAAAACATTTGCTT  
GAACTTATAGCCTCGTTGGAGAAATTTGTGTTTCTCAATCTTTTCTAAACAGCTATCTTTTCTGAAAAGTTAAG  
AGTGCTGCAGAAATAAATTTCAATGCAAAACATAGTTCATTTTGAATTAGCTTGTGACTCTCAAGAGAACGATT  
CACAGACAGTAGACTGTATTTGAAGTGAACATGAATAAACTTTAACTGGCATATCGACCAAGAAAGGTCCTAGC  
CTACTCTAAGGCTCTAAGCACAATCTTCAAATACTGTGTTTTTTTTCAATTTTCTTTGTATACCTTCTTTCTTATGG  
GTTTCTCTGTGCAAGAACAGTAAAAGTATTTAAGTTACATCTAAACAGAAAAGAGAATTAATAAAGTCATAAAG  
TAAGATAAATTTGCACTCAAGAAAATTTCTTTTATATTAATTAATACTAAACAGCAACATTTCAATTGTATATCATTAT  
AGTGATTTCTTATTTTTCATCATAGATTATAAACGATTGAAGTCATATCGAAAAGTAAACAGTAATGGTC

Klon RFamid (SP6-T7)

ATGAAACTCACCTTGCAAATAGTGCTGTGCGCTATTTTTGTAACCTTATGCTCTTTGTGAGTCANCTGAGAAGAAA  
GAAACAAAGGAGGCTCAATCCGAGAATGAGAAGTTGGGACCAGCTAAGAGGGCACTTGAGCAGTGGCTCCGAGGC  
CGATTTGGAAGGGAGTCAGGAAAAGAACCAAGAGAGTTAGAGCAATGGCTTCGTGGCCGCTTTGGCAAAAAGGGA  
AAACAGCCAATGGCTTCGAGGTGCGTTTGGAAAAGGAGGCTGAGCAATGGCTGAGAGGCAGGTTTGGAAAAGAAGC  
AGGCGAGAACGAGGAAGCCCTTGAGTCAGAATTTGAGCAATGGTTAAGGGGTAGATTTGGAAAGGAGGTTGATG  
NACAGTGGCTTAGAGGTAGGTTTGGAAAGGGAGGCTCTGCAATGGCTTAGGGGGCGATTTGGACGTGAGCTTGCTG

AGCAATGGCTTCGTGGAAGATTTGGAAAAGAGGCTGAGGAGCAATGGCTGCGTGGAAGATTTGGAAAGGAGGCT  
GAGGAGCAGTGGCTGCGTGGAAGATTTGGGAAGGANACTGAGGAGCAGTGGCTGCGTGNGAGATTCGGTAAGAA  
TCAGAGATGAGGCGGAAGAAAGTCAATGNNTACGAGGGAGGTTTGGAAAAGAGGCTGAACAGTGNCTTCGTGGG  
AGGTTTTGGGAAGGAAGCAGCAGACCAATGNNTACGCGGGAGGTTTCGGAAGAGGAGGCTGCTGACCAGTGGCTCAGG  
GGTAGGTTTGGTAGAGAGGCTGATAAGCAGTGGCTTAGGGGTAGATTTGGTAAAGAGGTGAATGAGCAATGGTT  
GAGAGGCAGATTCGGAAGAGAGGCCAAATGGGCAATGGTTGAGGGGAAGATTTGGNAAAAGAGGCAGACAAGCAGT  
GGTTGAGGGGAAGATTTGGAAAAGAGGCAGACAAGCAATGCTTCGCGGCCGTTTTGGAAAGGAGGTTGATGAAC  
AATGCTTCGCGGAAGATTTGGCAGGGAGATTGAGCAATGGCTCCGTGGTTCGCTTTGGGAGAGAAGAAGGTCATGA  
GAAAATGACAAGGGAATTGGAGCAATGGCTACGTGGTTCGTTTCGGAAGAGATGCTGCAGATCAATGGCTGCGTGG  
TCGCNTTGGAAAGAGGAGAGAAAACATCCGAGCCTTGCCAAAGAGAACTGATGCCAAAGATT

### LWamid

celera\_v01\_contig\_19898

AGAAAATCAACCACCAGGTAAGGAGAAAAGAGAAAATCAACCACCCGGCACATGGCGTAAGAGAGAAAACCAA  
CCGCCAGGTACATGGCGTAAGAGAGAAAATCAACCGCCAGGCACATGGCGTAAGAGAGAAAATCAACCACCAGGC  
ACATGGCGAAAGAGAGAGAATCAACCGCCAGGCACATGGCGTAAGAGGGAAAATCAACCACCAGGCACATGGCGT  
AAGAAAAGAGGAAAGAATCGCAGAAAACGGCGAAAATAGATGAGAAGTATCTGCAAGACGCTCTCGAAAATAG  
GCTAAAGCATCGTCTTGAAGAGGAGGCAAAGAAGATCAAAGAACATGAAGGCAACACTGAGGAAAATTGCAGATC  
TGTTAGCGAAGAAAAGCAAAAAGACGATAGGAAGAAAATATTAGCACGGTACAGAGATTTGGTTCAAGAATTAAGA  
GAAACTTTAGAAGATAAGAGAGACTGAAATATGTTTTGCTATAATGACGGTTAAACTTCTAAATCTAGCAATCTA  
GAGGTGAGCTGGAAGCTTCATGATAAAGTATTAAGAATCTATGGTTAATGTGTTGTAA

Klon LWamid (SP6-T7)

GGAGAAAAGAGAAAATCAACCACCCGGCACTTGGGGTAAGAGAGAAAGTCAACCGCCAGGCACATGGCGTAAGAGAGAAAATCAA  
GAAAATCAACCACCAGGCACATGGCGAAAGAGAGAGAATCAACCGCCAGGCACATGGCGTAAGAGAGAAAATCAA  
CCACCAGGCACATGGCGTAAGAAAAGAGGAAAAGATCGCAGAAAACGGCGAAAATAGATGAGAAGTATCTGCG  
AGATGCTCTCGAAAATAGGCTTAAAGCATCGTCTTGAAGAGGAGGCAAAGAAGATCAAAGAACATGAAGGCAACA  
CTGAGGAAATTGCAGATCTGTTAGCGAAGAAAAGCAAAGACGATAGGAAGAAAATATTAGCACGGTACAGAGAT  
TTGGTTCAAGAATTAAGAGAAACTTTAGAAGATAAGAGAGACTGAAATATGTTTTGCTATAATGACGGTTAAAC  
TTCTAAATCTAGCAATCTAGAGGTGAGCTGGAAGCTTCATGATAAAGTATTAAG

## 9.2 Sequenzen der potentielle Promotoren und Terminatoren

### *tubulin*

Cl2Contig1 rev (Planula EST),

aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_34 (bs Polyp Transkriptome)

CCGAGGCTCGACCGTTGCTCGAAAGAGTGAAGAGGCATTCTCGAAATTTACTAACTTGTTTTTAGAACAGCAAA  
CAAAAAGCCAAGATGCGTGAATGTATTTCTATCCATGTTGGCCAAGCTGGTGTCCAGATCGGTAATGCTTGTG  
GAATTGTACTGTCTAGAACATGGCATCCAACCTGATGGCCAAATGCCAAGTGATAAGACCATTGGAGGTGGTGAC  
GATTCCTTCAACACATTTTTTCAGTGAGACTGGTGCAGGAAAGCACGTCCCAAGAGCTGTCTTTGTTGACTTGGAA  
CCCCTGTTGTAGATGAGGTCAGAACTGGCACATACAGACAATATTCCATCCAGAACAATTTGATCACAGGAAAAG  
GAAGATGCTGCAATAACTATGCACGTGGACATTACACTGTTGGAAAAGAAAATCATTGATCTCGTTTTGGACAGA  
ATCAGAAAAGTTGGCAGATCAGTGCACAGGTCTCCAAGGATTCCTGATCTTCCACTCCTTTGGTGGTGGTACGGGA  
TCCGGATTCTCCTCACTTCTTATGGAACGTCTCTCAGTCGATTATGGAAAGAAAATCAAAATTTGGAATTTGCCATC  
TACCCAGCACCCAGATCTCCACTGCTGTTGTTGAGCCATACTCACTCCATCCTGACCACTCACACCACCTTGGAA  
ACTCTGACTGCGTTTTCATGGTTGACAATGAAGCCATCTATGACATCTGCAGGCGTAACCTGGACATTTGAACGAC  
CAACCTACACCAATTTGAATCGTCTGATTGGCCAGATTGTGTCTATCTACTGCATCCCTCCGATTTGATGGTGC  
ATTGAATGTTGACTTGACTGAGTTCCAGACCAACTTGGTGCATACCCACGTATCCATTTCCATTTGGCAACCTAT  
GCACCAGTCATCTCTGCAGAGAAGGCATACCATGAACAGCTGACTGTTGCTGAGATCACCAATGCTTGTGCTTTGAG

CCAGCCAACCAGATGGTGAAGTGTGACCCACGTCATGGCAAATACATGGCTTGCTGTTTGTGTACCGTGGTGAT  
GTTGTGCCAAAGGATGTCAACGCTGCCATTGCAACAATCAAAACCAAGAGAACCATCCAGTTTGTGCGACTGGTGT  
CCAACCTGGCTTCAAGGTGGCATCAACTACCAACCACCAACTGTTGTCCCAGGAGGTGATTTGGCTAAGGTGCAG  
AGAGCCGTTTGCATGTTGAGCAACACCCTGCCATTGCTGAGGCATGGGCACGACTTGACCACAAATTTGATTTG  
ATGTACGCCAAGCGTGCCTTCGTCCACTGGTATGTAGGAGAAGGTATGGAGGAAGTGAATTCAGAGGCCAGA  
GAAGATTTGGCTGCACTTGAGAAGGATTACGAAGAGGGTTGGTGT**TGACT**CCATTGATGCAGAGGGAGAAGAGG  
AAGGCGAAGAGTACTAAATGAACTGAAAACAAAACTTGGACTGTCCGTTACATGTTTGTACACATTGAAAATGT  
TATGAAATGTTTAAAAAGGAAGGCAAAGTAAAACAAGTAT

Genomische Sequenz *tubulin* 5' potentieller Promotor (**Intron**)

GGCACTACAGTCTTTTGGTCATGCATGAAGTTAGCTGATTGGTCAATTATCGTAAAAATATGGGCAAACTTATTT  
CGCCCTCCCAGCTCAACAACAGCAACAGGTA**CTTCAAACATTTAGGCCTGTTGTGAAAAGAACGAACGAACATGT**  
GATATGAATTCTGTCAAACTCTTCAAAAANCAGCCATTCTCCAAAAGAAGCTGGAAAGGGAAATTAGAAATAAA  
GCCTTTGGGGCCAGATCGACCAGATTTGCTGACGAAGTCATCATCGCGTAGATTTACGAGGAGCNGGTATTCTAG  
GTACGAGTGGGTTACAGGTTGTGGCGAGTCTGGAAAAGTTTGTGTTTTCTTGCCTTCTGTTTGGCGAGTCTCA  
GCGAGAAGAGCACAATTT**CAGGAGAGCAAAATNCAAGACAGGAGAGCAAAATCTCTCTTTAAGTGATAAAAAAT**  
GACCTCTGAAAATTTTTACTCCTATCTGTGTGTTGCCAAATTTTGTGTTTTACAATGTTCTTTAGAGAGAAA  
TAAAAAACTTTTTTACAGAAATTTGAGAGCAATTTAACTCAATCAAGGCAAGAAAATATCTTCCAAGCCGTT  
CTGCCATAGGTGGGCACTTG**CAGAAGAAAACTNGGTCTGCCAAAAGTACTCAAACTTTCTGGAAAATATAT**  
GAAAAAGGCCGTTGCCTGTGNTTCCGAGCGTTTGAAGGGCGTGGTCACTAAAAATTTCCCGAGACCCCTT**CAC**  
TTTCCACAGTTGCCCCACCAAATATTTT**CATCACCAGCCGCACTGATGAAGGAGCTTACAGTTTCCACGCAACA**  
GAAATGCATCATCTCTT**GCAATCCATATTTGGCAA**ACTTGACGACAGCACAATAGCAACGTGGTTTTGGCAAAT  
AGACCAATCAAATCACATGAATTCTGGGTTGCCTTAGCTACCGGTGAAGACGTCCATTTAGACCAATCAGATTTG  
ATTTTCGGTCTCATATCACGCGAAGATGAACCAATCAGATTAANGATGCGACGGTTGACTGAATAGCTGGGGTGA  
TTGATTTATGCGTGAAATCCGTTGAAGNTTCAATTTCAAGATTTCTCTGCTCNCGAACCGTTGCTCGAAAGAGT  
GGAAGAAGTATTCTCGAAATTTACTAACTTGTTTAAGAACAGCAAACAAATCAAG**ATGGTAAGTATCTAA**  
**ACTCATTGTCAACACTTGAGACACTTATCTTGGCCGAATTTTTGCAAGTTTTAGGGACAATTGAGGTGGAACGA**  
**GACGCACTTGCTCGCAGCTGCCATGGCCTAAAAAATGACGCCTAGAATTCTTAGTGACAAATTGACCTTTCTTT**  
**ACGCAATTTGGTGACTAAAGCAAGGAAAAATAGAACCTAATGTTGTTCTCTTAGTAAGGAGCATGTCATAAGAGA**  
**ATTTCTTTGAGTTTTATTTGCTCTAAGCCAAGGTTTTGAGTGCAGGTCTCGAGTTTGATGATGATGATGATGTTG**  
**GCTCCAAAGCGAAGCAGGCCTGTACTTGATCAGGCTGCATGGGCGGGTTCATGCACGAGTTAGCCTCACGAGAT**  
**GGTGGCAAATGGGCTTAGGGCAGGGCAGCAAGTGAAGCAAGCAGTGCGAAATATGTTGATGGAGAAGGGTTC**  
**ATTTTTACAGGAGTTTCAAAGGAGAACCAGAAAGTTTACACGAAAATTTGAAAGAGTTCCTGTTGTTATGGAA**  
**ATATAGAAGCCACAAATAAAACACAATTTGTTTTCTTTCTATGGTAACAAACATTTTCAAGTACAATATATTTCT**  
**AAAGATCTTCAATGAACTTTCTTTTCGTCTAG**CGTGAATGTATTTCTATCCATGTTGGTCAAGCTGGCGTCCAGA  
TCGGTAATGCATGCTGGGAATTATACTGTTTAGAACATGGCATCCAACCTGATGGCCAAATGCCAAGTGACAAGA  
CCATTGGAGGTGGT**GATGACTCCTTCAACACATTTTT**CAGTGAGACTGGTGCAGGATAGCATGTCCAAGAGCTG  
TCTTTGT

Genomische Sequenz *tubulin* 3' potentieller Terminator

CATTGCAACAATCAAAACCAAGAGAACCATCCAGTTTGTGACNGGTGTCCAACCTGGCTTCAAGGTTGGCATCAA  
CTACCAACCACCAACAGTTGTCCCAGGAGGTGATTTGGCTAAGGTGCAGAGAGCCGTGTGCATGTTGAGCNACAC  
CACTGCCATTGCTGAAGCATGGGCCAGACTTGACCACAAATTCGATTTGATGTATGCCAAGCGTGCTTTCGTCCAC  
TGGTATGTAGGAGAAGGTATGGAGGAAGGTGAATTTT**CAGAGGCCAGAGAAGATTTGGCTGCTCTGGAGAAAGA**  
**TTACGAAGAGGGTTGGTGT**TGACT**CCATTGACGCAGAGGGAGAAGAGGAAGGTGAAGAATACTAAATGAACTGA**  
**AAAGTAAAACTTGACAATCTGTTTAAATGTTTGTAAACGTTGAAAATGTTGTGAAAAGTTTAAAAAGAAGGCA**  
**AAGTGAACAAGTATAAAAAAAGCTTCATATTTTCTTCTTGTATTTTCTTCTTAACTAACAATAAGATTGT**  
**GCTAAAGATGTCTGAAATTTTTACCAAGATCATTTCATCGACAATCAAATCCATTTAAATGCCGTTGGGATGCA**  
**AAGGATTGTGGTAATAAGTTCTATTTAACTTCTTTGGTGCAGTTGCCTTCTTGATTTTTGAGAGATTTCTTGGTG**  
**CAAATTGCAAGATAATCATTGACTAGCATGTGCAAGTTCTTACCAAAGCAGGAAAGTGATAAAAAGAGACCAA**  
**ATCATTGCTTTGTGATCAAAGTTGGTAGTCGACGTTTAGTGCTGCAAAATTTAGCTTGGTACTTCTGTGGAAATA**  
**AATTATATCCATCTGAAATATGGCTGCACTAAGGATGGTAGCAGGATTTTTGGTATGATCCATTCATGGNAAT**  
**TTACCAGTCACATCGATAGAC**

### *aktin*

CL1Contig2 (Planula EST),

aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_49 (bs Polyp Transkriptome)

```
TTAGAAAACCTTTCTTACTCAACCAAACCTCACAAATTC AACATGATGGTGGTATGATGCTCCAAGGGCTGTCTTCCCTTCCATCGTAGG
CAATGGATCTGGTATGTGCAAGGCAGGTTTCGCTGGAGATGATGCTCCAAGGGCTGTCTTCCCTTCCATCGTAGG
AAGGCCAAGACATCAAGGAGTTATGGTTGGTATGGGACAGAAGGACTCGTACGTCCGAGATGAAGCTCAAAGCAA
AAGAGGTATCCTCACTCTGAAATACCCAATCGAACATGGAATCGTCACGAACTGGGATGATATGGAAAAGATCTG
GCATCACACTTTCTACAATGAACTTCGTGTGCGCCCAAGAGAACATCCAGTCTTGCTCACAGAAGCCCCACTCAAC
CCCAAAGCTAACAGGGAAAAGATGACACAGATCATGTTGAAACCTTCAACAGCCCYGCMATGTACGTTGCCATC
CAAGCYGTMCTSTCSCTGTACGCCCTCCGGTCGTACMACCGGTATCGTCCTYGATTCCGGAGATGGTGTGAGCCACA
CAGTCCCAATCTAYGAAGGTTATGCCCTTCCCATGCCATCATCCGTTTRGATTTGGCTGGACGTGACTTGACCGA
CTACTTGATGAAGATCTTGACCGAAAGAGGATACTCWTTCCACCACCTGCCGAAAGGGAAATCGTCAGRGACAT
CAAGGAGAACTCTGCTATGTGCGACTCGACTTGAACAAGAAATGCTCACAGCATCAACCAGCTCAAGCTTGGA
GAAGAGCTACGAATTGCCTGATGGACAGGTCATCACCATCGGAAACGAGAGATTYAGRTGCCAGAGACMCTCTT
CCAACCYTCATTCATCGGAATGGAATCRAGCGGAATCCACGAGACMACATACAACTCRATCATGAAATGCGATGT
CGACATCCGTAAGGACTTGTACGCCAACACCGTCTTGTCTGGAGGTACGACTATGTTCCAGGTATCGCCGACAGG
ATGCAGAAGGAAATCGCTCCCTCGCACCATCAACCATGAAAATCAAGATCATCGCCCCACCAGAGAGGAAATAC
TCTGTATGGATCGGAGGTTCCATCTTGGCCTCACTCTCCACCTTCCAACAGATGTGGATCTCAAAGCAAGAATATG
ACGAATCCGGCCCATCCATCGTCCACAGGAAATGCTTCAAACAGCTCCCAAGAATTTTCATTCGAGAACTATGTGT
TCGAACCGTTTCAGTTTCAAACCTTTTCTCACTCACGTCTCTCTTGTATATATGGTTGATAATTTTGCAAATCA
TTTCATTGTTAGTTTTGTACTGTGTATATATGTCCTCAAGTAGGGTATGATCTTTGAGACAAGCTATATATAACAA
GAAGTAAATTC AAGCACCTCAATCAACTGGCTTATGTTCTATGTTGTCAGTCTCTCTGATCGTCGTTATTTTATAT
TAATGCGAAATTAACGATATTTGTTCCAAGGTTGAGGCCAATCTTCAAGTAATTGTAATTTTTCGAAATGTGAC
GTTATTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Genomische Sequenz *aktin* 5` potentieller Promotor ([Intron](#))

```
GGAAACTTTTGGTAGCAACAAAATGTTCTAAAATTTAAGAACTTTCTACCAGCCTGGACCAGCCTGAGTTTCTT
ATAAAAATTCATGTTAGGAGCAAAGAAGAAACATTCGCAGTTTCGCGTAGGCCATCGAAGCTTTCGTGTTTTATA
TCATCTAGCCAAATAGCTTCATGCCGAAGCAAAGTTTTTTTTCATGACNGCACTCATTTTTTTTTATTAGAAACAGC
TTATAAGAAACAGTAGGCTCAATTTTTCAAACNTAGTGAGCTATCCACCTGAATTAAGACAGCTAAGAACTT
TCGTAATTTGTAGCTTTAATTTTCCCAAGGTCACTTGAAATGTTTCGACACTGTACAGTAATAGTAAATGTTTTG
GCATTGTTTTGAGTGCGAATTAAGTTATAACATGTTTTGAGACCTTACAAGGTTACAAAGTAATTTGTAATTCGT
AAGCCCTTCTAACAAAAATATATTCGCTCTACATAAGAACTTTTGGTAGCAAAATGGCCCTAAAAATTAAGAAA
CTGCCTACCAACCCCGGACCTAATAAGCCGATTCAAGCATTTCCTTTTTGCAATCCTTTGCAATGGCAAACACAAA
AGTGTAGGATTTACTGGTTTTTAATTAATATTTTCGTTCCGAAAAATTTATAATTTTCTGAAGCTCCAAGGGCTC
CTTCTTTGTTAGACGATTTAAAACACGAAAGCTTCGATGGCCACTTACATTTTTTAAAAGAAACGGCAAGTTTCT
TAAATTTTAGGACATTTTTGCTAACAGTTTCTTATGAGTTCCAATTCATGCGTGGGACTTTCCAATTTTAGATTT
TTAATGGTCTGACGTCTAATTGTAGAATTATTTTATTTTTGTTAAACAGATTCCAAAAGTACATAGTAGTAATAT
CTCAAAATATTAACAGTAAATGTTCAATCGTGAGCGTAGTTGCAAAAGAAAAACCTAACCAAGAAAACAAACTA
ATTTATAAGTAGAGCCTGAAGCCCTGAATTGATCGTTATCATCTGCAAACCATATCTATTTGAAGCAGATTCGGT
ACGCGATAAATTTGACAGCTTTTTCTGTACGTCCAAAATATTTTTGATAGCTTTTTCTGTACTTCCCAAAGCATTGA
ACTTCTTCAGCAAATGGCCTGGACTTGCTCAAGTCTGATTCAAATGAACCAGAACAAGGAAATGAAACACAGAGC
TAGCTTTGCGGTCCAGGCTTCGAGGGCTGCGGGTAAATAGCCCTTGAACGACACCAAAATATTCATTTGAAAAC
CACCTGCACGAATTTGCTAAGCCTTTTCAAATCAATAGTTCCGAATAACCCAATCAGAGAGCAGTATTTTCAAAA
CTAGCCAATTAGCGTGGGACAACCTTGTCTGTGGGGATTACTCGAATGTGAGTGAATTTATGAGGCGGACCGTTA
TATCCTTGTTAGGTATGCTAAACATGGTGCCTAAAACAAAACATGCATTCGATTACCGGAAATTGCCCTATTTGGT
CATATCGCTGGAATCGCTCACATGGCCAGCCTATACATATGAGCATGTGCAACAGTTGAACATTCTACTTGAAGT
GAAACTTCGAAACGGTAAGANCCGCACAGCTTTTAGAAAACCTTCTTATTCAACCAAACCTCACAAATTC AATATG
GGTATGAAGATGTAGCAGCTCTTGTGATCGACAATGGATCTGGTATGTGCAAAGCAGGGTTCGCTGGAGATGAT
GCTCCAAGAGCCGTCTTCCCTTCCATCGTAGGAAGACCAAGGCATCAAGGAGTTATGGTTGGTATGGGACAGAAA
GACTCGTACGTTGGAGATGAAGCTCAAAGCAAAAAGAGGTATACTCACTCTGAAATACCCAATCGAGCATGGAATC
GTCACTAACTGGGATGATATGGAAAAGGTAATAATTTTTGATAAGATATTCGCAAAATATTTCTTCCAAAACCTCG
TTTGAAGTTCCATTTTTATCAACCATTTGAGAGATGAAAATATTTACGACTCGTTCCTTCTCTCGTATCTGGC
ATCACACTTTCTACAATGAACTTCGTGTGCGCCCAAGAAACATCCAGTCTTGCTCACAGAAGCCCCACTCAAC
```

### Genomische Sequenz *aktin* 3` potentieller Terminator

CATCCATCGTCCACAGGAAATGCTTCTAAACAGCTCCCAAGAATTTCAATTCATCGTCCACAGGAAATGCTTCTAAA  
TATCTCGAAGGAAATTAATCAAGAACTATACGTGTTTCGANCCGTTTCAGTTTCAAAACCTTTCTTCTCACTCAC  
GCCTCTCCTTGTATATATGGTTGATAATTTTCAAATCATTTCATTGTTAGTTTTGTACTGTGTATATATGTCC  
TCAAGTAGGGTGGATCATTGAGACGAGCTATATATAACAAGAAGTAAATTCAGCACCTCAACTGGCTTATGTT  
GTCTTGTCAATTCCTGATCGTCTTATTTATATTAATGCCAAATTATCGCTATTTGTTCTANGGTTNAGGCCAA  
TTCTTCAANGTAATTGTAATTTCAAATGTGACGTTATTTTGAAGACAGTTTCTAAATTTCTATTCGACTATT  
TGCCATCTCTACCTACTGTGTTTTGGTGTGTAATGTTAACCCGAGCTTTGAGCTAAGAATTTTCTGAAAGTGT  
TATGTTTTCGTTCCTGTTTGAAGTAAAATGATAAACTTTATTTAGTATGAAGAAAAATAACGAAAAAATAGAAC  
TGTTTCAATGCGCGTTTTTGGACTGAACAGACGACCAAAGACTTGAAATTTGCAAGGTGGGAGGAATGGTTGTT  
GAAGTGATCGCTTGTCCAAGAAGTGTCCAAGAAATATTCTTGAATATTTGGAGGGAAGATGGTTCAACGAAAT  
GTTTGTGACAGAGTTTCAAATAATGTTGCAAGATCTTACTGTACAACCTCGAAAAAAGCTTGAAGCTTTTTTA  
GAAAATAGTTGACCAGCTCATTGTTGACTATAGGCGATACTACAAAATTTGTTAATGGCACTCGCTAGAGAAAGC  
TCATCTTGCTCTAACGGTGCACAAAACGATGATTGTTACTCGCCAGACTCTTGTTCATCGTAACAAATGGGAAC  
AAATGTGCCAACTACCAAAAAGGATATGGCAGAAAAGTCAACTTAAAGCCAAATTATAAAAGAAAAACACAAATC  
CAACGAGAAATAATGAACTGATTTTATATTGAGATCAAACCTGAAGGAAAACACCTATACTTCGTGTTGATAGTG  
CTTGCAACCTATTGCTCTTCTATGCAGAGGTTATCCAATTAGTCATTTTTCTTCGCAGTAATTCGGCTGCC

### *aktin*

aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21 rev (bs Polyp Transkriptom)

AGAGTACGCGGGGACTTTGAGCTCAGCTGAAGTAGAAGAAGTCAGAACCTTCGTTGTCTTAGGCCTAAACAAAA  
ACACATCAAAAATGGGTGATGAAGAAATCGCAGCACTTGTCTGAGACAATGGATCAGGTATGTGCAAAGCTGGATT  
CGCCGGAGATGATGCTCCAAGAGCCGTCTTCCCATCCATCGTTGGCAGGCCTAGGCATCAAGGTGTCATGGTTGGC  
ATGGGACAGAAAAGACTCGTACGTTCGGAGATGAAGCTCAAAGCAAAGAGGTATCCTCACCTGAAATACCCAATC  
GAACACGGAATTGTCACTAACTGGGATGATATGGAGAAAATCTGGCATCACACATTCTACAATGAACTTCGAGTT  
GCACCAGAGGAGCATCCAGTCTGCTCACCGAAGCTCTTTAAATCCAAAAGCTAACAGGGAAAAGATGACACAA  
ATTATGTTTCGAAACCTTCAACAGCCCTGCAATGTACGTCCCATCCAAGCCGTAAGTGTCCCTGTACGCCTCTGGTC  
GTACCACCGGTATCGTCTTGTATCCGGAGATGGTGTGAGCCACACTGTCCCAATCTACGAAGGTTATGCCCTTCC  
CCACGCCATCATCCGTTTGGATTTGGCTGGACGTGATTTGACCGACTACTTGTGAAGATCCTCACCGAGAGAGG  
TTACTCATTACCACCACCGCCGAAAGGGAAATCGTCAGAGACATCAAGGAGAAAATCTGCTATGTCGCACTCGA  
CTTTGAACAAGAAATGCTCACAGCATCAACCAGCTCAAGCTTGGAGAAGAGCTACGAATTACCTGACGGACAGGT  
CATCACCATCGGAAACGAGAGATTCAGGTGCCAGAAACCTCTTCCAACCCGCATTCATCGGAATGGAATCAAGC  
GGAATCCACGAGACCACTTACAACCTCATGAAATGCGATGTCGACATCCGTAAGGACTTGTACGCCAACACC  
GTCTTGTCTGGAGGTACGACCATGTTCCAGGTATCGCCGACAGAATGCAGAAGGAGATCGCTTCCCTCGCACCT  
CAACCATGAAAATCAAGATCATCGCCCCACCAGAGAGGAAATACTCCGTATGGATCGGAGGCTCCATCTTGGCTT  
CACTCTCCACCTTCAAACAGATGTGGATCTCGAAGCAAGAATATGACGAATCTGGCCCATCCATCGTCCACAGGAA  
ATGCTTCTAAGCGCTCGCCAACCTTAGAACTCTATGACTTGATTTTTATAATGTTTCAATTGATCCTAGTCCGCT  
AATTACTTAGTGTCCGTTGTATTGTTTAAACAGCCTCGTAAAATAAGAAAAGGAGGATATATTTTCATACGAAAA  
AATTTGTTTTTTGACTTCATTCTGATTCC

### Genomische Sequenz *aktin* 5` potentieller Promotor ([Intron](#))

CTTGCCAAATTTTCGGGTAGGGTGTGCCGCGAGCATTTTTCAAATGGTACCGTTGGCTAGACCAATTTTTGTGA  
AATTGATACCCTTGGCTAGACTAATCTCTAGGCCAAAAGTGCCATAATTTGCCGTTTTCTAGGCAAGAATCACCA  
AAATTTCTCCTTCTCTAGACAAAATCGCCAAAACCTTGGAGTTTCTAGACACAAAATTAAGAAAATTTGGCCTTTC  
CTGGACGAAAATTGCCAAAACTATACCCTTGCCTAGACTGGCCTAGACTAAAATTTGCCAAAAAGCATACCCTTG  
GCTAGACTAGAAGTCCGAAAAAGTATACCCTTGGAGGGCGGCACATCCCCAGGTACCTTTACTATGGAAGAACCC  
CCCCCCCGTGGGAGCTTAACCCGGAATTTGTTTTCGAACATCTTTTAAAATGTACTAAAAAGTTCTTAGAATG  
TTCTAAAAGTTTTGTTCTCGAATTTGAGCAGAAAAGTTGAGCTAAAAATGTGGGACCACAGATGAAATTTTCCAAA  
TTCCTCTGTAAGATCCAATTAGATTTTACCAACATTTTGCCTGACGTAATGCAGCTCGAAGGCCTTTCTATCCTAG  
GAAATACAATATTCCCTTAAACTTCTTTCAATTCGTAAACTATGTACATTCGAAGTTTTACATAGTATAAACTT

GCCCCAACCTGCTTCATGGGTGCAAAGTATTTGAACTTTTGAAGTCTTCAATTTCAAAGAGCACATAACAAACC  
ACACCGCAAACGCCACTAAAAATTGAGAATATTTATGGAATCTTGATGTCTGCCAAAAACAGTTATCAAACCCG  
TTTGGAAAGATCCACAGAGCAAAACCGCCGTCTTCATGTCAATATTTTGGACTATTTTGAAGTAGGTCCATTACA  
TTTCTAAAATATTTCTGAGAGAAATCACTACAAATTACAGTACTGTAATTGGATGCATTGTTTTGATAATCGTA  
GTTTCGTGACGCAATGCCTCAAATTTGGCATTAAATGAAGGCAGTTAATCATTCCACTTTGTTATGTATTTCCAAAA  
TTACCTGCACAACATAAAAAGGAATTACGCCCGCAAATTTATCAAATCGTTGAAAGGAAACCTTATCAGGAAGTTT  
CAATAGCAACCTTTGTATTTGGTAGTTGTGCGAGTTACAGTTTCGTCAAAGTGGGTCATCCCCATTGTTGCTAGCT  
TTAAAGATAACCAAATATGGGCATTGTGAATTCTGAAGGTGTGTCCGCGGTCTTATAACTCGCGCTCGCTCCAAG  
ATCATTCACTTTGAGCTCAGCTGAAATAGAAGAAGTCAGAACCTTCGTTGTCTTAGGCCTAAACAAAAACACAT  
CAAAATGGGTGATGAAGAAATCGCAGCACTTGTGCTAGCAATGGATCAGGTATGTGCAAAGCTGGATTCCGCCGA  
GATGATGCTCCAAGAGCCGTCTTCCCATCCATCGTTGGCAGGCCTAGGCATCAAGGTGTGATGGTTGGCATGGGAC  
AGAAAGACTCGTACGTYGGAGATGAAGCTCAAAGCAAAGAGGTATCCTCACCTGAARTACCCAATCGAACACG  
GAATTGTACTAACTGGGATGATATGGAGAAAGTAAAGTTGGTCTTTTTGATGCTTCCATGTTGTTTTATCGAGTT  
TTTTTCATGAAGGACTTTGTGGAAGGAGGTCTTGTGACAAGTTGGCCATTTCCGTGTTCAAACTACTTTGGACT  
CTTAAACTTCTCAAAGTACCGCTACAGCTTCAAAGTTGTCKAAAAAGATGCACGAAAGATCTGGAAAGGTCTA  
TAAAAGATTTATTCATTCTTGAAGACTTTTTAAAGAAGTTGTAAGATTTCTAGCTACAGGAAACGTGATCCCT  
TTTGTGAGTTTCGAGTCACATGTTGAGGRKCAAAAAGTGCATACACTTTTAGTATTAGCTGATGTGTTAAA  
CCCGCTTCGATTTCTGATTCTATCTAAAGTTGCATGCCTGTGATWYATCGCTATATTTTAGTTAGAGGC  
TTGTGGCAACAAGGAGTTTTCAAGCCAGAGG.....CCACACCCMAGATCMCCTGGCTTCAGATCGCCCCACTC  
GGCCAAACAGCCAGAGCTAGCCATTGATGAAAGGAAACAGCGGAGCAAATAAAGAAGCTTTTCAACTTGCAC  
TTCCGTGAGTACCCCAACGCCCTGATAATTTAGTCACTTTTCCAGCCGTTGTGCAATCTCATTGGCCAATATTGCG  
ACATGTGACTTTCAACTGATAGGTATGGTCAGAAACCTGGTACTTGCACAATGGCTACATTTCAAAGGCCAAAA  
TGAAAGGGGTCAAATTTCTGTGCGGTTTCTTTGTTGGTTTTCTGCCTTTTTGTTTTCATGTGGTCTCCTGAAGGGCT  
GGGTACGAGGACACTGTTTCTTCTCAAGAGGTGCTTCTGGTTTTGGAACAAAGTTTGTGCAACGCGGAAACGGAA  
TCAAAGTGCATCTTTCAGTCAAATTTCTGCTATGTTTGAAGCAGCTTTCTACAATGTGACATGCCCTTTGTTT  
CGTTTTGATGCTTAAATGTGATGTTGAAAACACCCCTTTTATAGCTCCCCTGAATAAGAACCCCATTTGATT  
GAACCTTTCAAATCTTTCAGTAAAAGATGTTTGTGTTTTAAGAAATAAACAATTTTTTGGAGCAACACGAAATGC  
CCATTGTCCATTTTGTTTACAGTATTTTTATTTTTGTCTATTTACTTATGTATTTTTATTTTTCTTCCAGATCTGGC  
ATCACACATTTCTACAATGAACTTCGAGTTGCACCAGAGGAGCATCCAGTCTGCTCACCGAAGCTCCTTTAAAT

Genomische Sequenz *aktin* 3` potentieller Terminator

CTTGATGAAGATCCTCACCGAGAGAGGTTACTCATTACCACCACCGCCGAAAGGGAAATCGTCAGAGACATCAA  
GGAGAAACTCTGCTATGTGCACTCGACTTTGAACAAGAAATGCTCACAGCATCAACCAGCTCAAGCTTGAGAA  
GAGCTACGAATTACCTGACGGACAGGTATCACCATCGGAAACGAGAGATTAGGTGCCAGAAACCTCTTCCA  
ACCCGATTCATCGAATGGAATCAAGCGGAATCCACGAGACCATTACAACCTCCATCATGAAATGCGATGTGCA  
CATCCGTAAGGACTTGTACGCCAACACCGTCTTGTCTGGAGGTACGACCATGTTCCCAGGTATCGCCGACAGAATG  
CAGAAGGAGATCGCTTCCCTCGCACCTCAACCATGAAAATCAAGATCATCGCCCCACCAGAGAGGAAATACTCCG  
TATGGATCGGAGGCTCCATCTTGGCTTACTCTCCACCTTCCAACAGATGTGGATCTCGAAGCAAGAATATGACG  
AATCTGGCCATCCATCGTCCACAGGAAATGCTTCAAGCGCTCGCCAACCTTGAAGCTATGACTTGAATTTTTAT  
AATGTTTCAATTCAGATCCTAGTCCGCTAATTAAGTGTGCTGTTGATTGTTTAAACAGCCTCGTGAATAAAG  
AAAAGGAGGATATATTCATACGCATCGAGATTTGTTTTTACTTTCATTCCTGATTCTTAAAGTTAACGCTAT  
CTGTTTGATAAAGTCTTACTCAAGCAAAATAGTCTATCGGAGGTTTTTGAATCTTAAAAACTTAAAAAACATT  
GAATAATTTATAAGCCGTCTGTCTAGTAAATGTCAATTTCTTGAAWTGTGTTTATTACAAAAATAACATTTTC  
TTGCAACCATATCATGCAAAACGTTCTCTCAAAGAAAAACTTAGAAAACCATAGCGTTTGAATTTCTTTGAGRT  
CTCTTGTAGAAAATGGGGATTTGAGAAGTCTGCAACCATTTGTGGTTTTTCTTGCRTTTACGATACTAATAGA  
TGCCGATTTGACAGTTGGGTAAMTGSCGTCAAAAAATTTTTTAAATCGCGAAAGAGGCTTACAAATCGAGAACC  
AAAAAAGGCTAAACAGCTCTAAAGGCGAAGAACTACTTTGTAATCGTTTTCGTGAGGTATTGCGGAGGCAAAAAGT  
AACCGACTACCAATTTTTAAGATTCCCGAAGATTGAAAAACTGCTGCGAAAAATTTCTTTCAGCTCAAACTTGTG  
CATAGCTCAACRAGGTGAAGTAAGAAAAAGTTCTGTTTTTCTTCTGCTAAAGTCTCTCTTTAYTCTTTCAATTT  
CGTGCTCTCTCGTTAGGAAGCATAATAGAATARCGGCTGGAACAATTCAGAGAATCTGCATCATGAGCTATGA  
GAAAAACTTGGCTTGTGCAAAATCAAGGTCTTGTGTTGGTGCCAGAAAAACCCCGGGGGAGGGGGGACAGGTA  
CACGACTTGTGGRTGGACGGGGTCTGCCACCCGTTTTTTCAGAAAGCCMTCCAGCTTTTATGATGAATTTTGGTR  
RGAAACTACCCATTTTTAGCAATTTTTTGGCGATTTTCAGCCAAACCGACCCATGTTTATGGAATACTGCCGAAA  
AATGACCTTTGTTTTAAAAATTTTTGGCCAAAAACCAACCCACATTTCCCTACCATCAACATGTTATGTACCCCC  
CCCCCGGCAGAAAACAGAAAAGGTCCTTCTCTAAAATCGTTTTGGGGTCTTGTCTGTTCTGTCAAACCTTTAG  
AAAGTTCACAGAGCCATCCCCTGTTAAGAAAGTAAGAAACACTTCGGCTTTAAAATCATGGAAGGCAAATGGAC

TATGCAATTAGTTTGGAAAGTTAAAAAATCAAAAATTGGCAACTGTTGGCGTACCACAGGTAGTTGTTCTCGGAG  
CACTGTTCTTTATCAAAGATTGAACAAAAGAATTGCAACAACAACACGTTCTAGC

*ubiquitin*

CL18contig1 (Planula EST),

aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_885 (bs Polyp Transkriptome)

TGCAGGATTCGGCACGAGGCTGAGGAAGGAAGACGTGTCGTTTTAGTTCGTTTCGCTGTAAAAGTATCAAGATTTTC  
AAGATGCAGATCTTCGTGAAAACACTCACTGGAAAGACCATCACCCCTCGAGGTTGAGCCAAGTGACACCATCGAC  
AATGTCAAGGCCAAGATTCAAGACAAGGAAGGCATCCCACCAGACCAACAACGTCTCATCTTTGCTGGGAAGCAA  
CTCGAAGATGGCCGCACCTTGAGCGACTACAACATTCAAAAAGAGTCAACCCTCCACCTTGTTCTACGTCTGAGAG  
GAGGGATGCAAATCTTTGTGAAGACACTCACTGGCAAAACCATCACCCCTGGAAGTTGAACCCAGTGATACCATTG  
ACAATGTCAAGGCCAAAATTCAGACAAGGAAGGCATCCCACCAGACCAACAAGATTGATTTTTGCGGGAAGC  
AACTCGAAGATGGCCGCACCTTGAGTGACTACAACATCCAGAAAAGTCAACCCTCCATCTTGTGCTCCGTCTAAG  
AGGAGGAATGCAGATTTTTGTCAAAACTCTAACAGGCAAAACCATCACCCCTGGAAGTTGAGCCAAGTGACACCAT  
TGACAATGTCAAGGCTAAGATTCAAGACAAGGAAGGAATCCCACCAGACCAGCAACGACTCATTTTTGCGAGGCAA  
ACAACCTGAAGATGGCCGCACCCCTCAGTGACTACAACATCCAGAAAAGTCAACCCTCCATCTTGTGCTCCGTCTG  
AGAGGAGGAATGCAGATTTTTGTCAAAACTCTGACAGGCAAAACCATCACCCCTGGAAGTTGAGCCAAGTGACACC  
ATCGACAATGTCAAGGCCAAGATCCAAGACAAGGAAGGAATCCCACCAGACCAACAACGTCTCATCTTTGCGGGC  
AAACAACCTGAAGATGGCCGCACCTCTCAGTGACTACAACATCCAGAAAAGTCAACCCTTCATCTTGTGCTCCGT  
TTGAGGGGAGGAATGCAGATTTTTGTCAAAACCTGACAGGCAAAACCATCACCCCTGGAAGTTGAACCAAGTGAC  
ACCATCGACAATGTCAAGGCCAAAATCCAAGATAAGGAAGGAATCCCACCAGACCAGCAACGTCTCATCTTTGCC  
GGCAAAACCTGAAGATGGCCGCACCCCTCAGTGACTACAACATCCAGAAAAGTCAACCCTCCATCTTGTGCTTC  
GTCTGAGGGGAGGAATGCAGATTTTTGTCAAGACCCTGACAGGCAAAACCATCACCCCTGGAAGTTGAGCCAAGTG  
ACACCATCGACAATGTCAAGGCCAAGATTCAAGACAAGGAAGGAATCCCACCAGACCAACAACGTCTCATCTTTG  
CAGGCAAAACCTGAAGATGGACGTACCCTCAGTGACTACAACATCCAGAAAAGTCAACCCTTCATCTTGTGCT  
TCCGCTCAGAGGAGGAATGCAAATTTTTGTCAAGACCCTGACAGGCAAAACCATCACCCCTGGAAGTTGAGCCAA  
GTGACACCATCGACAATGTCAAGGCCAAAATCCAAGATAAGGAAGGAATCCCACCAGACCAGCAACGTCTCATCT  
TTGCGGCAAAACCTGAAGATGGCCGCACCCCTCAGTGACTACAACATCCAGAAAAGTCAACCCTCCATCTTGT  
GCTTCGTCTGAGGGGAGGAATGCAGATTTTTGTCAAGACCCTGACAGGCAAAACCATCACCCCTGGAAGTTGAGCC  
AAGTGACACCATCGACAATGTTAAGGCCAAAATCCAAGATAAAGAGGGAATCCCACCAGACCAGCAGCGTCTTAT  
CTTTGCTGGCAAACAGCTAGAGGATGGCCGCACCTTTGAGTGACTACAACATCCAGAAAAGTCAACCCTTCACCT  
TGTGCTTCGCCTCAGAGGAGGATGCTGAATAGAAGTGACTGTTTAGGACAATGCCATCAAATAAATGTAATAATA  
ACTAAAGTTGTAATTTAAAGTTATGTTAACTAAAGAGCCATTTATTTTCTTAAACCTGTTATGTAACCCAGACC  
TGCATGAAGCTTTTTGCTGAGCCCTGAN

Genomische Sequenz *ubiquitin* 5' potentieller Promotor

GTACAAAATTTTTCAATTCATCCCTTCTTTGACTTTGGGCCCTTGAGGAAACCAAATCTTCATTTGCTCCGAA  
CAATATGGCCACACCCATGCCACGCCACCCACACCCCTGCCACACCCATTTCCAGGTGTGCAGTGACATTTTAGG  
AAAAATATCTCGGGTGTGCACTTGCCATACTCTGCAGTCTGGATTTCAAGACTGGTTTTGCCTTATTGTTCCAAG  
CAATTGCCTCGCAGTTCAGCAAAAGCTTTTTCTTACCAATACCGATCTTCTTGATCTCTCTTTCTTCTGAAAG  
TTCATCTCTCTGCTGTGAAGTTGCTTGTTTTTGGCAGATGAAAGCCACTGGTTCGCCGCCATTTTGAAGGACACAG  
ACGAGACACGAGAACGAGACAACAACGCGACAGGCTTTGGAGTAGGAGTCTGGGGCGATGGAAAGATCGGGAA  
ATATCCAGATGGATTCTGGGAGATAGCTGTGGTTTGACAAATATAGGCATCAACAATCCTTTTTAGGGCAGCTCT  
AATCCAAATTAGGAGTATATGGCTCCATATAAGGGGTGCTATTGTACCGTATAAGGTTAATCTGTCCCTATTGTA  
CGTATGACTTGCATCATGTGACGCAACAATTTATACAAAACCGCTCTTTTCTCCAGCTGGCGCAAAGACTTCTG  
AAAGTTTGCTGAGGAAGAAAGACGTTTAGTTTCAGTTTCGTTTGTGTAATAATATCGAGATTTTCAGATGCAGAT  
CTTTGTGAAAACACTCACTGGAAAGACCATAACCCTCGAGGTTGAACCAAGTGACACCATCGACAATGTAAGG  
CAAGATTCAAGACAAGGAAGGCATCCCACCAGACCAACAAGACTGATCTTCGAGGAAAACAACCTCGAAGATGG  
CCGCACTTTGAGCGACTACAACATCCAGAAAAGTGCAGCCCTTCACCTTGTCTACGTCTGAGAGGA



### *histon 3*

Cl200Contig1 (Planula EST),

aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_635 (bs Polyp Transkriptome)

```
TCAGGTAAGAAAACACGATTTTTGATAAGTTAAAAACATGGCCCGTACCAAGCAAACAGCACGTAAATCAACTGGA
GGAAAAGCTCCACGAAAACAGCTTGCTACCAAAGCAGCCCGTAAAAAGTGCGCCATCAACAGGAGGAGTTAAAAAA
CCACATAGATACAGACCAGGAACCGTCGCACTTCGAGAGATTGCGCCGATACCAAAAATCAACTGAATTGCTGATC
AGAAAACCTCCATTTCAAAGGCTTGAGAGAAAATTGCTCAAGATTCAAGACCGATCTGAGGTTTCAAAGTGCA
GCCATTGGTGCCCTTCAGGAAGCAGCAGAAGCATACTGGTTGGATTGTTGGAAGACACAAAATCTTTGCGCCATC
CATGCAAACGTGTGACCATCATGCCAAAGGATATCCAGCTTGACGATAGGATACGTGGAGAGAGAGCATGAACA
CAAATTTGAACATTTAAACAATGTAATAGTCAGTATTATAAGCTAAGTTAAGCCCCCTTCCCCCAACAATAAG
ATGTTTCTAGTTTGACAATAGATAATCATGCTAAAGATTGCACCATAGCATTGTTAGCCATGATCTTTGTTTGCA
TCCAATGGAAAATTGTCCATTCATGATTCAGATCAGTCAAATTTTGGTACACAAAATGATGATGGTACATGATT
AATTGGTGCTATCGTTAATAGCGGAATCCTNCCTTTGTTGCAAACCTAGCCTGAAGAAAATGCTTTGAAATAAATAT
AGTTGCTGGATTTGTTAATATCAAGTTATGACGCCCTATTATTGAGATGA
```

Genomische Sequenz *histon 3* 5' potentieller Promoter

```
GCTAGACTATCTATATGAAAAAGACTTGGAACATTCGACAGATCTGCTTGCTGTCATGTTTTTTCATATATACCAT
AGCAATATAGACGAAGTACTAGTAAAAACCCGCGTATAAGAACCCTACTATTTTGCAAGTCAGCCTGTGGGT
TCTTAGACAATGAATACAATAATGGATTGGTTCCTATAAAACAGTTAAAAATTTGACAATTTGAGCCTGTAGGTT
CTTAATCCACTAGGTTCTTATATGCGGGTTTTTACTGTAGGCTATGTATAAATACTTATTAATTTTGGTGTAGA
AACTCTGNNTNTNGTCCAGTGGTNGAACATTTTTAAATTTTCTAGGCCTTTCTTCTCAGTTCAGTNTCCATT
ACGCTTGTGTTNCATTTGCAATAAAAAGATATGTCTGCAAACCTTTTGGTGTGTCAGTAAAGAGAAAATAAGCTTGGCG
CCGTGCTCTTATTTCCACAGCTTAGAATTTGAAGGGAAAACCTTTCCACTTGGCAACAAAATAAATTTGCCCGCCA
TGATTTTTGGTTGCGGCTCTTTTACTGAACTCTTTTCCACGTAACATCGAAATTTTATGATTGTATGACGTAA
TGACGTATGGCATGCCGCAATGGTGACGTAAACTGCGTAAAAACAAGTCTGGGCAAGGCCGTTGTTGTCTGTTGTG
TTTGTCCATGGTTTGTCAAACTTACCCTTGGGTACCAGATCACAACCTCTGAGACGTTCGAACTTTTCTCTAATGA
AAAATATGAACTTGCATTCATTGTAGGAAAAACCTAGACTAGCTACACTAGTCCCTCAATTTTCGCTGTTGTTGT
TGTTGCTGATGGCCTCAAAAAGTAACTTGCTACTTGCCAAAAAATATATAGTTTCCCGTCATTTGGTTTTCGGCAG
ATGTAATAATTCTTCTTTTCAAACACTTCAAAGGAACTACGTGACCATAAAGTTCATTACTTACATCGAAAAT
CCTGGGGAGTTGAGGCAAGTTGTCTTCGAGACAATGAGATTGTTTGTTCAAAATACTTAAANAATAATCTTATTG
TAAAGATTCACTCTCAAGACCTCAAGACATAAAGTTTGTACAGAAGAGAACCCTTTCCATCAATTTTTTCAAT
CGGAAATGAAATTTCTAACCAATCAAATCATCTGTAGCTTGTCCAATCAAATCGCTTAATTTTTAGTTATTA
CCAATCAGATTTGCTTTGAGTTTAAACCAATCAAATCTAGTATAACTCGTTATCATCACAATGGCTTCGGGAAT
TTTTCATCGCAAATGATTCAGAACACGAAGTAAAGAAGAAGAAGTCAAGAAAAAACGTAATTTGATAAGTT
AAAAACATGGCCCGTACCAAGCAAACAGCACGTAAATCAACTGGAGGAAAAGCTCCACGAAAACAGCTTGCTACC
AAAGCAGCCCGTAAAAAGTGCAGCATCAACAGGAGGAGTTAAAAAACACATAGATACAGACCAGGAACCGTCGCA
CTTCGAGAGATTGCGCCGATACCAAAAATCAACTGAATTGCTGATCAGAAAACCTCCATTTCAAAGGCTTGTGAGA
GAAATTGCTC
```

### **EF1**

Cl3Contig4, (Planula EST),

aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_45 (bs Polyp Transkriptome)

```
TGTACCCGGGCTTAACAAGTCACATCAAATCTGCACCTTTCAAAGGTTGAGTTTATGGTCGGCCATTTTGGTGA
TCGGTGATTAGTCATGGTGAGAGGAAATTACTTTTAAACCGCAGGGATGAGACATAAAGTACTGAAAATGCTTG
AAAATGGTAGCGTGGGTTTATCTGGTAATCAACTAAAACAATTTCAACATGGTAAGGAAAAAGAACATATCAA
CATTGTTGTAATTTGGTACGTTGACTCTGGAAGTCCACCACCCTGGACATCTCATCTACAAATGTGGTGGTAT
TGACAAGAGAACCATTGACAAATTTGAGAAGGAGGCTCAAGAGATGGGGAAAGGATCCTTCAAATATGCTTGGG
TTTTGGACAAACTGAAGGCTGAACGAGAACGTGGTATCACCATTGATATTGCCTTGTGGAATTTGAAACTCCAA
AGTACTATGTTACTGTCATTGATGCCCTGGACACAGAGATTTTCATCAAAAACATGATCACTGGAACATCACAGG
CTGATTGTGCTGTGCTTATTGTTGCATCTGGAAGTGGAGAATTTGAAGCTGGTATTTCTAAGAAATGGTCAAACAC
```

GTGAACATGCCTTATTGGCCTTCACTCTGGGTGTGAAACAAATGATTGTTTGTGCAAACAAAATGGACAGCACTG  
AACCACCATTCTCTGAAGCCAGATTCACTGAAATCCAGAAGGAAGTCACTGGATATCTCAAGAAGATCGGATACA  
CACCTGCAACCATCGCATTGTACCGATTTCCAGGATTCATGGTACAACATGATTGAGAAAAGTACAAGGATGG  
GGTGGTACAAAGGATGGGAAGTGGAAAAACCAAGGAAACGATGGGCAAAGACGGAAAGGTGACAAAAACCAAG  
GCAAAATTCAGTGGTACACCTTGTTAGAAGCACTTGACAGTGTGATGCAACCAATCCGACCCACAAGCAAGCCCC  
TTAGGCTGCCTTTCAGGATGTCTACAAGATTGGAGGTATTGGAACAGTGCCAGTGGGAAGAATTGAGACTGGTA  
TCCTAAAGCCAGGAGTAATTGTAACATTCGCCCCAGCTAACATCACCCTGAGGTCAAGTCAAGTGAATGCACC  
ATGAAAGTTTGGCAGAAGCAGTTCCAGGGGACAATGTTGGTTTCAATGTTAAGAATGTGTCTGTGAAGGAGATCA  
AAAGAGGAATGGTTGCAGGTGACTCGAAGAATGATCCACCCAAGGAGGCAAAGAACTTTGATGCCAGGTCA  
TCTTGAACCATCCTGGCGAAATCCATGCTGGCTACGCTCCAGTTCCTGACTGTCACACAGCCACATTGCATGCAA  
ATTTCGAGAATTGAAGGAAAAGATTGACAGGGGATCGGGAAAGAAAATTGAAGATTCCGCATCAAAAAGTTAAAT  
CAGGGGATGCTGCTATCGTCAATTTGGTTCCAAGCAAGCCAATGGTTGTTGAGACCTTCAGTGAATACGCACCAT  
TGGGAAGATTTGCTGTGCGTGACATGAAGCAAACGGTTGCTGTTGGAGTCATCAAGGCAGTTACAAAGATGGAGG  
GTGGTGCAGGAAAGACAACAAAAGCTGCCAAAAGGCCACAAAGAAGAAGTGAAGAAGATCGCTTTGAACTCAGTC  
GATTAGATATCTTTAGTTGCCACTCAATTTCCCTGTGGAATAATCATCAAAGAGATAACAACATCATGACTCTA  
CTGCGCTTAATCTAAAATTAGGGTCATGGAATTAACACAGTTGGTTACAAAAAATAAAAAAAAAAACTCGAGA  
CTAGTTTTCTCTCCGGCACGAGGGCGAAGGCCTCGTGAACCTCAATTTATTTGAAGAGAATCCTCTTTACAGCTAC  
TANAATGGGCGAAGTCTAAGAATCATACCAACCATAACCAAACCTATAAAGCACATAGGAATGGCATTCAAG  
CCACGAA

Genomische Sequenz EF1 5` potentieller Promoter

CTAGATTTTAGCTGAAGATCAAATCTTGAGTTTCAAATCAGGCCAATGTACATTTTATCGTGGTTTTTCAAAAA  
TGGATAGTTTTTCTTGGTGAATCCCGTTTTATATTGAAAAACAATATATACTACAAAAACTGCAGTGACAATC  
ACTTCCAGTACAAAGATATAATTATTCCAAAAACAGAAATGGGAAATTGTTACAAAGTTGTTTATTTTATGTTGT  
GYCTTCTCCTATTTGGCACTTTTTCATCAAAATCAGTTCAGCTATCAAYAGCACGRGGAAGGGGGAATARTTTGA  
AAATAAGCGAATGCCACAGATGAATGTCACCTGTGCGCCTTCTCATGGATCAACCAGCCTTCCAAAACCAAACA  
AACTCAGAATAAAATTACACCATAAGAAACGGGAGAATTTTCAAGCTTAAATTTGATATATTAATTTTAAAA  
AATTTGTTGATTATGTGTTGCAAGACGAATGTCACCTGTGCTGCTATCAATAAAACAGAACAGTATTTGGTATGA  
TAGCAATAAATTCTGAGAGACCCTTGCTGATTCCCAATCTAAAGACTGCTTGGCTTTAAATACTTGTACTTTAAC  
AAAATAGTTTTGGTACCGCTGGCTTCAAAAAATGATCAGACCAAAATACCTAATATAGGGTCTACTGGGGTAAA  
ATGGGGCATGCAAAAATGTGAATGAAAGTTATAAGAACTTCATGTACATATTTTCTCCAACATCTGTTGAAACT  
CCCTCCTTGAAGTTTTGAATGTTGATTGAACAGTTCATGATCTACCATTTTTCAGCAAATCAATACTAACAAAT  
TACTCCAGCCTCCCAATTTACCCTTGGCTAGAGTAGAAGTCCAAAAAGTATACCCTTGACGGCAGTGCATCACC  
CATACTTTACAATGGAAGAACCCCTCGTAGCGAGCTGCCAAGCTCACCTTAACTTAAATTAACAATAAAAA  
AACGTCTTTGATCAAGCTCTCCATTTCAACGATATGGAGTCTTGGTCTTGATACTGCAAGGGGATTTGATTATTT  
TATTAACCTCGCGTGAAGTTTCAACATGATCAAAGAAGCCAAAGGCAAGTGGCTTTGAAAACTTGTAGGTGCAC  
TGCCAGATTCACGAGGGAATGGAGAATATCAGGATTCCTTTTTCTAAAGATGTACACTGAAGTTCACACAAAA  
TGTCATTGACCAGGCATCTAAAGAGGGGTCAAACCAATCAAGAGTGCCTATCGTGTAATTTATATGTTCCACTGCA  
TCAATACAAAACCTGACTGTAGATAAGGGCAACTTTTGTCTATCTGCTTTGTTTACATCATTGGCTTGATTACTCAG  
CCCTTGAATCTCTTCGCTTTCAGTCACTAATCACTTTGAAATTTGTGTGTCATCAAATGCAAGTTTTGATATTG  
TAACAAAATCTGCTATTGTACTAAGCACTGGCTTCCCCTTCGGATTTGTGGTAAGTTTCAGAATTTCTTAAGTCT  
TTTATGCATTTTCATTTAGCTTTAATTGCTAACTTGTTTTTTCAGGTATATCTGGTAATCAACTAAAACTTCAACAT  
GGGTAAGGAAAAATTTCAATCAACATTTGTTGTCATTTGGTTCATGTCGACTCCGGCAAGTCCACCACCTGGTCA  
TCTCATCTACAAATGTGGTGGTATTGACAAGAGAACCATTGACAAATTTGAGAAGGAGGCCCAAGAGATGGGGAA  
AGGATCCTTCAAATATGCTTGGGTTTTGGACAACTCAAGGCTGAACGAGAACGTGGTATCACCATTTGATATTGC  
CTTGTG

### 9.3 Reporter-Konstrukte

**P1: VTP-H 12; P2: VALP18; P3: VTTG3; P4: VA16M26; P5: VUG11 ; P6: VA16G3; P7: VHPII 4; P8: VEGT3; P9: VEKT7; P10: VEG4; P11: VEK12; P12: VAGT2; P13: VAKT1; P14: LigAN3**

#### P1: VTP-H 12

VTP-H Vektor: M13R/SP6 -> Tubublin 1181 bp Promotor (CL2Contig1), GFP, 1072 bp Actin Terminator(CL1Contig2) -> T7/M13F built out of LigR2

**Sall** (Promoter:) **SbfI** AgeI **PacI**(GFP: -) **AsiSI** (Terminator:) **AscI** **NotI**

```

CCCATATGGTCGACCACTACAGTCTTTTGGTCATGCATGAAGTTAGCTGATTGGTCAATTATCGTAAAAATATGGG
CAAACTTATTTTCGCCCTCCAGCTCAACAACAGCAACAGGTAAGTCTCAAACATTTAGGCCTGTTGTGAAAAGAAC
GAACGAACATGTGATATGAATTCTGTCAAACTCTTCAAAANCAGCCATTCTCCAAAAGAAGTCTGGAAGGGAAA
TTAGAAATAAAGCCTTTGGGGCCAGATCGACCAGATTTGCTGACGAAGTCATCATCGCGTAGATTTACGAGGAGC
NGGTATTCTAGGTACGAGTGGGTTACAGGTTGTGGCGAGTCTGGAAAGGTTTGTGTTTTCTTGCCTTCTGTTT
GGCGAGTCTCAGCGAGAAGAGCACAATTTCAAGGAGACAAAATTNCAAGACAGGAGAGCAAAATCTCTTTAAG
TGATAAAAATGACCTCTGAAAATTTTTACTCCTATCTGTGTGTTGCCAAAATTTGTTGTGTTTTACAATGTTCTT
TAGAGAGAAAATAAAAACTTTTTTACAGAAATTTGAGAGCAATTGTTAACTCAATCAAGGCAAGAAAATATCT
TCCAAGCCGTTCTGCCATAGGTGGGCACTTGCAGAAGAAAACTNGGTCTGCCAAAAGTACTCAAACTTTCT
GGAAAATATATGAAAAAGGCCGTTGCCTGTGNTTCCGAGCGTTTGAAGGGCGTGGTCACTAAAAATTTCCCA
GACCCCTTCACTTTCCACAGTTGCCCCACCAAATATTTTCATCACCAGCCGCACTGATGAAGGAGCTTACAGTT
TCCACGCAACAGAAATGCATCATCTCTTGAATCCATATTTGGCAAATTTGACGACAGCACAATAGCAACGTGG
TTTTGGCAAATAGACCAATCAAATCACATGAATTTCTGGGTTGCCTTAGCTACCGGTGAAGACGTCCATTTAGACC
AATCAGATTTGATTTTCGGTCTCATATCACGCGAAGATGAACCAATCAGATTAANGATGCGACGGTTGACTGAAT
AGCTGGGGTGATTGATTTATGCGTGGAATCCGTTGAAGNTTCATTTCAAGATTTCTCTGCTCNCGAACCGTTG
CTCGAAAGAGTGAAGAAGTATTCTCGAAATTTACTAACTGTTTTAAGAACAGCAAACAACAATCAAGATGGC
TGAACTGCAGCACCGGTTTAATTAATGAAAAAATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACTGGAGTTGTCCAAT
TCTTGTGTAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATA
CGGAAAATTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAATACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTT
TGTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCATGCC
GAAGGTTATGTACAGGAAAGAATATTTTTCAAGATGACGGGAATACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTT
GAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGGACA
CAAATTTGGAATACAATACTACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAAGAATGGAATCAAAGTTA
ACTTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCACTAGCAGACCATTATCAACAAAATCTCCAATTG
GCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTGAAAAGATCCCAACGAAAA
GAGAGACCACATGGTCTTCTTGGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAAGC
GATCGCGTAAACAGCTCCCAAGAATTTCAATTCATCGTCCACAGGAAATGCTTCTAAATATCTCGAAGGAAATTA
ATCAAGAATATACTGTTTGAACCGTTTCAAGTTTCAAACTTTTCTTCTCACTCACGCCTCTCCTTGTATATAT
GGTTGATAATTTTGAACATTTTCAATTTGTTAGTTTTGACTGTGTATATATGTCCTCAAGTAGGGTGGATCATT
TGAGACGAGCTATATATAACAAGAAGTAAATTCAGCACCTCAACTGGCTTATGTTGTCTTGTCAATCTCTGATC
GTCGTTTATTTATATTAATGCCAAATTTATCGCTATTTGTTCTAAGGTTCAAGGCAATTTCTCAAAGTAATTTGTA
ATTTGAAAATGTGACGTTATTTTTGAAGACAGTTTCTAAATTTCTATTCGACTATTTGTCCATCTCTACCTACTG
TGTTTTGGTGTGTAATGTTTAAACCGAGCTTTGAGCTAAGAATTTTCTGAAAAGTGTATGTTTTCTGTTCTGTTT
GAAGTAAAATGATAAACTTTATTTAGTATGAAGAAAAATAACGAAAAAATAGAAGTGTTCATGCGCGTTTTT
GACTGAACAGACGACCAAGACTTGAATTTGTCAAGGTGGGAGGAATGGTTGTTGAAGTGTGCTTGTCCAA
GAAGTGTCCAAGAAATATTTTGAATATTTGGAGGGAAGATGGTTCAACGAAAATGTTTGTGACAGAGTTTGC
AAAAATTTGTGTCAAGATCTTACTGTACAACCGAAAAAAGCTTGAAGCTTTTTAGAAAATAGTTGACCAGCTC
ATTTGTTGACTATAGGCGATACTACAAATTTTGTAAATGGCCTCGTAGAGAAAAGTCACTTGTCTAACGGTG
CACAAAACGATGATTGTTACTCGCCAGACTCTTGTTCATCGTAACAAATGGGAACAAATGTGCCAACTACAAA
AAGGTATGGCAGAAAAGTCAACTTAAAGCCAAATTTAAAAAGAAAACAAAATCCAACGAGAAATAATGAAGT
ATTTTATATTGAGATCAAACCTGAAGGAAAACACGGCGCGCGACTGCGGCCGC
    
```

**P2: VALP18**

VALP Vektor: M13R/SP6 -> 1350 bp Actin promotor (CL1Contig2), GFP, 1072 bp Actin Terminator (CL1Contig2); *Hydra* Actin Terminator, Dsred, *Hydra* Actin Promoter ) -> T7/M13F built out of LigR2

**Sall** **XbaI** (Promoter: **PacI**) **SbfI** **PacI** (GFP: -) **AsiSI** (Terminator:) **AseI** **NotI**

CCCATATG**GTCGAC**ATCTAGACTTTTCGTAATTTGTAGCTTTAATTTTCCCAAGGTCACCTTGAATGTTTCGACACT  
 GTACAGTAATAGTAAATGTTTTGGCATTGTTTTGAGTGCGAATTAAGTTATAACATGTTTTGAGACCTTACAAGG  
 TTACAAAGTAATTTGTAATTCGTAAGCCCTTCTAACAAAAATATATTCGCTCTACATAAGAACTTTTGGTAGCA  
 AAATGGCCCTAAAATTTAAGAACTGCCTACCAACCCCGACCTAATAAGCCGATTCAAGCATTTCCTTTTGCAA  
 TCCTTTGCAATGGCAAACCACAAAAGTGTAGGATTTACTGGTTT**TTAATTAA**TATTCGTTCCGAAAAATTTATA  
 ATTTTCTGAAGCTCCAAGGGCTCCTTCTTTGTTAGACGATTTAAACACGAAAGCTTCGATGGCCACTTACATT  
 TTTTAAAAGAAACGGCAAGTTTCTTAAATTTTAGGACATTTTTGCTAACAGTTTCTTATGAGTTCCAATTCATGC  
 GTGGGACTTTCCAATTTTAGATTTTAAATGGTCTGACGTCTAATTGTAGAATTATTTTATTTTTGTTAAACAGAT  
 TCCAAAAGTACATAGTAGTAATATCTCAAAATATTAACAGTAAATGTTCAATCGTGAGCGTAGTTGCAAAAGAA  
 AAACCTAACCAAGAAAACAAATAATTTATAAGTAGAGCCTGAAGCCCTGAATTGATCGTTATCATCTGCAAACC  
 ATATCTATTTGAAGCAGATTCGGTACGCGATAAATTTGACAGCTTTTCTGTACGTCCAAAATATTTTGATAGCT  
 TTTCTGTACTTCCCAAAGCATTGAACTTCTTCAGCAAATGGCCTGGACTTGCTCAAGTCTGATTCAAATGAACCA  
 GAACAAGGAAATGAAACACAGAGCTAGCTTTGCGGTCCAGGCTTCGAGGGCTGCGGGTAAATAGCCCTGAACG  
 ACACCAAAATATTCATTTGAAAACCACCTGCACGAATTGTCTAAGCCTTTTCAAATCAATAGTTCGAATAACCC  
 AATCAGAGAGCAGTATTTTCAAACTAGCCAATTAGCGTGGGACAACCTGTCTGTGGGGATTACTCGAATGTGA  
 GTGAATTATTGAGGCGGACCGTTATATCCTTGTAGGTATGCTAAACATGGTGCCTAAACAAACAATGCATTCCA  
 TTACCGGAAATTGCCTTATTTGGTCATATCGCTGGAATCGCTCACATGGCCAGCCTATACATATGAGCATGTGCA  
 ACAGTTGAACATTCTACTTGAAGTGAACCTTCGAAACGGTAAGANCCGCACAGCTTTTAGAAAACCTTCTTATTC  
 AACCAAACTCACAAATTCAT**ATG**GGTGATGAAGATGTAGCA**CTGCAGC**ACCGGTA**TTAATTAA**TGAAAAAATG  
 AGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCAATTTCTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAA  
 TTTTCTGTCTAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGA  
 AAACCTACTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTGTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATC  
 ATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAG  
 ATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAG  
 GTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTTGGAATACAACATAACTCACACAATGTATACA  
 TCATGGCAGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAAGTTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTT  
 CAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGT  
 CCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTG  
 CTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAA**GCGATCGG**GTAACAGCTCCCAAGAATTTCAATTCATCGTC  
 CACAGGAAATGCTTCTAAATATCTCGAAGGAAATTAATCAAGAACTATACGTGTTCCAACCGTTTCAGTTTCAA  
 AACTTTTCTTCTCACTCACGCCTCTCCTTGTATATATGGTTGATAATTTTGCAAATCATTTCATTGTTAGTTTTG  
 TACTGTGTATATATGTCTCAAGTAGGGTGGATCATTGAGACGAGCTATATATAACAAGAAGTAAATTCAGCA  
 CCTCAACTGGCTTATGTTGTCTTGTCAATTCCTGTATCGTCGTTTATTTATATTAATGCCAAATTCGCTATTTGT  
 TCTAAGGTTCAAGGCAATTTCTCAAAGTAATTGTAATTTGCAAATGTGACGTTATTTTTGAAGACAGTTTCTAA  
 ATTTTCTGAAAGTGTTATGTTTTCGTTCCTGTTTGAAGTAAATGATAAACTTTATTTAGTATGAAGAAAAAT  
 AACGAAAAATAGAAGTGTTCATGCGCGTTTTGACACTGAACAGACGACCAAGACTTGAATTTGTCAAGGT  
 GGGAGGAATGTTGTTGAAGTGATCGCTTGCCAAGAAGTGCCAAGAAATATCTTGAATATTTGGAGGGAAG  
 ATGTTTCAACGAAAATGTTTGTGACAGAGTTGCAAAAATGTGTCAAGATCTTACTGTACAACCTCGAAAAAAA  
 GCTTGAAGCTCTTTTAGAAAATAGTTGACCAGCTCATTGTTGACTATAGGCGATACTACAAAATTTGTTAATGGC  
 ACTCGCTAGAGAAAGCTCATCTTGTCTAACCGTGCACAAAACGATGATTGTTACTCGCCAGACTCTTGTTCAT  
 CGTAACAAATGGGAACAAATGTGCCAACTACCAAAAAGGTATGGCAGAAAAGTCAACTTAAAGCCAAATTATAA  
 AAGAAAAACAAAATCCAACGAGAAATAATGAAGTATTTTATATTGAGATCAAACCTGAAGGAAAAACAC**GGCC**  
**GC**GACTAGTTTATACGTCATTGACTTGAAGTATTTAAAATAATAAAAAACATGTTAGCCTAAACTTTGCTTAT  
 TCATTTTTCTAATAAGTTTTTCTCTAAAATAACGCGCAAAACCTGATTTGATAAATTAAGCGACAATTTAATCAA  
 GTAAATTAAGGAACAAAAGTTAATAGACGACTTTTCTAATAATAAAGTATAACAAAATCACGAGTACAGTACT  
 TAAGACCATCCAAGTTAATTTTAAATGTTTACATTAATTTTAGTACCTCAGGAGCGCCTTAATTCCTGAATTTA  
 TTTTAAAACCTGTTATTTATTATAATTAAGGAAATTCAGTAATAAAGAAGTTTGTAGGACGCTTTTATATAT  
 TACAGCTTAACAAAATACATGGGTTTTAAAACGTTTATAAGATATATATAGAAAAATAAATGTGAAAAATAAC  
 CGAACAGATGTAATAATAGTCCAGTATAAATAAATCGAATTGTGAATCTACGAAT**GCTATAAAAAATAAATGA**  
**TGTCTACCTTCTGTTCTTTTCATATTTGTTCAACAATTTGTATAATCTTCATTATGTGATGTAATATCTAAGT**  
**TCTACATAATAATATCCTGGTAATTTGAAGTGGTTTTTTAGCCATATAAATGATTTAAATTCAACTAAATAATGT**

CCTCCGTCCTTTAATTTTAGAGCTTTATGTGTTTCTCCCTTAAACCCCGTCTCTTGGATATAATCTTTCTGTAC  
TAGCTTCCCATCCCATTGTTTTTTTTTGCATAACTGGTCCGCTGATGGAAAATTAACCCAATAAATTTAACTTT  
ATAAATAAAACAACCATCTTGTAATGATGAATCTTGTGTAAGTGTAGCAACTCCACCATCTTCAAAATTCATAAC  
TCTTTCCATTTAAATCCTTCTGGAAAAGATAATTTTTATAATCTGGAATATCAGCTGGATGTTTAAACGTAAC  
CTTTGATCCATATTGAAATTGTGGTGATAAAAATATCCCACGCAAATGGTAATGGTCCCTCTTTTGTAACTTTAA  
TTAACTGTATTATGTCCTTCATATGGTCTACCTTCTCCTTCTCCCTCAATTTCAAATTCATGTCCATTAAGTGA  
CCTTCCATTCTAACTTTAAATCTCATAAATTTCTGTAATAACATTTTCTGATGAAGCCATTGGCCGGCCGAGGGCG  
GCAACTTCATCATCGGC~~CAI~~TTTTGATTAAGTGTTTTGTAAAAAAGAGAAGAGCTGAGTATCAAGCAAAGCTGAA  
GCTTCTGAATAACGAACGCTGAACTAATTGCGCTTTTTATGGTGAATCGCTTGAGCGCTTTTTTGACCATATAAG  
AAAAAAACGGCTAAGCAAAAAGTTATTGTTTCGAAAAGGTCTTTATATGGACAAAATTTGCACGCGTTATTT  
TATTAAGAAAAATAAAACGGATATGTAAGTTTTACCTATTATTTATAAATTTAATAAAAAATAATTATAAAAT  
AAATTTTTTTTTATAATATTACTTTTTATTATACTTAATATATATTTTAAATGTGTTTAAAAATTTATAAATTTTA  
ATATATATATTTATAATATTTTTAAAAGATTTTTTAAACCCCGGTATTTAAATTTTTTTTACTTCAATTTATAAT  
CTTTAAAAACGTTTCTGTTTTTTTGGCGGTGTTTACGTACAGTGAACCCTGGTAGGATTTTAACTTTAAATGA  
AATATGTTCTCATTCAATAGAAACCACTTATGTTTGTCTTTTTTAAACGCGTAAACAAAATAGGAGTGGTTTT  
AAGTACATCACAAACCTTGAGATAACGTTTTTGGAAAGTAATTAATATATCAGTTGTTTAAAAGAAAATAGTGGC  
GTGTTGAAGTTACATTTGATATTTGAAATTTAAATTTTTTTTTATAGAATTTTACAAGTTTTTACTTTATTTTAA  
GAGATATATTGGTTTATTGATTTGAATAAGCAAAGTTTGGGTATTTATTGCTTGATTTAAAAGTGCAGGGGACTA  
ACTTAGTAGACTCAAATATTACTCTAGCGTTACAATGGTTTTAAAATTCGGTAACTTATAGAACAGCAACTTTA  
ACTTTATATTTTCAAGTTTTATTTTAAATAAAATTTATTGGTACTTCAATAAAATTTTACAGTTGCAAACCGATCACTT  
TACTCTACCGAGACTTCTTTTTTTCTTTTTTCAATTCAGAATCCTGCATCTCGGCTTAAA~~CGGCCGC~~

**P3: VTTG3**

VTTG Vektor: M13R/SP6 -> Tubublin 1181 bp promotor (CL2Contig1), GFP, 573 bp Tubulin Terminator(CL2Contig1) -> T7/M13F built out of LigR2

~~Sall~~ (Promoter: ~~SbfI~~ ~~PacI~~ (GFP: -) ~~AsiSI~~ (Terminator: ~~Sall~~) ~~AscI~~

CCCATATG~~GTCGAC~~CACTACAGTCTTTTTGGTCATGCATGAAGTTAGCTGATTGGTCAATTATCGTAAAATATGGG  
CAAACTTATTTGCGCTCCCAGCTCAACAACAGCAACAGGTACTTCAAACATTTAGGCCTGTTGTGAAAAGAAC  
GAACGAACATGTGATATGAATTTCTGTCAAACTCTTCAAAAACAGCCATTTCTCCAAAAGAAGTCTGGAAGGGAAA  
TTAGAAAATAAGCCTTTGGGGCCAGATCGACCAGATTTGCTGACGAAGTATCATCGCGTAGATTTACGAGGAGC  
NGGTATTCTAGGTACGAGTGGGTTACAGTTGCTGGCGAGTCTGGAAGGTTTGTGTTTCTTCTCTGTTT  
GGCGATTCTCAGCGAGAAGAGCACAATTTCAGGAGGACAAAATNCAAGACAGGAGAGCAAAATCTCTCTTTAAG  
TGATAAAAATGACCTCTGAAAATTTTTACTCCTATCTGTGTGTTGCCAAAATTTGTTGTGTTTTACAATGTTCTT  
TAGAGAGAAAATAAAAACTTTTTTACAGAAATTTGAGAGCAATTTGTTAACTCAATCAAGGCAAGAAAATATCT  
TCCAAGCCGTTCTGCCATAGGTGGGCACTTGCAGAAGAAAACTNNGTCTGCCAAAAGTACTCAAACTTTCT  
GGAAAATATATGAAAAGGCCGTTGCTGTGNTTCCGAGCGTTTGAAGGGCGTGGTCACTAAAAATTTTCCCA  
GACCCCTTCACTTTCCACAGTTGCCCCACCAAAATTTTTCATCACCAGCCGCACTGATGAAGGAGCTTACAGTT  
TCCACGCAACAGAAATGCATCATCTCTTGAATCCATATTTGGCAAATTTGACGACAGCACAATAGCAACGTGG  
TTTTGGCAAATAGACCAATCAAATCACATGAATTTCTGGGTTGCTTAGCTACCGGTGAAGACGTCCATTTAGACC  
AATCAGATTTGATTTTCTGGTCTCATATCACGCGAAGATGAACCAATCAGATTAANGATGCGACGGTTGACTGAAT  
AGCTGGGGTGATTGATTTATGCGTGGAAATCCGTTGAAGNTTCATTTCAAGATTCTCTCTGCTCNCGAACCGTTG  
CTCGAAAGAGTGGAAGAAGTATTCTCGAAAATTTACTAACTTGTTTTAAAGAACAGCAAACAACAATCAAG~~ATGGC~~  
TGAA~~CCTGCAGG~~ACCGGTA~~TTAATTA~~TGAAAAAATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACTGGAGTTGTCCAAT  
TCTTGTGTAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATA  
CGGAAAATTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAATACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTT  
TGTTATGGTGTTCATGCTTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTTCAAGAGTGCATGCC  
GAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTT  
GAAGGTGATACCTTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTTAAAGAAGATGGAACATTTCTGGACA  
CAAATTTGGAATACAACATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGTTA  
ACTTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTG  
GCGATGGCCCTGTCTTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTGAAAGATCCCAACGAAAA  
GAGAGACCACATGGTCTTTCTTGTGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAA~~GC~~  
~~GATCGC~~~~GTGA~~ACTCCATTGACGCAGAGGGAGAAGAGGAAGGTGAAGAATACTAAATGAACTGAAAAGTAAAATTT  
GGACAATCTGTTTAAATGTTTGTAAACGTTGAAAATGTTGTGAAAAGTTTAAAAGAAGGCAAAGTGAACAAG  
TATAAAAAAAGCTTCATATTTCTTTCTTGTATTTTTCTTCTTAACTAACAAATAAGATTGTGCTAAAGATGTC

TGGAAATTTTTACCAAGATCATTTGCATCGACAATCAAATCCATTA AAAATGCGGTGGGATGCAAAGGATTGTGGT  
AATAAGTTCTATTTAACTTCTTTGGTGCAGTTGCCTTCTTGATTTTTGAGAGATTTCTTGGTGCAAATTGCAAGA  
TAATCATTTGACTAGCATGTGCAAGTTCTTACCAAAGCAGGAAAGTGATAAAAAGAGACCAAATCATTGCTTTGT  
GATCAAAGTTGGTAGTCGACGTTTGTAGTGTGCAAATTTAGCTTGGTACTTCTGTGGAAATAAATTATATCCATC  
TGAAATATGGCTGACTAAGGATGGTAGCAGGATTTTTGGTATGATCCATCCATGGGAAATGCGCGCCGACTAGC  
AATTCGCCCCATATAGTG

**P4: VA16M26**

VA16M Vektor: M13R/SP6 -> 1642 bp Actin promotor (CL1Contig2), mCherry, 1072 bp Actin Terminator(CL1Contig2) -> T7/M13F built out of LigR2

**Sall** **XbaI** (Promoter: **PacI**) **SbfI** **PacI** (mCherry: -) **AsiSI** (Terminator:) **AscI**

CCCATATGTCGACATCTAGACTTTTGGTAGCAACAAAATGTTCTAAAATTTAAGAACTTTCTACCAGCCTGGA  
CCAGCCTGAGTTTCTTATAAAAATTCATGTTAGGAGCAAAGAAGAAACATTTCGCAGTTTCGCGTAGGCCATCGAA  
GCTTTCGTGTTTTATATCATCTAGCCAAATAGCTTCATGCCGAAGCAAAGTTTTTTTCATGACNGCACTCATT  
TTTTATTAGAAACAGCTTATAAGAAACAGTAGGCTCAATTTTTCAAACNTAGTGAGCTATCCCACCTGAATTA  
GACAGCTAAGAACTTTTCGTAATTTGTAGCTTTAATTTTCCCAAGGTCACTTGAAATGTTTCGACACTGTACAGT  
AATAGTAAATGTTTTGGCATTGTTTTGAGTGCGAATTAAGTTATAACATGTTTTGAGACCTTACAAGTTACAAA  
GTAATTTGTAATTCGTAAGCCCTTCTAACAAAAATATATTCGCTCTACATAAGAACTTTTGGTAGCAAATGGC  
CCTAAAATTTAAGAACTGCCTACCAACCCCGACCTAATAAGCCGATTCAAGCATTTCCTTTTGCAATCCTTTGC  
AATGGCAAACCACAAAAGTGAGGATTTACTGGTTTAAATTAATTTTTCGTTCCGAAAAATTTATAATTTTCTG  
AAGCTCCAAGGGCCTCCTTCTTTGTTAGACGATTTAAAACACGAAAGCTTCGATGGCCACTTACATTTTTTAAAA  
GAAACGGCAAGTTTCTTAAATTTTAGGACATTTTTGCTAACAGTTTCTTATGAGTTCCAATTCATGCGTGGGACT  
TTCCAATTTTAGATTTTTAATGGTCTGACGTCTAATTGTAGAATTTTTATTTTTGTTAAACAGATTCCAAAAG  
TACATAGTAGTAATATCTCAAAATATTAACAGTAAATGTTCAATCGTGAGCGTAGTTGCAAAAGAAAAACCTAAC  
CAAGAAAACAACTAATTTATAAGTAGAGCCTGAAGCCCTGAATGATCGTTATCATCTGCAAACCATATCTATT  
TGAAGCAGATTCGGTACGCGATAAATTTGACAGCTTTTCTGTACGTCCAAAATATTTTGATAGCTTTTCTGTAC  
TTCCCAAAGCATTGAACTTCTTCAGCAAATGGCCTGGACTTGCTCAAGTCTGATTCAAATGAACCAGAACAAGGA  
AATGAAACACAGAGCTAGCTTTGCGGTCCCAGGCTTCGAGGGCTGCGGGTAAATAGCCCTGAACGACACCAAAA  
TATTCATTTGAAAACACCTGCACGAATGTCTAAGCCTTTTCAAATCAATAGTTCCGAATAACCAATCAGAGA  
GCAGTATTTTCAAACTAGCCAATTAGCGTGGGACAACCTGTCTGTGGGGATTACTCGAATGTGAGTGAATTAT  
TGAGCGGACCGTTATCTCTTTAGGTATGTTAGGATAAATGTTGCGTAAACAAACAATGCATTCGATTACCGGAA  
ATTGCTTATTTGGTTCATATCGCTGGAATCGCTCACATGGCCAGCCTATACATATGAGCATGTGCAACAGTTGAA  
CATTCTACTTGAAGTGAACCTTCGAAACGGTAAGANCCGCACAGCTTTTAGAAAATTTCTTATTCAACCAAAT  
CACAAATTCATATGGGTGATGAAGATGTAGCACTGACGACCGGTAATTAATTAATGTGAGCAAGGGCGAGGAG  
GATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTTATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTC  
GAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGC  
CCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGA  
CATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGC  
GTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTCCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACT  
TCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCGAGGA  
CGGGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGAC  
CACCTACAAGGCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCAC  
AACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCGGAGGGCCGCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGT  
ACAAGCGCATCGCTAAACAGCTCCCAAGAATTTCAATTCATCGTCCACAGGAAATGCTTCTAAATATCTCGAAGG  
AAATTAATCAAGAATAACGTGTTGAAACCGTTTCAGTTTCAAACCTTTTCTTCTCACTCACGCCTCTCCTTGT  
TATATATGGTTGATAATTTTGCAAATCATTTCATTGTTAGTTTTGTACTGTGTATATATGCTCTCAAGTAGGGTG  
GATCATTTGAGACGAGCTATATATAACAAGAAGTAAATTCAGCACCTCAACTGGCTTATGTTGTCTTGTCAATC  
TCTGATCGTCGTTTATTTATATTAATGCCAAATATCGCTATTTGTTCTAAGGTTCAAGGCAATTTCTCAAAGTA  
ATTGTAATTTGCAAATGTGACGTTATTTTTGAAGACAGTTTCTAAATTTCTATTGACTATTTGTCCATCTCTA  
CCTACTGTGTTTTGGTGTGTAATGTTAACCCGAGCTTTGAGCTAAGAATTTTCTGAAAGTGTATGTTTTCGTT  
CCTGTTTGAAGTAAATGATAAACTTTATTTAGTATGAAGAAAAATAACGAAAAATAGAACTGTTTCAATGCG  
CGTTTTTGACACTGAACAGACGACCAAGACTTGAATTTGTCAAGGTGGGAGGAATGGTTGTTGAAGTATCGCT  
TGTCCAAGAAGTGTCCAAGAAATATTTCTGAATATTTGGAGGGAAGATGGTTCAACGAAAATGTTTGTGACAG  
AGTTTGCAAAAATTTGTGTCAAGATCTTACTGTACAACCTCGAAAAAAGCTTGAAGCTTTTTAGAAAATAGTTGA  
CCAGCTCATTTGACTATAGGCGATACTACAAATTTTTGTTAATGGCACTCGCTAGAGAAAGCTCATCTTGCTCT

AACGGTGCACAAAAACGATGATTGTTACTCGCCAGACTCTTGTTTCATCGTAACAAATGGGAACAAATGTGCCAAC  
TACCAAAAAGGTATGGCAGAAAAGTCAACTTAAAGCCAAATTTATAAAAGAAAACACAAATCCAACGAGAAATAA  
TGAAGTATTTTATATTGAGATCAAACCTGAAGGAAAACACGGCGCGCGAC

### P5: VUG11

VUG Vektor: M13R/SP6 -> 716 bp Ubiquitin promotor (CL18contig1), GFP, 1072 bp Actin Terminator(CL1Contig2) -> T7/M13F built out of LigR2

**BstXI** **SacI** **Sall** (Promoter: **NotI**) **SbfI** **PacI** (GFP: -) **AsiSI** (Terminator: **AscI**)

GCGCADCGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCCCCGTAT  
GTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAG  
GTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACAACGGCCCCCTTT  
GACTTTGGGCCCTTGAGGAAACCAAATTCCTCATTGCTCCGAACAATATGGCCACACCCATGCCACGSCCACC  
ACACCCTGCCACACCCATTCCAGGTGTGCAGTGACATTTTAGGAAAAGTATCTCGGGTGTGCACTTGCCATACTC  
TGCAGTCTGGATTTCAAGACTGGTTTTGCCTTATTGTTCCAAGCAATTGCCTCGCAGTTCAGCAAAAGCTTTTTCT  
TACCAAATACCGATCTTCTTGATCTCTCTTTCTTCTGAAAGTTCATCTCTCTGCTGTGAAGTTGCTTGT  
CAGATGAAAGCCACTGGTCGCCGCCATTTTAAAAGCACACGACGAGACACGAGAACGAGACAACAAACGGCACA  
GGCTTTGGAGTAGGAGTCTGGGGCGATGGAAAAGATCGGGAAGTATCCAGATGGATTCTGGGAGATAGCTGTGGTT  
TGACAAATATAGGCATCAACAATCCTTTTTAGGGCAGCTCTAATCCAAATTAGGAGTATATGGCTCCATATAAGG  
GGTGCTATTGTACCGTATAAGGTTAATCTGTCTTATTTGACGTATGACTTGCATCATGTGACGSAACAATTTAT  
ACAAAACCGCTCTTTCTCCAGCTGGCGCAAAGACTTCTGAAAGTTTGTGAGGAAGAAAAGACGTTTATGTTTCA  
GTTCTGTTTGTGTAAAATTATCGAGATTTTCAGATCTTTCTGCAGGACCSGTAATAATTAATGAAAAA  
ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGWCCCAATTTCTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCA  
CAAATTTTCTGTCTAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTAC  
TGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTGTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCA  
GATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCATGCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTTC  
AAAGATGACGGGAACACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTAAATAGAATCGAGTTA  
AAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAACATTTCTGGACACAAATTTGAATACAACATAACTCACACAATGT  
ATACATCATGGCAGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACAATTAAGACACAACACTTGAAGATGGAA  
GCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTTGGCGATGGCCCTGTCTTTTTACCAGACAACCATTA  
CCTGTCCACACAATCTGCCCTTTGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAGTTTTGTAACA  
GCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAAACGATCGGTAAACAGCTCCCAAGAATTTCAATTCAT  
CGTCCACAGGAAATGCTTCTAAATATCTCGAAGGAAATTAATCAAGAACTATACGTGTTTCAACCGTTTCAGTT  
TCAAAACTTTTCTTCTCACTCACGCCTCTCCTTGTATATATGGTTGATAATTTTGCAATCATTTCATTGTTAGT  
TTTGTACTGTGTATATATGCTCTCAAGTAGGGTGGATCATTGAGACGAGCTATATATAACAAGAAGTAAATTC  
AGCACCTCAACTGGCTTATGTTGTCTTGTCACTCTCTGATCGTCTTTATTTATATTAATGCCAAATTATCGCTAT  
TTGTTCTAAGGTTTCAAGCCAATTTCTCAAAGTAATTTGAAAATTTGAAAATGTGACGTTATTTTTGAAGACAGTTT  
CTAAATTTCTATTCGACTATTTGTCCATCTCTACCTACTGTGTTTTGGTGTGTAATGTTTAAACCGAGCTTTGAGC  
TAAGAATTTTCTGAAAGTGTATGTTTTGTTTCTGTTTGAAGTAAAATGATAAACTTTATTTAGTATGAAGAAA  
AATAACGAAAAAATAGAAGTGTTCATGCGCGTTTTTGGACTGAACAGACGACCAAAGACTTGAATTTGTCAA  
GGTGGGAGGAATGGTTGTTGAAGTATCGCTTGTCCAAGAAGTGTCCAAGAAATATCTTGAATATTTGGAGGG  
AAGATGGTTCAACGAAAATGTTTGTGACAGAGTTGCAAAAATTTGTGTCAAGATCTTACTGTACAACCTCGAAAA  
AAAGCTTGAAGCTCTTTTAGAAAATAGTTGACCAGCTCATTGTTGACTATAGGCGATACTACAAATTTTGTAAAT  
GGCACTCGCTAGAGAAAGCTCATCTTGTCTAACGGTGCACAAAACGATGATTGTTACTCGCCAGACTCTTGT  
CATCGTAACAAATGGGAACAAATGTGCCAACTACAAAAAGGTATGGCAGAAAAGTCAACTTAAAGCCAAATTAT  
AAAAGAAAACACAAATCCAACGAGAAATAATGAACTGATTTTATATTGAGATCAAACCTGAAGGAAAACACGGC  
GGCC

### P6: VA16G3

VA16G Vektor: M13R/SP6 -> 1641 bp Actin promotor(CL1Contig2), GFP, 1072 bp Actin Terminator(CL1Contig2) -> T7/M13F built out of LigR2

**BstXI** **SacI** **Sall** **XbaI** (Promoter: **PacI**) **SbfI** **PacI** (GFP: -) **AsiSI** (Terminator: **AscI**)

TCC AACGCGTTGG GAGCTC TCCCATATG GTCGAC ATCTAGACTTTTGGTAGCAACAAAATGTTCTAAAATTTAAG  
 AAACCTTTCTACCAGCCTGGACCAGCCTGAGTTTCTTATAAAAATTCATGTTAGGAGCAAAGAAGAAACATTCGCA  
 GTTTCGCGTAGGCCATCGAAGCTTTCGTGTTTTATATCATCTAGCCAAATAGCTTCATGCCGAAGCAAAGTTTTT  
 TTCATGACTGCACTCATTTTTTTTTATTAGAAACAGCTTATAAGAAACAGTAGGCTCAATTTTTCAAACCTTAGTG  
 AGCTATCCCACCTGAATTAAGACAGCTAAGAACTTTTCGTAATTTGTAGCTTTAATTTTCCCAAGGTCACCTTGAA  
 ATGTTTTCGACACTGTACAGTAATAGTAAATGTTTTGGCATTGTTTTGAGTGCGAATTAAGTTATAACATGTTTTG  
 AGACCTTACAAGGTTACAAAAGTAATTTGTAATTCGTAAGCCCTTCTAACAAAAATATATTCGCTCTACATAAGAA  
 ACTTTTTGGTAGCAAAATGGCCCTAAAATTTAAGAAACTGCCTACCAACCCCGGACCTAATAAGCCGATTCAAGCA  
 TTTCTTTTTGCAATCCTTTGCAATGGCAAACCACAAAAGTGTAGGATTTACTGGTTT TTAATTAAT TATTTTCGTTT  
 CGAAAAATTTATAATTTTCTGAAGCTCCAAGGGCCCCCTTCTTTGTTAGACGATTTAAAAACACGAAAGCTTCGAT  
 GGCCACTTACATTTTTTAAAAGARACGGCAAGTTTCTTAAWTTTTAGGACATTTTTGCTAACAGTTTTCTTATGA  
 GTTCCAATTCATGCGTGGGACTTTCCAATTTTAGATTTTTAATGGTCTGACGTCTAATTTGTAGAATTTATTTAT  
 TTTGTTAAACAGATTCCAAAGTACATAGTAGTAATATCTCAAAAATTAACAGTAAATGTTCAAYCGTGAGCGTA  
 GTTGCAAAAAGAAAAACCTAACCAAGAAAACAAACMATTATAAGTAGAGCCTGAAGCCCTGAATTGAYCGTTA  
 TCATCTGCAAACCATATCTATTTGAAGCAGATTCCGTACGCGATAAATTTGACAGCTTTTCTGTACGTCCAAAA  
 TATTTTGATAGCTTTTCTGTACTTCCCAAAGCATTGAACCTTCTCAGCAAATGGCCTGGACTTGCTCAAGTCTGAT  
 TCAAATGAACCAGAACAAGGAAATGAAACACAGAGCTAGCTTTGCGGTCCCAGGCTTCGAGGGCTGCGGGTAAAT  
 AGCCCTTGAACGACACCAAAATATTCATTTGAAAACACCTGCACGAATTTGTCTAAGCCTTTTCAAATCAATAGT  
 TCCGAATAACCAATCAGAGAGCAGTATTTTCAAACCTAGCCAATTASCCTGGGACAACCTTGTCTGTGGGGATT  
 ACTCGAATGTGAGTGAATTTATTGAGGCGGACCGTTATATCCTTGTAGGTATGCTAAACATGGTSCGTAAACAAA  
 CAATGCATTCGATTACCGGAAATTCCTTATTTGGTCATATCGCTGGAATCGCTCACATGGCCAGCCTTATACATA  
 TGAGCATGTGCAACAGTTGAACATTTCTACTTGAAGTGAACCTTCGAAACCGTAAAGACCCGCACAGCTTTTAGAAA  
 ACTTTCTTATTCAACCAAACCTCACAAATTCATATGGGTGATGAAGATGTAGCA CCTGCAGC ACCGTA TTAATT  
 AATGAAAAAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGT  
 TAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGAAAACTTACCCTTAAATTTAT  
 TTGCACTACTGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTGTTATGGTGTTCATGCTTTTCA  
 AGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGA  
 ATATTTTTTCAAAGATGACGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTGTTAATAGA  
 ATCGAGTTAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAACATTTCTTGGACACAAATTGGAATACAACCTATAACTC  
 ACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAAAGAAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTTAGACACAACATTG  
 AAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAG  
 ACAACCTTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTTTGA  
 GTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAA GCGATCGG GTAACAGTCCCAAGAA  
 TTTTCAATTCATCGTCCACAGGAAATGCTTCTAAATATCTCGAAGGAAATTAATCAAGAACTATACGTGTTGCAAC  
 CGTTTCAGTTTCAAACCTTTTCTTCTCACTCACGCTCTCTTGTATATATGGTTGATAATTTTGCAATCATT  
 CATTGTTAGTTTTGTACTGTGTATATATGCTCTCAAGTAGGGTGGATCATTGAGACGAGCTATATATAACAAGA  
 AGTAAATTCAGCACCTCAACTGGCTTATGTTGTCTTGTCTTCTGATCGTCTTTATTTATATTAATGCCAA  
 ATTATCGCTATTTGTTCTAAGGTTCCAGGCAATTTCTCAAAGTAATTTGAAATTTGAAATGTGACGTTATTTT  
 GAAGACAGTTTCTAAATTTCTATTCGACTATTTGTCCATCTCTACCTACTGTGTTTTGGTGTGTAATGTTTAAACC  
 GAGCTTTGAGCTAAGAATTTTCTGAAAGTGTATGTTTTCGTTCCTGTTTGAAGTAAAATGATAAACTTTATTTA  
 GTATGAAGAAAAATAACGAAAAAATAGAAGTGTTCATGCGCGTTTTTGTACTGAACAGACGACCAAAAGACTT  
 GAAATTTGTCAAGGTGGGAGGAATGGTTGTTGAAGTATCGCTTGTCCAAGAAGTGTCCAAGAAATATTTCTGAAT  
 ATTTGGAGGGAAGATGGTTCAACGAAAATGTTTGTGACAGAGTTTGCAAAAATTTGTGTCAAGATCTTACTGTAC  
 AACTCGAAAAAAGCTTGAAGCTCTTTTAGAAAATAGTTGACCAGCTCATTGTTGACTATAGGCGTACTACAAA  
 TTTTGTAAATGGCACTCGCTAGAGAAAGCTCATCTTGTCTAACGGTGCACAAAAACGATGATTGTTACTCGCCA  
 GACTCTTGTTCATCGTAACAAATGGGAACAAATGTGCCAACTACAAAAAGGTATGGCAGAAAAGTCAACTTAAA  
 GCCAAATTATAAAAAGAAAAACAAAATCCAACGAGAAATAATGAACTGATTTTATATTGAGATCAAACCTGAAGG  
 AAAACAC GCGCGCC

**P7: VHP II 4**

VHP Vektor: M13R/SP6 -> 1353 bp Histon 3.3 promotor (CL200Contig1), GFP, 1072 bp Actin Terminator(CL1Contig2); *Hydra* Actin Terminator, Dsred, *Hydra* Actin Promoter -> T7/M13F built out of LigR2

**SalI** (Promoter:) **SbfI** **PacI** (GFP: -) **AsiSI** (Terminator:) **AscI** **NotI**



CCCATATG**GTCGAC**GACTATCTATATGAAAAAGACTTGGAAACATTTCGACAGATCTGCTTGCTGTCATGTTTTTCA  
TATATACCATAGCAATATAGACGAACTAGGTAAGTAAAAACCCGCTATAAGAACCTACTATTTTGCAAGTCA  
GCCTGTGGGTTCTTAGACAATGAATACAATAATGGATTGGTTCTATAAAAACAGTTAAAAATTTGACAATTTCCAG  
CCTGTAGGTTCTTAATCCACTAGGTTCTTATATGCGGGTTTTACTGTAGGCTATGTATAAATACTTATTAATTT  
TTGGTGTAGAAACTCTTGNNTNNTNGTCCAGTGGTNGAACATTTTTAAATTTTCTAGGCCTTTCTTCTCACGTTT  
AGTTNCCATTACGCTTGTGTTNCATTGCAATAAAAAGATATGTCTGCAAACCTTTTGCTGTCAGTAAAGAGAAAT  
AAGCTTGGCGCCGTGCTTCTATTCCACAGCTTAGAATTTGAAGGGAAAACTTTTCCACTTGGCAACAAAATAAA  
CTTGCCCGCCATGATTTTTGGTTGCGGCTCTTTTGACTGAACCTCTTTTCCAGTAAACATCGAAATTTTATGATTG  
TATGACGTAATGACGTATGGCATGCCGCAATGGTGACGTAAACTGCGTAAAAACAAGTCTGGGCAAGGCCGTTGTT  
GTCTGTTGTGTTTGTCCATGGTTTGTCACAACTTACCCTTGGGTACCAGATCACAACCTCTGAGACGTTCCGAACCTT  
TCTCTAATGAAAAATATGAACTTGCATTCAATTGTAGGAAAAACCTAGACTAGCTACACTAGTCCCTCAATTTCCG  
CTGTTGTTGTTGTTGCTGATGGCCTCAAAAAGTAACTTGTACTTGGCAAAAAATATATAGTTTCCCGTCATTTG  
GTTTCGGCAGATGTAAAATCTTCTTTTTCAAAACACTTCAAAAGGAACTACGTGACCATAAAGTTCATTACTTA  
CATCGAAAATCCTGGGAGTTGAGGCAAGTTGTCTTCGAGACAATGAGATTGTTTGTCCAAATACTTAAANAAT  
AATCTTATTGTAAAGATTCACTCTCAAGACCTCAAGACATAAAGTTTGTACAGAAGAGAACCGTTTTCCATCAA  
TTTTTTCAATCGGAAATGAAATCTCTAACCAATCAAAATCATCTGTAGCTTGTCCAATCAAATCGCTTAATTT  
TAGTTATTAACCAATCAGATTTGCTTTGAGTTTAAACCAATCAAATCTAGTATAACTCGTTATCATCACAATGGC  
TTCGGGAATTTTTTTCATCGCAAATGATTCAGAACACGAAGTAAAGAAGAAGAAGTCAAGAAAAAACGTAAT  
TTGATAAGTTAAAAAC**ATG**CGCCGT**CCTGCAGG**ACCGGTA**TTAATTAA**TGAAAAATGAGTAAAGGAGAAGAAC  
TTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCACTGGAG  
AGGTTGAAGGTTGATCAACATACGGAACAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCAT  
GGCAACACTTGTCACTACTTTCTGTTATGGTGTTCATGCTTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATG  
ACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCGGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGAACTACA  
AGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTTAAAG  
AAGATGGAAACATTTCTTGACACAAAATTGGAATACAACATAAECTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAC  
AAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCAT  
TATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCC  
TTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATG  
GCATGGATGAACTATACAAA**CCGATCGC**GTAACAGCTCCCAAGAATTTTCATTCATCGTCCACAGGAAATGCTTC  
TAAATATCTCGAAGGAAATTAATCAAGAACTATACGTGTTCCGAACCGTTTCAGTTTCAAAACTTTTCTTCTCAC  
TCACGCCTCTCTTGTATATATGGTTGATAATTTTGCAAATCATTTCATTGTTAGTTTTGTACTGTGTATATAT  
GTCCTCAAGTAGGGTGGATCATTGAGACGAGCTATATATAACAAGAAGTAAATTCAGCACCTCAACTGGCTTA  
TGTTGTCTTGTCAATCTCTGATCGTCGTTTATTTATATTAATGCCAAATTATCGCTATTTGTTCTAAGGTTCCAGG  
CCAATCTTCAAAGTAATTGTAATTTGAAATGTGACGTTATTTTTGAAGACAGTTTCTAAATTTCTATTCGAC  
TATTTGTCCATCTCTACCTACTGTGTTTTGGTGTGTAATGTTTAAACCCGAGCTTTGAGCTAAGAATTTTCTGAAA  
GTGTTATGTTTTCGTTCCTGTTTGAAGTAAAATGATAAACTTTATTTAGTATGAAGAAAAATAACGAAAAAATA  
GAACTGTTTCAATGCGCGTTTTTGGACTGAACAGACGACCAAGACTTGAATTTGTCAAGGTGGGAGGAATGGT  
TGTTGAAGTGATCGCTTGTCCAAGAAGTGTCCAAGAAATATCTTGAATTTTGGAGGGAAGATGGTTCAACGAA  
AATGTTTGTGACAGAGTTTGCAAAATTTGTGTCAAGATCTTACTGTACAACCTCGAAAAAAGCTTGAAGCTCTT  
TTAGAAAATAGTTGACCAGCTCATTGTTGACTATAGCGGATACTACAAATTTTGTAAATGGCACTCGCTAGAGAA  
AGCTCATCTTGTCTAACGGTGCACAAAACGATGATTGTTACTCGCCAGACTCTTGTTTCATCGTAACAAATGGG  
AACAAATGTGCCAACTACCAAAAAGGTATGGCAGAAAAGTCAACTTAAAGCCAAATTATAAAAAGAAAAACACAAA  
TCCAACGAGAAATAATGAACTGATTTTATATTGAGATCAAACCTGAAGGAAAACAC**GGCGCC**GACTAGTTTAT  
ACGTCATTGACTTGAACTATTTAAAATAATAAAAAAACATGTTAGCCTAAACTTTGCTTATTCAATTTTTCTAATA  
AGTTTTTCTCTAAAATAACGCGCAAAACCTGATTTGATAAATTAAGCGACAATTTAATCAAGTAAATTAAGGAAC  
AAAAAGTTAATAGACGACTTTTCTAATAATAAAGTATAACAAAATCACGAGTACAGTACTTAAGACCATCCAAGT  
TAATTTTAAATGTTTACATTAATTTTGTAGTACCTCAGGAGCGCCTTAATTGCCTGAATTTATTTTTAAACTTGTTA  
TTTATTATAATTAAGGAAATTCAGTAATAAAAAGAAGTTTGTAGGACGCTTTTTATATTACAGCTTAACAAAA  
ATTACATGGGTTTTAAACGTTTATAAGATATATATAGAAAAATAAATGTGAAAAAACCAGAACAGATGTA  
ATAGTCCAGTATAAATAAATCGAATTGTGAATTTCTACGAATG**CTA**TAAAAATAAATGATGTCTACCTTCTGTTT  
TTTCATATTGTTCAACAATTTGTATAATCTTCATTATGTGATGTAATATCTAACTTAGCATCTACATAATAATATC  
CTGGTAATTTGAACTGGTTTTTTAGCCATATAAATTTGATTTAAATTTCAACTAAATAATGTCTCCGTCCTTTAAT  
TTAGAGCTTTATGTGTTTCTCCCTTTAAACCCCGTCTCTTGGATATAATCTTTCTGTACTAGCTTCCCATCCC  
TGTTTTTTTTTGCATAACTGGTCCGTCTGATGGAAAAATTAACCCCAATAAATTTAACTTTATAAATAAAACAAC  
ATCTTGAATGATGAATCTTGTGTAACCTGTAGCAACTCCACCATCTTCAAAATTCATAACTCTTTCCATTTAAA  
TCCTTCTGGAAAAGATAATTTTTTATAATCTGGAATATCAGCTGGATGTTTAAACGTAAACCTTTGATCCATATTG  
AAATTTGGGTGATAAATAATCCACGCAAAATGGTAATGGTCCCTCTTTTGAACCTTTAATTTAACTGTATTATG  
TCCTTCATATGGTCTACCTTCTCTTCTCCCTCAATTTCAAATTCATGTCCATTAACCTGACCTTCCATTCTAACT  
TTAAATCTCATAAATTTCTGTAATAACATTTTCTGATGAAGCCATTGGCCGGCCGAGGGCGGCAACTTCATCATCG

GCCATTTTGGATTAAGTGTGTTTTGTTTAAAAAGAGAAGAGCTGAGTATCAAGCAAAGCTGAAGCTTCTGAATAACGA  
ACGCTGAACTAATTGCGCTTTTTATGGTGAATCGCTTGAGCGCTTTTTGACCATATAAGAAAAAAAACGGCTAA  
GCAAAAAAGTTATTGTTGCGAAAAGGTCTTTATATGGACAAAAATTTGCACGCGTTATTTTATTAAGAAAAATA  
AAACGGATATGTAAGTTTTACCTATTATTTATAAATTTAATAAAAAATAATTATAAAATTAATTTTTTTTTTATA  
ATATTACTTTTATTATACTTAATATATATTTTTAAATGTGTTTAAAAATTTATAAATTTTAATATATATATTTAT  
AATTATTTTAAAAAGATTTTTTTAAACCCCGGTATTAATTTTTTTTACTTCAATTATTAATCTTTAAAAACGTTT  
CTGTTTTTTTTGACGGTGTTCACGTACAGTGAACCACTGGTAGGATTTTAACTTTAAATGAAATATGTTCTCATT  
CATCAATAGAAACCAACTTATGTTTGCTTTTTTAAACGCGTAAACAAAATAGGAGTGGTTTTAAGTACATCACAAA  
CCTTGAGATAACGTTTTTGAGAAGTAATTACTATATCAGTTGTTTAAAAGAAAATAGTGCAGGTGTTGAAGTTACA  
TTTGATATTTGCAAATTAATTTTTTTTTTATAGAATTTTCAAGATTTTACTTTATTTAAGAGATATATTGGTT  
TATTGATTTGAATAAGCAAAGTTTGGGTATTTATTGCTTGATTAAGTGCAGGACTAAGTTAGTACTCAA  
ATATTACTCTAGCGTTACAATGGTTTTAAAATTCGGTAAACTTATAGAACAGCAACTTTAACTTTATATTTTCACT  
TTTATTTTAAATAAAATTTATTGGTACTTCAATAAATTTTACAGTTGCAAACCGATCACTTTTACTCTACCGAGAC  
TTCTTTTTTTCTTTTTTCATTCAGAATCCTGCATCTCGGCTTAAAGCGGCCGC

**P8: VEGT3**

VEGT Vektor: M13R/SP6 -> EF1 1536bp Promoter (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_45), GFP, Actin Terminator (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21) -> T7/M13F built out of LigR2

Restriction sites:

BstXI SacI SalI XbaI (Promoter:PstI,BoxI,ApaLI) SbfI AgeI PacI(GFP: -) AsiSI (Terminator: BoxI, BstXI,2xSmaI) AscI

TCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGCTCGACATCTAGAGCCAATGTACATTTTTATCGTGGTTTTTCAAAAAT  
GGATAGTTTTTCTTGGTGAATCCCGTTTTATATTGGAAAAACAATATATACTACAAAAACTGCAGTGACAATCAC  
TTCCAGTACAAAGATATAATTATTCCAAAAACAGAAATGGGAAATTGTTACAAAGTTGTTTATTTTATGTTGTTG  
CTTCTCCTATTTGGCAGTTTTTTCATCAAAATCAGTTCAGCTATCAATAGCACGAGGAAGGGGGAATAATTTGAAA  
ATAAGCGAATGCCACAGATGAATGTCACCTGTGCGCCTTCCCTCATGGATCAACCAGCCTTCCAAAACCAAACAAAC  
TCAGAATAAAATTACACCATAAGAAAACGGGAGAATTTTCAAGCTTTAATTTGATATATTAATTTTAAAAAAT  
TTGTTGATTATGTGTTGCAAGACGAATGTCACCTGTGCTGCTATCAATAAAAACAGAACAGTATTTGGTATGATAG  
CAATAAATTCTGAGAGACCTTGCCTGATTCCCAATCTAAAGACTGCTTGCTTTAAATACTTGTACTTTAAACAAA  
ATAGTTTGGTACCGCTGGCTTCAAAAAATGATCAGACCAAAATTAACCTAATATAGGGTCTACTGGGGTAAAATG  
GGGCATGCAAAAATGTGAATGAAAGTTATAAGAACTTCATGTACATATTTTCTCCAACATCTGTTGAAACTCCC  
TCCTTGAAGTTTTGAATGTTGATTGAACAGTTCATGATCTACCATTTTTTCAAGCAATCAATACTAACAAAATTTAC  
TCCAGCCTCCCATTTTACCCTTGGCTAGAGTAGAAGTCCAAAAAGTATACCCTTGACGGCAGCGCATCACCGCAT  
ACCTTTACAATGGAAGAACCCTCGTAGCGAGCTGCCAAGCTCACCTTAACTTAAAATTAACAATAAAAAAAC  
GTCTTTGATCAAGCTCTCCATTTCAACGATATGGAGTCTTGGTCTTGATACTGCAAGGGGTATTGATTATTTTAT  
TAACTCGCGTGTAAAGTTTCAACATGATCAAAGAAGCCAAAGGCAAGTGGCTTTGAAAAACTTGTAGGTGCCTGC  
CAGATTCACGAGGGAATGGAGAATATCAGGATTCCTTTTTTCTAAAGATGTACTGAAGTTCACACAAAATGT  
CATTGACCAGGCATCTAAAGAGGGGTCAAACCAATCAAGAGTGCCTATCGTGTAATTATATGTTCCACTGCATCA  
ATACAAAATGACTGTAGATAAGGGCAACTTTTGGTATCTGCTTTGTTTACATCATTGGCTTGATTACTCAGCCC  
TTGAAATCTCTTCGCTTCAGTCACTAATCACTTTGAAATTGTGTGTCATCAAATGCAAGTTTTGATATTGTAA  
CAAAATCTGCTATTGACTAAGCACTGGCTTCCCCTTCGGATTTGTGGTAAGTTTCAAGATTTCTTAAGTCTTTT  
ATGCATTTTCAATTTAGCTTTAATTGCTAACTTGTTTTTTCAAGTATATCTGGTAATCAACTAAAACCTTCAACATGG  
TCTCGCAGCACCGGTAATAATTAATGAAAAAATGAGTAAAGGAGAAGAAGTTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTCT  
TGTTGAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACG  
GAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTG  
TTATGGTGTTCATGCTTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTTCAAGAGTGGCATGCCCGA  
AGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTTCAAGATGACGGGAACACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGA  
AGGTGATACCCTTGTAAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTTAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACA  
AATTGGAATACAACATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAACAAAAGAAATGGAATCAAAGTTAAC  
TTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCAATTATCAACAAAATACTCCAATTGGC  
GATGGCCCTGTCTTTTTACCAGACAACCAATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTGAAAGATCCCAACGAAAAGA  
GAGACCACATGGTCTTCTTGGATTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAAAGCGA  
TCGCCTAAGCGCTCGCCAACCTTAGAACTCTATGACTTGATTTTTATAATGTTTCAATTCAGATCCTAGTCCGCTAA  
TTACTTAGTGTCCGTTGTATTGTTTAAACAGCCTCGTAAAAATAAGAAAAGGAGGATATATTTTATACGCATCGAG

```
ATTTGTTTTTTGACTTCATTCCCTGATTCCCTAAAGTTAACGTCTATCTGTTTGATAAAGTCTTACTCAAGCAAAAT
AGTGCTATCGGAGGTTTTTGAATCTTAAAAACTTAAAAAACCATGAATAATTTATAAGCCGTCTGTCTAGTAAA
TGTCATTTTCTTGCAAATGTGTTTCATTACAAAAATAACATTTTCTTGCAACCATATCATGCAAAACGTTCTCTCA
AAGAAAAACTTAGAAAACCATAGCGTTTCAAATTTCTTTGAGATCTCTTGTAGAAAATGGGGATTTGAGAAGTT
CCTGCAACCATTTGTGGTTTTTCTTGCAATTTACGATACTAATAGATGCCGATTTCGACAGTTGGTAAATGGCGTCA
AAAAATTTTTTAAATCGCGAAAAGAGGCTTACAAATCGAGAACCAAAAAAGGCTAAACAGCTCTAAAGGCGAAGA
ACTACTTTGTAATCGTTTTCTGTGAGGTATTGCGGAGGCAAAAAGTAACCGACTACCAATTTTTAAGATTCCCGAAG
ATTGAAAAACTGCTGCGAAAAATTTCTTTTCAGCTCAAACTTGTGCATAGCTCAACAGGTGAAGTAAGAAAAAGTTC
TGTTTTTCTTTCTGCTAAAGTCTCTCTTTATTTCTTTCAATTTCTGTGCTTCTCTCGTTAGGAAGCATAATAGAATAG
CGGCTGGAACAATTCAGAGAATCTGCATCATGAGCTATGAGAAAACTTGGCTTGATCGCAAAATCAAGTCTTG
TGTTGGTGCCAGAAAAACCCGGGGGAGGGGGGGACAGGTACACGACTTGTGGATGGACGGGGGTCTGNCAC
CCGGTTTTTCAGANAGCCATCCACTTTTATGATGAATTTTGGTGGNAACTACCCATTTTTANCAATTTTTTNGCN
ATTTCAACCAACCCCCNTTTTTNTGGAAAANCTNCCAAAAATACCTTTTTTTAAAAAANTTTTTNGCCAAA
AACCAACCCNATTCCCCTNCCNTCAANATTTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCGGGCAGAAAACCAGAAAAGGTCC
TTCTCTAAAATCGTTTTGGGGTCTTGTCTGTTCTGTCAAACCTTTAGAAAAGTTCACAGAGCCATCCCCTGTTAAG
AAAGTAAGAAACACTTCGGCTTTAAAATCATGGAAAGGCAATGGACTACGCAATTAGTTTGAAGTTAAAAAA
ATCAAAAATTGGCAACTGTTGGCGTACCACAGGTAGTTGTTCTCGGAGCACTGTTCTTTATCAAAGATTG
```

### P9: VEKT7

VEKT Vektor: M13R/SP6 -> EF1 Promoter 1536bp (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_45), Kaede, Actin terminator 1413bp (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21)-> T7/M13F built out of LigR2

Restriction sites:

**BstXI** **SacI** **SalI** **XbaI** (Promoter:PstI,BoxI,ApaLI) **SbfI** (Kaede: 2xEcoRV) **AsiSI** (Terminator: BoxI, BstXI,2xSmaI) **AscI**

```
TCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACATCTAGAGCCAATGTACATTTTTATCGTGGTTTTTCAAAAAT
GGATAGTTTTTCTTGTTGAATCCCGTTTATATTGGAAAAACAATATATACTACAAAAAAGTGCAGTGACAATCAC
TTCCAGTACAAAGATATAATTATTCCAAAAACAGAAATGGGAAATTGTTACAAAGTTGTTTATTTTATGTTGTTGTT
CTTCTCCTATTTGGCAGTTTTTTCATCAAAATCAGTTCAGCTATCAATAGCACGAGGAAGGGGGAATAATTTGAAA
ATAAGCGAATGCCACAGATGAATGTCACCTGTGCGCCTTCTCATGGATCAACCAGCCTTCCAAAACCAAAACAAAC
TCAGAATAAAATTACACCATAAGAAAACGGGAGAATTTACAGCTTTAATTTGATATATTAATTTTAAAAAAT
TTGTTGATTATGTGTTGCAAGACGAATGTCACCTGTGCTGCTATCAATAAAAACAGAACAGTATTTGGTATGATAG
CAATAAATTTCTGAGAGACCCTTGCCTGATTCCCAATCTAAAGACTGCTTGCTTTAAATACTTGTACTTTAACAAA
ATAGTTTGGTACCGCTGGCTTACAAAAATGATCAGACCAAAATACCTAATATAGGGTCTACTGGGGTAAAATG
GGGCATGCAAAAATGTGAATGAAAGTTATAAGAACTTCATGTACATATTTTCTCCAACATCTGTTGAAACTCCC
TCCTTGAAGTTTTGAATGTTGATTGAACAGTTCATGATCTACCATTTTTTTCAGCAAATCAATACTAACAAAATTAC
TCCAGCCTCCCATNTTACCCTTGGCTAGAGTAGAAGTCCAAAAAGTATACCCTTGACGGCAGCGCATCACCGCAT
ACCTTTACAATGGAAGAACCCCTCGTAGCGAGCTGCCAAGCTCACCTTAAACTTAAAATTAACAATAAAAAAAC
GTCTTTGATCAAGCTCTCCATTTCAACGATATGGAGTCTTGGTCTTGATACTGCAAGGGGTATTGATTATTTTAT
TAACTCGCGTGTAAGTTTCAACATGATCAAAGAAGCCAAAGGCAAGTGGCTTTGAAAAACTTGTAGGTGCCTGC
CAGATTCACGAGGGAATGGAGAATATCAGGATTCCTTTTTTCTAAAGATGTACACTGAAGTTCACACAAAATGT
CATTGACCAGGCATCTAAAGAGGGGTCAAACCAATCAAGAGTGCCTATCGTGTAATTATATGTTCCACTGCATCA
ATACAAAAGTACTGTAGATAAGGGCAACTTTTGTATCTGCTTTGTTTACATCATTGGCTTGATTACTCAGCCC
TTGAAATCTCTTCGTCTTCAGTCACTAATCACTTTGAAATTTGTGTGTAATCAAATGCAAGTTTTGATATTGTAA
CAAATCTGCTATTGACTAAGCACTGGCTTCCCCTTCGGATTTGTGGTAAGTTTTCAGAAATTTCTTAAGTCTTTT
ATGCATTTCAATTTAGCTTTAATTGCTAACTGTTTTTTCAGGTATATCTGGTAATCAAATAAACTTCAACATGGG
TCTGCAGCAatgagctctgattaaccagaaatgaagatcaagctgcttatggaaggcaatgtaaacgggcaccagtttgattaggaggatgga
aaaggccatcctttgagggaaacagagatgagccttgtagtcaagaaggcgacctctccctttgctacgatatcttgacaacagcattccattag
gtaaacagggttttgtaataaccagaccataaccagactctcaagcagctgttccaaagggtttctgggagcgaagcctgatgttcaggacgg
ggcgcttgcacgctacaaatgacataacactgaaaggagacactttttaacaaagtgcattgtatggcgtaaaccttcccccaaatggctctgtatgc
agaagaagactctgaaatgggaggatccactgagaaaatgtattgctgatggagtgtgacggcgatattaccatggctctgctcttaaggagat
gtccattaccgatgtgactcagaactacttacaatctaggcaggagggtgcaagttgccaggatcactttgctgatcactgcatcagcatattgaggc
atgacaagactacaacgaggttaagctgatgagcatgctgttcccattctggattgccggacaacgtcaagGCGATCGCCTAAGCGCTCGCC
AACTTAGAACTCTATGACTTGATTTTTATAATGTTTCAATTCAGATCTAGTCCGCTAATTACTTAGTGTCCGTT
```

GTATTGTTTAAACAGCCTCGTGAAAATAAGAAAAGGAGGATATATTTTCATACGCATCGAGATTTGTTTTTTGACTT  
CATTCCCTGATTCCCTAAAGTTAACGTCTATCTGTTTGATAAAGTCTTACTCAAGCAAAATAGTCTATCGGAGGTT  
TTTGAATCTTAAAAACTTAAAAAACCATTTGAATAATTTATAAGCCGTCTGTCTAGTAAATGTCATTTTCTTGCAA  
ATGTGTTTCATTACAAAAATAACATTTTCTTGCAACCATATCATGCAAAACGTTCTCTCAAAGAAAAACTTAGAAA  
ACCATAGCGTTTGAAATTCTTTTGAGATCTCTTGTAGAAAAATGGGGATTTGAGAAGTTCCTGCAACCATTTGTGG  
TTTTTCTTGCAATTTACGATACTAATAGATGCCGATTCGACAGTTGGTAAATGGCGTCAAAAAATTTTTTAAATCG  
CGAAAGAGGCTTACAAATCGAGAACCAAAAAAGGCTAAACAGCTCTAAAGGCGAAGAACTACTTTGTAATCGTTT  
CGTGAGGTATTGCGGAGGCAAAAAAGTAACCGACTACCAATTTTTAAGATTCCCGAAGATTGAAAAACTGCTGCGA  
AAATTCTCTTCAGCTCAAACCTTGTGCATAGCTCAACAGGTGAAGTAAGAAAAAGTTCTGTTTTTCTTTCTGCTAA  
AGTCTCTCTTTATTCTTTCAATTTCTGTGCTTCTCTCGTTAGGAAGCATAATAGAATAGCGGCTGGAACAATTCCA  
GAGAATCTGCATCATGAGCTATGAGAAAAACTTGGCTTGATCGCAAAATCAAGGTCTTGTGTTGGTGCCAGAAAA  
CCCGGGGGGAGGGGGGGGACAGGTACACGACTTGTGGATGGACGGGGGGTCTGNCACCCGGTTTTTCAGANAGCC  
ATCCACTTTTATGATGAATTTTGGTGGGNAACTACCCATTTTTANCAATTTTTTNGCNATTTCAACCAAACCCCC  
CCNTTTTTNTGGAANCTNCCAAAAAATTACCTTTTTTAAAAAANTTTTTNGCCAAAAACCAACCCNNATTC  
CCTNCCNTCAANATTTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCCGGCAGAAAACCAGAAAAGTCCCTTCTCTAAAATCGTTT  
TGGGGTCTTGTCTGTCTGTCAAACCTTAGAAAAGTTCACAGAGCCATCCCCTGTTAAGAAAAGTAAGAAACT  
TCGGCTTTAAATCATGGAAAGGCAAATGGACTACGCAATTAGTTTGGAAAGTAAAAAAATCAAAAATTTGGCAA  
CTGTTGGCGTACCACAGGTAGTTGTTCTCGGAGCACTGTTCTTTATCAAAGATTG **GGGGGG**

**P10: VEG4**

VEG Vektor: M13R/SP6 -> 1566 bp EF1 promotor (aurelia\_bs\_polyrun090409\_45), GFP, 1072 bp Actin Terminator (CL1Contig2) -> T7/M13F built out of LigR2

Restriction sites:

**BstXI** **SacI** **SalI** **XbaI** (Promoter:PstI,BoxI,ApaLI) **SbfI** AgeI **PacI**(GFP: -) **AsiSI** (Terminator: BglII,HindIII,ApaLI) **AscI**

TCC **AACGCGTTGG** **GAGCTC** TCCCATATG **GTCGAC** ATCTAGAGCCAATGTACATTTTTATCGTGGTTTTTCAAAAAT  
GGATAGTTTTTCTTGGTGAATCCGTTTTATATTGGAAAAACAATATACTACAAAAACTGCAGTGACAATCAC  
TTCCAGTACAAAGATATAATTATTCCAAAAACAGAAATGGGAAATTGTTACAAAGTTGTTTATTTTCATGGTGTGT  
CTTCTCCTATTTGGCACTTTTTTCATCAAATCAGTTCAGCTATCAATAGCACGAGGAAGGGGGAATAATTTGAAA  
ATAAGCGAATGCCACAGATGAATGTCACCTGTGCGCCTTCTCATGGATCAACCAGCCTTCCAAAACCAAACAAAC  
TCAGAATAAAATTACACCATAAGAAAACGGGAGAATTTACAGCTTTAATTTGATATATTAATTTTAAAAAAT  
TTGTTGATTATGTGTTGCAAGACGAATGTCACCTGTGCTGCTATCAATAAAAACAGAACAGTATTTGGTATGATAG  
CAATAAATTTCTGAGAGACCCTTGCTGATTCCCAATCTAAAGACTGCTTGCTTTAAATACTTGTACTTTAACAAA  
ATAGTTTGGTACCGCTGGCTTCAAAAAATGATCAGACCAAAATTAACCTAATATAGGGTCTACTGGGGTAAAATG  
GGGCATGCAAAAATGTGAATGAAAGTTATAAGAACTTCATGTACATATTTTCTCCAACATCTGTTGAAACTCCC  
TCCTTGAAGTTTTGAATGTTGATTGAACAGTTCATGATCTACCATTTTTTTCAGCAAATCAATACTAACAAAATTAC  
TCCAGCCTCCCATTTTACCCTTGGCTAGAGTAGAAGTCCAAAAAGTATACCCTTGACGGCAGCGCATCACCGCAT  
ACCTTTACAATGGAAGAACCCCTCGTAGCGAGCTGCCAAGCTCACCTTAAACTTAAAATTAACAATAAAAAAAC  
GTCTTTGATCAAGCTCTCCATTTCAACGATATGGAGTCTTGGTCTTGATACTGCAAGGGGTATTGATTATTTAT  
TAACTCGCGTGAAGTTTTCAACATGATCAAAGAAGCCAAAGGCAAGTGGCTTTGAAAAACTTGTAGGTGCCTGC  
CAGATTCACGAGGGAATGGAGAATATCAGGATTCCTTTTTTCTAAAGATGTACACTGAAGTTCACACAAAATGT  
CATTGACCAGGCATCTAAAGAGGGGTCAAACCAATCAAGAGTGCCTATCGTGTAATTATATGTTCCACTGCATCA  
ATACAAAACCTGACTGTAGATAAGGGCAACTTTTGCTATCTGCTTTGTTTACATCATTGGCTTGATTACTCAGCCC  
TTGAAATCTCTTCGTCTTCAGTCACTAATCACTTTGAAATTGTGTGTCAATCAAATGCAAGTTTTGATATTGTAA  
CAAATCTGCTATTGTAATAAGCACTGGCTTCCCCTTCGGATTTGTGGTAAGTTTTCAGAATTTCTTAAGTCTTTT  
ATGCATTTCAATTTAGCTTTAATTGCTAACTTGTTTTTTTCAGGTATATCTGGTAATCAACTAAAACTTCAACATGG  
T **CCTGCAGC** ACCGGTA **TTAATTAAT** **TGAAAAATGAGTAAAGGAGAAGA** ACTTTTTACTGGAGTTGTCCCAATTCT  
TGTTGAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACG  
GAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTG  
TTATGGTGTTCATGCTTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGA  
AGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAAGATGACGGGAACACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGA  
AGGTGATACCCTTGTAAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGGACACA  
AATTGGAATACAATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAAC  
TTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCAATTATCAACAAAATACTCCAATTGGC

GATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGA  
GAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAA**GCGA**  
**TCGC****GTA**ACAGCTCCAAGAATTTTCATTCATCGTCCACAGGAAATGCTTCTAAATATCTCGAAGGAAATTAAT  
CAAGAACTATACGTGTTTCAACCGTTTCAGTTTCAAACCTTTTCTTCTCACTCACGCCTCTCCTTGTATATATGG  
TTGATAATTTTGCAAATCATTTCATTGTTAGTTTTGACTGTGTATATATGTCTCAAGTAGGGTGGATCATTTG  
AGACGAGCTATATATAACAAGAAGTAAATTCAGCACCTCAACTGGCTTATGTTGTCTTGTCACTCTGATCGT  
CGTTTATTTATATTAATGCCAAATTATCGCTATTTGTTCTAAGGTTTCAGGCCAATTCTTCAAAGTAAATGTAAT  
TTCGAAATGTGACGTTATTTTTGAAGACAGTTTCTAAATTTCTATTTCGACTATTTGTCCATCTCTACCTACTGTG  
TTTTGGTGTGTAATGTTTAAACCCGAGCTTTGAGCTAAGAATTTTCTGAAAAGTGTATGTTTTCTGTTCTCTGTTTGA  
AGTAAAATGATAAACTTTATTTAGTATGAAGAAAAATAACGAAAAAATAGAACTGTTTCAATGCGCGTTTTTGA  
CACTGAACAGACGACCAAAGACTTGAAATTTGTCAAGGTGGGAGGAATGGTTGTTGAAGTGATCGCTTGTCCAAGA  
AGTGTCCAAGAAATATTCTTGAATATTTGGAGGGAAGATGGTTCAACGAAAATGTTTGTGACAGAGTTTGCAA  
AAATTTGTGTCAAGATCTTACTGTCAACTCGAAAAAAGCTTGAAGCTCTTTTAGAAAATAGTTGACCAGCTCAT  
TGTTGACTATAGGCGATACTACAAATTTTGTAAATGGCACTCGCTAGAGAAAAGCTCATCTTGCTTAACGGTGCA  
CAAAAACGATGATTGTTACTCGCCAGACTCTTGTTCATCGTAACAAATGGGAACAAATGTGCCAACTACCAAAAA  
GGTATGGCAGAAAAGTCAACTTAAAGCCAAATATAAAAAGAAAACACAAATCCAACGAGAAATAATGAACTGAT  
TTTATATTGAGATCAAACCTGAAGGAAAAC**GGCGGGC**

**P11: VEK12**

VEK Vektor: M13R/SP6 -> 1530 bp EF1 promotor (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_45), Kaede, 1072 bp Actin Terminator (CL1Contig2) -> T7/M13F built out of LigR2

Restriction sites:

**Bst**XI **Sac**I **Sal**I **Xba**I (Promoter:PstI,BoxI,ApaLI) **Sbf**I (Kaede: 2xEcoRV) **Asi**SI (Terminator: BglII,HindIII,ApaLI) **Asc**I

TCC**AACGCGTT**GG**GAGCTC**TCCCATATG**GTGAC**ATCTAGAGCCAATGTACATTTTTATCGTGGTTTTTCAA  
GGATAGTTTTTCTTGGTGAATCCCCTTATATTGGAAAAACAATATATACTACAAAAACTGCAGTGACAATCAC  
TTCCAGTACAAAGATATAATTATTCCAAAAACAGAAATGGGAAATTTGTTACAAAGTTGTTTATTTTCATGGTGTGT  
CTTCTCCTATTTGGCACTTTTTCATCAAATCAGTTCAGCTATCAATAGCACGAGGAAGGGGGAATAATTTGAAA  
ATAAGCGAATGCCACAGATGAATGTCACCTGTGCGCCTTCTCATGGATCAACCAGCCTTCCAAAACCAAACAAAC  
TCAGAATAAAATTACACCATAAGAAAACGGGAGAATTTTCAGCTTTAATTTGATATATTAATTTTTGAAAAAAT  
TTGTTGATTATGTGTTGCAAGACGAATGTCACCTGTGCTGCTATCAATAAAAACAGAACAGTATTTGGTATGATAG  
CAATAAATTTCTGAGAGACCCTTGCCTGATTCCCAATCTAAAGACTGCTTGCTTTAAATACTTGTACTTTAAACAAA  
ATAGTTTGGTACCGCTGGCTTACAAAAATGATCAGACCAAATTAACCTAATATAGGGTCTACTGGGGTAAAATG  
GGGCATGCAAAAATGTGAATGAAAGTTATAAGAACTTCATGTACATATTTTCTCCAACATCTGTTGAAACTCCC  
TCCTTGAAGTTTTGAATGTTGATTGAACAGTTCATGATCTACCATTTTTTCAGCAAATCAATACTAACAAAATTAC  
TCCAGCCTCCCCATNTTACCCTTGGCTAGAGTAGAAGTCCAAAAGTATACCCTTGACGGCAGCGCATCACCGCAT  
ACCTTTACAATGGAAGAACCCCTCGTAGCGAGCTGCCAAGCTCACCTTAACTTAAAATTAACAATAAAAAAAC  
GTCTTTGATCAAGCTCTCCATTTCAACGATATGGAGTCTTGGTCTTGATACTGCAAGGGGTATTGATTATTTTAT  
TAACTCGCGTGTAAAGTTTCAACATGATCAAAGAAGCCAAAGGCAAGTGGCTTTGAAAAACTTGTAGGTGCCTGC  
CAGATTCACGAGGGAATGGAGAATATCAGGATTCCTTTTTCTTAAAGATGTACACTGAAGTTCACACAAAATGT  
CATTGACCAGGCATCTAAAGAGGGGTCAAACCAATCAAGAGTGCCTATCGTGTAATTATATGTTCCACTGCATCA  
ATACAAAACACTGACTGTAGATAAGGGCAACTTTTGCTATCTGCTTTGTTTACATCATTGGCTTGATTACTCAGCCC  
TTGAAATCTCTTCGTCTTCAGTCACTAATCACTTTGAAATTGTGTGTCAATCAAATGCAAGTTTTGATATTGTAA  
CAAAATCTGCTATTGACTAAGCACTGGCTTCCCCTTCGGATTTGTGGTAAGTTTTCAGAAATTTCTTAAGTCTTTT  
ATGCATTTCAATTTAGCTTTAATTGCTAACTTGTTTTTTTCAGGTATATCTGGTAATCAACTAAAACCTTCAAC**ATGGG**  
**TCTGCAAG**Aatgagctctgattaaccagaaatgaagatcaagctgcttatggaaggcaatgtaaacgggaccagtttgattgaggagatgga  
aaaggccatcctttgagggaaacagagatggacctgtagtaaaagaaggcgacctctccctttgacctacgatacttgacaacagcattccattag  
gtaaacagggtttttgctaaataccagaccatataccagactacttcaagcagctgcttccaaagggtttcttgggagcgaagcctgatgttcaggacgg  
ggcgctttgcatgctacaaatgacataacactgaaaggagacacttttttaacaaagtgcattgatggcgtaaaccttcccccaaatggctctgtatgc  
agaagaagactctgaaatgggaggcatccactgagaaaatgtattgctgatggagtgtgacggcgatattaccatggctctgctcttaaggagat  
gtccattaccgatgtgacttcagaactacttacaatctaggcaggagggtgcaagttgccaggatatcatttgcgatcactgcatcagcatattgaggc  
atgacaagactacaacagggttaagctgtatgagcatgctgttcccattctggattgcccgaacagctcaag**GCGATCGC****GTA**ACAGCTCC  
CAAGAATTTTCATTCATCGTCCACAGGAAATGCTTCTAAATATCTCGAAGGAAATTAATCAAGAACTATACGTGT  
TCGAACCGTTTTCAGTTTCAAACCTTTTCTTCTCACTCACGCCTCTCCTTGTATATATGGTTGATAATTTTGC

TCATTTTCATTGTTAGTTTTGTACTGTGTATATATGTCCTCAAGTAGGGTGGATCATTGAGACGAGCTATATATA  
ACAAGAAGTAAATTC AAGCACCTCAACTGGCTTATGTTGTCTTGTTCATTCTCTGATCGTCGTTTATTTATATTAA  
TGCCAAATTATCGCTATTTGTTCTAAGGTT CAGGCCAATTCTTCAAAGTAATTGTAAATTT CGAAATGTGACGTT  
ATTTTTGAAGACAGTTTCTAAATTTCTATTGACTATTTGTCCATCTCTACCTACTGTGTTTTGGTGTGTAATGT  
TTAACCCGAGCTTTGAGCTAAGAATTTTCTGAAAGTGTTATGTTTTCGTTCTCTGTTTGAAGTAAAATGATAAAT  
TTATTTAGTATGAAGAAAAATAACGAAAAATAGAAGTGTTC AATGCGCGTTTTT GACTGAACAGACGACCA  
AAGACTTGAAATGTCAAGGTGGGAGGAATGGTTGTTGAAGTGATCGCTTGTCCAAGAAGTGTCCAAGAAATAT  
TCTTGAATATTTGGAGGGAAGATGGTTCAACGAAAAATGTTGTTGACAGAGTTTGCAAAAATTTGTGTCAAGATCT  
TACTGTACAACCTCGAAAAAAGCTTGAAGCTCTTTTAGAAAAATGTTGACCAGCTCATTGTTGACTATAGGCGAT  
ACTACAAATTTTGTAAATGGCACTCGCTAGAGAAAAGCTCATCTTGTCTAACGGTGACAAAAACGATGATTGTT  
ACTCGCCAGACTCTTGTTCATCGTAACAAATGGGAACAAATGTGCCAACTACCAAAAAGGTATGGCAGAAAAGTC  
AACTTAAAGCCAAATTTATAAAAAGAAAACACAAATCCAACGAGAAATAATGAACTGATTTTATATTGAGATCAAA  
CCTGAAGGAAAACAC **GGCGCGCC**

**P12: VAGT2**

VAGT Vektor: M13R/SP6 -> 1315 bp Actin promotor (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21), GFP, 1411 bp  
Actin Terminator (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21) -> T7/M13F built out of LigR2

Restriction sites:

**BstXI** **SacI** **SalI** (Promoter: 3x **XbaI**, 2x **SacI**, EcoRI) **SbfI** AgeI **PacI** (GFP: -) **AsiSI** (Terminator: BoxI,  
BstXI, 2x SmaI) **AscI**

TCC **AACGCGTT** GG **GAGCTC** TCCCATATG **GTCGAC** CAAAATGGTACC GTTGGCTAGACCAATTTTTGTGAAAATGA  
TACCCTTGGCTAGACTAATTTCTAGACCAAAAAGTGCCATAATTTGCCGTTTTCTAGGCACAAATCACCAAAATTT  
CGCCTTCTCTAGACCAAAAATCGCCAAAATTTGGGGTTTTCTAGACACAAATTAAGAAAATTTGCCCTTCTCTGGAC  
GAAAATTTGCCAAAAACTATACCCTTGCCTAGACTGGCTAGACTAAAATTTGCCAAAAAGCATAACCTTGGCTAGA  
CTAGAAGTCCGAAAAAGTATACCCTTGGAGGGCGGCACATCCCCAGGTACCTTTACTATGGAAGAACCCCCCCCCC  
CGTGG **GAGCTC** TAACCCGAAATTTGTTTTCGAACATCTTTAAAATGTAATAAAAAGTTCTTAGAATGCTCTAAA  
AGTTTGTCTCGAATTTGAGCAGAAAAGTTGAGCTAAAATGTGGGACCACAGATGAAATTTCCCAAATTCCTCT  
GTAAGATCCAATTAGATTTTACCAACATTTTGCCTGACGTAATGCAGCTCGAAGGCCTTTCTATCTAGGAAATA  
CAATATTCCTTAAACTTCTTTCAATTCGTAAACTATGTACATTCGAAGTTTTACATAGTATAAACTTGCCCA  
ACCTGCTTCATGGGTGCAAAGTATTTGAACTTTTGAAGTCTTCAATTTCAAAGAGCACATAACAAACACACCG  
CAAACGCCACTAAAAATTTGAGAATATTTATGGAATCTTGATGTCTGCCAAAAACAGTTATCAAACCGTTTTGAA  
AAGATCCACAGAGCAAAACCGCCGTCTTCATGTCAATATTTTGGACTATTTTGAAGTAGGTCATTACATTTCTA  
AAATATTTCTGAGAGAAATCACTACAAATACAGTACTGTAATGGATGCATTTGTTTATAATCGTAGTTTCGT  
GACGCAATGCCTCAAATTTGGCATTAAATGAAGGCAGTTAATCATTCCACTTTGTTATGTATTTCCAAAATACCT  
GCACAACATAAAAAGGAATTACGCCCGCAAATTTATCAAATCGTTGAAAGGAAACCTTATCAGGAAGTTTCAATAG  
CAACCTTTGTATTTGGTAGTTGTGCGAGTTACAGTTTTCGTCAAAGTGGGTATCCCATTGTTGCTAGCTTTAAAG  
ATAACCAATATGGGCATTGTGAATTTCTAAAGGTGTGTCCGCGTCTTATAACTCGCGCTCGCTCCAAGATCATT  
CACTTT **GAGCTC** AGCTGAAGTAGAAGAAGTCAGAACCTTCGTTGTCTTAGGCCTAAACAAAAACACATCAAAT  
GGGT **CTGCAGC** ACCGGTA **TTAATTA** TGA AAAAATGAGTAAAGGAGAAGAAGTTTCTACTGGAGTTGTCCAA  
TTCTTGTGAATTAGATGGTGTATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACAT  
ACGGA AAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTT  
CTGTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCC  
CGAAGGTTATGTACAGGAAAGAAGTATATTTTCAAAGATGACGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTT  
TGAAGGTGATACCCTTGTAAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGAC  
ACAAATTTGGAATACAACCTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGTT  
AACTTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATT  
GGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCTTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAA  
AGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAA  
**CGATCGC** TAAAGCGCTCGCCAACCTAGAAGTCTATGACTTGATTTTTATAATGTTTCAATTCAGATCCTAGTCCGC  
TAATTAATAGTGTCCGTTGATTTGTTTAAACAGCCTCGTGA AAAATAAGAAAAGGAGGATATATTTCATACGCATC  
GAGATTTGTTTTTGAATTCATTCTGATTCCTAAAGTTAACGTCTATCTGTTTATAAGTCTTACTCAAGCAA  
AATAGTGTATCGGAGGTTTTTGAATCTTAAAAACTTAAAAAACCATTTGAATAATTTATAAGCCGTCTGTCTAGT  
AAATGTCATTTTCTTGCAATGTGTTTATTACAAAATAACATTTTCTTGCAACCATATCATGCAAAAACGTTCTC  
TCAAAGAAAACCTTAGAAAACCATAGCGTTTGAATTTCTTTGAGATCTCTTGTAGAAAATGGGGATTTGAGAA

GTTCTGCAACCATTTGTGGTTTTCTTGCATTTACGATACTAATAGATGCCGATTCGACAGTTGGTAAATGGCG  
TCAAAAAATTTTTTAAATCGCGAAAGAGGCTTACAAATCGGAAACCAAAAAAGGCTAAACAGCTCTAAAGGCGA  
AGAATACTTTGTAATCGTTTCGTGAGGTATTGCGGAGGCAAAAAAGTAACCGACTACCAATTTTTAAGATTCCTCG  
AAGATTGAAAACTGCTGCGAAAATCTCTTCAGCTCAAACCTTGTGCATAGCTCAACAGGTGAAGTAAGAAAAAG  
TTCTGTTTTCTTTCTGCTAAAGTCTCTTTATTCTTTCAATTTCTGCTTCTCTGTTAGGAAGCATAATAGAA  
TAGCGGCTGGAACAATTCCAGAGAATCTGCATCATGAGCTATGAGAAAACTTGGCTTGATCGCAAATCAAGGTC  
TTGTGTTGGTGCCAGAAAAACCCGGGGGGGAGGGGGGGGACAGGTACACGACTTGTGGATGGACGGGGGGTCTGN  
CACCCGTTTTTCAGANAGCCATCCACTTTTATGATGAATTTTTGGTGGGNAACTACCCATTTTTANCAATTTTTTN  
GCNATTTCAACCAAACCCCCCNTTTTNTGGAAAACTNCCCAAAAAATTACCTTTTTTTAAAAAANTTTTTNGCCA  
AAAACCAACCCNATTCCTNCCNTCAANATTTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCGGGCGAGAAAACAGAAAAGGTC  
CTTCTCTAAAATCGTTTTGGGGTCTTGTCTGTCTGTCAAACCTTTAGAAAAGTTCACAGAGCCATCCCCTGTAA  
GAAAGTAAGAAACACTTCGGCTTTAAAAATCATGGAAAGGCAAATGGACTACGCAATTAGTTTGAAGTTAAAAA  
AATCAAAAATTGGCAACTGTTGGCGTACCACAGGTAGTTGTTCTCGGAGCACTGTTCTTTATCAAAGATTG**GGCG**  
**CGCC**

**P13: VAKT1**

VAGT Vektor: M13R/SP6 ->1315 bp Actin Promotor (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21), Kaede, 1411 bp  
Actin Terminator (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21) -> T7/M13F built out of LigR2

Restriction sites:

**BstXI** **SacI** **Sall** (Promoter:3x**XbaI**,2x**SacI**,EcoRI) **SbfI** (Kaede: 2xEcoRV) **AsiSI** (Terminator: BoxI,  
BstXI,2xSmaI) **AscI**

TCC**AACGCGTT**GG**GAGCTC**TCCCATATG**GTCGAC**CAAAATGGTACCCTGGCTAGACCAATTTTTGTGAAAATGA  
TACCCTTGGCTAGACTAATTTCTAGACCAAAAAGTGCCATAATTTGCCGTTTTCTAGGCACAAATCACCAAAATTT  
CGCCTTCTAGACCAAAAATCGCCAAAATTTGGGGTTTTCTAGACACAAATTAAGAAAAATTTGCCCTTCTCTGGAC  
GAAAATTTGCCAAAAACTATACCCTTGCCTAGACTGGCTAGACTAAAATTTGCCAAAAAGCATACCTTGGCTAGA  
CTAGAAGTCCGAAAAAGTATACCCTTGGAGGGCGGCACATCCCCAGGTACCTTTACTATGGAAGAACCCCCCCCCC  
CGTGG**GAGCTC**TAACCCGAAATTTGTTTTGCAACATCTTTAAAATGTAATAAAAAGTTCTTAGAATGCTCTAAA  
AGTTTGTCTCGAATTTGAGCAGAAAAGTTGAGCTAAAAATGTGGGACCACAGATGAAATTTCCCAAATTCCTCT  
GTAAGATCCAATTAGATTTTACCAACATTTTGGTGGACGTAATGCAGCTCGAAGGCCTTTCTATCCTAGGAAATA  
CAATATTCCTTAAACTTCTTTCAATTTGTAAGTATGTACATTCGAAGTTTTACATAGTATAAACTTGCCCCA  
ACCTGCTTCATGGGTGCAAAGTATTTGAACTTTTGAAGTCTTCAATTTCAAAGAGCACATAACAAACACACCG  
CAAACGCCACTAAAAATTTGAGAATATTTATGGAATCTTGATGTCTGCCAAAAACAGTTATCAAACCGTTTGAA  
AAGATCCACAGAGCAAAACCGCGTCTTCATGTCAATATTTGGACTATTTTGAAGTAGGTCATTACATTTCTA  
AAATATTTCTGAGAGAAATCACTACAAATACAGTACTGTAATGGATGCATTTGTTTATAATCGTAGTTTCGT  
GACGCAATGCCTCAAATTTGGCATTAAATGAAGGCAGTTAATCATTCCACTTTGTTATGATTTCCAAAATACCT  
GCACAACATAAAAAGGAATTACGCCGCAATTTATCAAATCGTTGAAAGGAAACCTTATCAGGAAGTTTCAATAG  
CAACCTTTGTATTTGGTAGTTGTGAGTTACAGTTTCGTCAAAGTGGGTATCCCATTTGTTGCTAGCTTTAAAG  
ATAACCAATATGGGCATTGTGAATTTCAAAGGTGTGTCCGCGTCTTATAACTCGCGCTCGCTCCAAGATCATT  
CACTTT**GAGCTC**AGCTGAAGTAGAAGAAGTCAGAACCTTCGTTGTCTTAGGCCTAAACAAAAACACATCAAAT  
GGGT**CCTGCAGC**Aatgagtctgattaaccagaaatgaagatcaagctgcttatggaaggcaatgtaaaccgggaccagttgtattgaggaga  
tgaaaaggccatcttttgaggaaacagagtatggacctgtagtcaagaaggcgacacctctctctttgctacgatatctgacaacagcattcca  
ttatgtaacagggttttgtaaataccagaccatataccagactctcaagcagctgttcccaagggtttctgggagcgaagcctgatgtcgag  
gacggggcgttgcatcgctacaatgacataacactgaaaggagacactttttaacaaagttcgattgatggcgtaaactttccccaatggctctg  
ttatgcagaagaagactctgaaatgggagcctcactgagaaaatgtattgctgatggagtgtgacggcgatattaccatggctctgctgctaaag  
gagatgtccattaccgatgtgacttcagaactctacaatctaggcaggagggtgcaagttgccagatattcatttgcgatcactgcatcagcatatt  
gaggcatgacaagactacaacgaggttaagctgatgagcatgctgtgccattctgattgcccggacaacgtcaag**CGCATCGC**CTAAGCGC  
TCGCCAACTTAGAACTCTATGACTTGATTTTTATAATGTTTCAATTCAGATCCTAGTCCGCTAATTAAGTGT  
CCGTTGTATTGTTTAAACAGCCTCGTGAATAAAGAAAAGGAGGATATATTCATACGCATCGAGATTTGTTTTTT  
GACTTCATTCCTGATTCCTAAAGTTAACGTCTATCTGTTTGATAAAGTCTTACTCAAGCAAAATAGTGCTATCGG  
AGTTTTTTGAATCTTAAAAACTTAAAAAACCATTTGAATAATTTATAAGCCGTCTGTCTAGTAAATGTCATTTTCT  
TGCAAATGTGTTCAATACAAAAATAACATTTTCTTGCAACCATATCATGCAAAACGTTCTCTCAAAGAAAAACTT  
AGAAAACCATAGCGTTTGAATTTCTTTGAGATCTTGTAGAAAAATGGGGATTTGAGAAGTTCTGCAACCAT  
TGTGGTTTTTTCTGCATTTACGATACTAATAGATGCCGATTCGACAGTTGGTAAATGGCGTCAAAAAATTTTTTA  
AATCGCGAAAGAGGCTTACAAATCGGAAACCAAAAAAGGCTAAACAGCTCTAAAGCGAAGAATACTTTGTAAT

CGTTTCGTGAGGTATTGCGGAGGCCAAAAAGTAACCGACTACCAATTTTAAAGATTCCCGAAGATTGAAAACTGC  
TGCGAAAATTCTCTTCAGCTCAAACCTGTGCATAGCTCAACAGGTGAAGTAAGAAAAAGTTCTGTTTTCTTCT  
GCTAAAGTCTCTCTTTATTCTTTCAATTTTCGTGCTTCTCTCGTTAGGAAGCATAATAGAATAGCGGCTGGAACAA  
TTCCAGAGAATCTGCATCATGAGCTATGAGAAAACTTGGCTTGATCGCAAATCAAGGTCTTGTGTTGGTGCCAG  
AAAAACCCGGGGGAGGGGGGGGACAGGTACAGACTTGTGGATGGACGGGGGTCTGNCACCCGGTTTTTCAGA  
NAGCCATCCACTTTTATGATGAATTTTGGTGGNAACTACCCATTTTANCAATTTTTTNGCNATTTCAACAAA  
CCCCCNNTTTTTNTGAAAAANCTNCCAAAAATTACCTTTTTTTAAAAAANTTTTNGCCAAAAACCAACCCNN  
ATTCCCCTNCCNTCAANATTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCGGGCGAGAAAACCGAAAAAGGTCTTCTCTAAAA  
CGTTTTGGGGTCTTGTCTGTCTGTCAAACCTTTAGAAAGTTCACAGAGCCATCCCCTGTAAAGAAAGTAAGAA  
ACACTTCGGCTTTAAAATCATGGAAAGGCAAAATGGACTACGCAATTAGTTTGAAGTTAAAAAATCAAAAATT  
GGCAACTGTTGGCGTACCACAGGTAGTTGTTCTCGGAGCACTGTTCTTTATCAAAGATTG**CGCCGCC**

**P14: LigAN3**

LigAN Vektor: M13F -> Minos ITRs ,1566 bp EF1 promotor (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_45), GFP, 1062 bp Actin Terminator (aurelia\_bs\_polyp\_run090409\_21), Minos ITRs <- M13R built out of pMiLRneo backbone

Minos ITRs; BamHI; XbaI; M13F; M13R

CCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC  
GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGG  
GCGCGTCCCATTCCGCAATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCA  
GCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTT**GTAA**  
**AACGACGGCCAGT**GAGCGCGGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTG**GAGCTG**GCATCAAATTGAGTTTTGCT  
CCATTCTCTATGCTAGCTTAAGATATTTTTCGTTTTCTACGAGCCCCAACCACTATTAATTCGAACAGCATGTTTT  
TTTTGCAGTGCGCAATGTTAAACACACTATATTATCAATACTACTAAAGATAACACATACCAATGCATTTTCGCT  
CAAAGAGAATTTTATTCTCTTCACGACGAAAAAAAAGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAATATGAGTA  
ATTTATTCAAACGGTTTGCTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACCACTATTAATTCGAACGCGCGCTAATGTGATTT  
ACTATCATACTTAAACAATAAT**TAATTA**TATTAGAATTGTGTAACGTCGCCGGTG**CGGGCCG**CTAGAGC  
CAATGTACATTTTATCGTGGTTTTTCAAAAATGGATAGTTTTCTTGGTGAATCCCGTTTATATTGGAAAAACAA  
TATATACTACAAAAAAGTGCAGTGACAATCACTCCAGTACAAAGATAAATTAATCCAAAAACAGAAATGGGAA  
ATTGTTACAAAGTTGTTTTATTTTCATGGTGTGCTTCTCCTATTTGGCACTTTTTTCATCAAAAATCAGTTTCAGCT  
CAATAGCACGAGGAAGGGGAATAATTTGAAATAAGCGAATGCCACAGATGAATGTCACTGTGCGCTTCCCTC  
ATGGATCAACCAGCCTTCCAAAACCAAACTCAGAATAAAATTAACCCATAAGAAACGGGAGAATTTTCAGCT  
TTAATTTGATATATTAATTTTGAATAAATTTGTTGATTATGTGTTGCAAGACGAATGTCACTGTGCTGCTA  
TCAATAAAACAGAACAGTATTTGGTATGATAGCAATAAATTTCTGAGAGACCCTTGCCTGATTCCCAATCTAAAGA  
CTGCTTGCTTTAAATACTTGTACTTTAACAAAATAGTTTGGTACCGCTGGCTTCAAAAAATGATCAGACAAAA  
TTACCTAATATAGGGTCTACTGGGGTAAAAATGGGGCATGCAAAAATGTGAATGAAAGTTATAAGAAACTTCATG  
TACATATTTTCTCCAACATCTGTTGAAACTCCCTCCTTGAAGTTTTGAATGTTGATTGAACAGTTCATGATCTACC  
ATTTTTTCAGCAAATCAATACTAACAATTTACTCCAGCCTCCCATTTTACCCTTGGCTAGAGTAGAAGTCCAAA  
AAGTATAACCTTGACGGCAGCGCATCACCGCATACCTTTACAATGGAAGAACCCCTCGTAGCGAGCTGCCAAGCT  
CACCTTAAACTTAAATTAACAATAAAAAACGCTCTTTGATCAAGCTCTCCATTTCAACGATATGGAGTCTTGGT  
CTTGATACTGCAAGGGTATTGATTATTTTATTAACCTCGCGTGAAGTTTCAACATGATCAAAGAAGCCAAAGGC  
AAGTGGCTTTGAAAACTTGTAGGTGCACTGCCAGATTACGAGGGAATGGAGAATATCAGGATTCCTTTTTTCC  
TAAAGATGTACACTGAAGTTCACACAAAATGTCATTGACCAGGCATCTAAAGAGGGGTCAAACCAATCAAGAGTG  
CCTATCGTGAATTTATATGTTCCACTGCATCAATACAAAATGACTGTAGATAAGGGCAACTTTTGTATCTGCT  
TTGTTTACATCATTGGCTTGATTACTCAGCCCTTGAATCTCTTCGCTTTCAGTCACTAATCACTTTGAAATTGTG  
TGTCAATCAAATGCAAGTTTTGATATTGTAACAAAATCTGCTATTGTAATAAGCACTGGCTTCCCTTCGGATTT  
GTGGTAAGTTTCAGAATTTCTTAAGTCTTTTATGCATTTTCAATTTAGCTTTAATTTGCTAACTTGTTTTTTCAGGTAT  
ATCTGGTAATCAACTAAAACCTTCAAC**ATGGG****CTGCAGG**ACCGGTA**TAATTA**TGAAAAAT**AGTAAGGA**  
**GAAGA**ACTTTT**CACTGGAGTTGTCCCAATTTCTTGTGAATTAGATGGT**GATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTC  
**AGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGAAA**ACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGAAAACTACCT  
GTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTGTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGATACCAGATCATATGAAAC  
GGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTCAAAGATGACGGGA  
ACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTGTAAATAGAATCGAGTTAAAGGTATTGATT



TTAAAGAAGATGGAACATTCCTTGACACAAAATTGGAATACAACATAAECTCACACAATGTATACATCATGGCAG  
ACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTAACTTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCA  
GACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAAT  
CTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTTGTAACAGCTGCTGGGATTA  
CACATGGCATGGATGAACTATACAAAACCGATCGCCCTAAGCGCTCGCCAACCTTAGAACTCTATGACTTGATTTTA  
TAATGTTTTCAATTCAGATCCTAGTCCGCTAATTACTTAGTGTCCGTTGATTGTTTTAACAGCCTCGTGAAAATAA  
GAAAAGGAGGATATATTTTCATACGCAATCGAGATTTGTTTTTGACTTCATTCCCTGATTCTAAAGTTAACGTCTA  
TCTGTTTGATAAAGTCTTACTCAAGCAAAAATAGTGTATCGGAGGTTTTTGAATCTTAAAAACTTAAAAACCAT  
TGAATAATTTATAAGCCGTCTGTCTAGTAAATGTCATTTTTCTTGCAAWTGTGTTTATTACAAAAATAACATTTT  
CTTGCAACCATATCATGCAAAACGTTCTCTCAAAGAAAAACTTAGAAAACCATAGCGTTTTGAAATCTTTTGAGR  
TCTCTTGTAGAAAATGGGGATTTGAGAAGTTCCTGCAACCATTTGTGGTTTTTCTTGCRITTTACGATACTAATAG  
ATGCCGATTTTCGACAGTTGGGTAAMTGSCTGCAAAAAATTTTTAAATCGCGAAAGAGGCTTACAAATCGGAAAC  
CAAAAAGGCTAAACAGCTCTAAAGGCGAAGAACTACTTTGTAATCGTTTCGTGAGGTATTGCGGAGGCAAAAAG  
TAACCGACTACCAATTTTTAAGATTCCCGAAGATTGAAAAACTGCTGCGAAAAATCTCTTCAGCTCAAACTGT  
GCATAGCTCAACRAGGTGAAGTAAGAAAAAGTTCTGTTTTCTTTCTGCTAAAGTCTCTCTTTAYTCTTTCAATT  
TCGTGCTCTCTCGTTAGGAAGCATAATAGAATARCGGCTGGAACAATTCCAGAGAATCTGCATCATGAGCTATG  
AGAAAACTTTGGCTTGATCGAAAATCAAGGTCTTGTGTTGGTGCCAGAAAAACCCCGGGGGAGGGGGGACAGGT  
ACACGACTTGTGGRTGGACGGGGTCTGCCACCCGTTTTTCAGAAAGCCMTCCAGCTTTTATGATGAAATTTGGT  
RRGAAACTACCAATTTTTAGCAATTTTTTGGCGATTTTCAGCCAAACCGACCAGATCCAGCTCTGCAGCATTAT  
TTGCAGATCATAACTAGATAATGATTCCGTTACATTAGTTGCTTTTTGTTTTGCTCTTCTTGAGATTAAGGTAAGC  
TTACGCCGCTTCGAATTAATAGTGGTCACTTTTTCTTATCTCTTAAGCAAACCGTTTTGAATAAATTAATTAATA  
TTTTTGTGTTGTTGGAAATAGAGCAAACTTTTTTTTTCGTCTGTAAGAGAATAAAAATCTCTTTGAGACGAAA  
TGCATTTGGTATGTGTTATCTTTAGTAGTATTGATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGCACTGCAAAAAAACATGC  
TGTTTCAATTAATAGTGGTTGGGGCTCGTAGAAGTCTAAGCTGCTTGGCATAATTTATAGAAGCATTGTGTGA  
GGCTTGTCTTAATGGCGAAAAATTGAAAAATTTAGCATTCAAGCACTTGGTACCAGCTTTTGTTCCTTTAGT  
GAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCCGTTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTC  
CACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTG  
CGTTGCGCTCACTGCCCGTTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG  
GAGAGGCGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTGCGGTGCGG  
CGAGCGGTATCAGCTCAAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATG  
TGAGCAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC  
CCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG  
TTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCC  
TTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCAAGCTG  
GGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGG  
TAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA  
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC  
CAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTG  
TTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACG  
CTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTTGGTATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTT  
TAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTA  
ATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGCTGTGTAGATAA  
CTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAGGCTCCAGA  
TTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAG  
TCTATTAATTTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCGAGTTAATAGTTTGCAGCAACGTTGTTGCCATTTGCT  
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA  
CATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGC  
AGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTG  
ACTGGTGGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATA  
CGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGTCTCATATTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTC  
TCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTA  
CTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA  
AATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTAATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGAT  
ACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTAAAT  
TGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGA  
AATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAG  
TCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGA  
ACCATCACCTAATCAAGTTTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCC

### 9.4 Inhibition der Strobilation mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-CdR

Tab 9.1 : Übersicht der mit 5-Aza-CdR behandelten Tiere mit der Angabe zur Strobilation. K: Ansätze mit DMSO behandelten Tieren; A: Ansätze mit 5-Aza-CdR behandelten Tieren. po: Polyp, st: Strobila, ep: Ephyra gibt die Anzahl der verschiedenen Lebensstadien im Ansatz pro Tag an.

Inhibition der Strobilation mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-CdR, Experiment I											
Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DMSO	st/po										
K I	0/20	0/20	0/20	0/21	0/21	0/23	0/23	0/23	0/23	0/23	0/23
K II	0/20	0/20	0/21	0/22	0/22	0/25	0/25	0/25	0/26	0/26	0/23
K III	0/20	0/20	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21
5-Aza-2 CDR	st/po										
A I	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/18	0/18	0/19	0/19	0/18
A II	0/20	0/20	0/22	0/23	0/23	0/25	0/25	0/25	0/28	0/27	0/26
A III	0/20	0/20	0/24	0/24	0/24	0/28	0/28	0/25	0/26	0/24	0/24

Tag	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
DMSO	st/po										
K I	0/23	0/23	0/23	1/22	2/22	2/23	2/23	2/23	2/23	2/23	3/23
K II	0/25	0/25	1/25	1/26	1/26	1/26	1/26	1/25	1/25	1/25	1/25
K III	0/21	0/21	0/21	0/21	1/18	1/19	1/19	1/18	1/18	1/18	1/19
5-Aza-2 CDR	st/po										
A I	0/19	0/19	0/20	0/20	0/18	1/18	1/18	1/19	1/19	1/19	1/19
A II	0/27	0/27	0/27	0/27	0/25	0/26	0/26	0/26	1/26	1/26	1/26
A III	0/26	0/26	0/26	0/24	0/24	0/23	0/23	0/23	0/23	0/23	0/23

Tag	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
DMSO	st/po								ep/st/po		
K I	3/23	3/23	3/23	3/23	3/23	3/23	3/23	5/23	1/7/23	4/9/23	10/9/23
K II	1/25	1/25	1/25	1/25	2/25	2/25	4/25	6/25	17/6/25	6/6/25	9/9/25
K III	1/19	1/19	1/19	1/18	1/18	1/18	1/18	1/18	0/2/19	0/2/19	6/3/19
5-Aza-2 CDR	st/po										
A I	1/19	1/19	1/19	1/19	1/19	1/19	1/19	1/19	2/20	2/20	2/20
A II	1/26	1/26	1/26	1/26	1/26	1/26	1/26	2/26	2/26	2/26	2/26
A III	0/23	0/23	0/23	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/23	0/23	0/23

Tag	34	35	36	37	38	39
DMSO	ep/st/po					
K I	14/9/23	15/9/23	25/14/23	25/14/23	32/12/23	52/8/25
K II	9/9/25	9/16/25	9/16/25	24/16/25	33/13/25	55/7/25
K III	6/6/19	6/8/19	6/8/19	8/7/19	9/7/19	29/5/19
5-Aza-2 CDR						
A I	3/3/20	4/4/20	9/4/20	4/4/20	4/4/20	6/4/20
A II	4/26	1/4/26	4/6/26	5/5/26	6/4/26	6/4/26
A III	0/23	0/23	0/23	0/23	0/23	0/23

Inhibition der Strobilation mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-CdR, Experiment II											
Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DMSO	st/po										
K I	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
K II	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
K III	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
5-Aza-2 CDR	st/po										
A I	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
A II	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
A III	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30

Tag	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
DMSO	st/po		mRNA extraktion		mRNA extraktion					
K I	0/30	0/30	0/25	2/25	3/20	6/20	11/20	13/20	13/20	16/20
K II	0/30	0/30	0/25	3/25	5/20	8/20	9/20	9/20	10/20	13/20
K III	0/30	0/30	0/30	1/30	2/30	4/30	7/30	11/30	11/30	18/30
5-Aza-2 CDR	st/po									
A I	0/30	0/30	0/25	0/25	0/20	3/20	4/20	6/20	6/20	6/20
A II	0/30	0/30	0/25	0/25	0/20	0/20	0/20	5/20	8/20	10/20
A III	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	1/30	1/30	4/30	5/30	5/30

Tab. 9.2 Übersicht der mit 5-Aza-CdR behandelten Tiere mit der Angabe zur Strobilation in Prozent, Auszug aus Tabelle 9.1 mit Angaben zum Zeitpunkt der höchsten Strobilation, der Anzahl der Strobilae, der gesamten Tiere eines Ansatzes, der Strobilation in Prozent je Ansatz, dem Mittelwert aus je drei Ansätzen und der Standardabweichung für den Mittelwert.

Inhibition der Strobilation mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-CdR Experiment I					
Anzahl der Strobilas an Tag 36	Strobila	Tiere gesamt	Strobilation in %	Mittelwert 1-3	STABW
K 1	14	23	61		
K 2	16	25	64		
K 3	8	19	42	56	11,84
Aza 1	4	20	20		
Aza 2	6	26	23		
Aza 3	0	23	0	14	12,53
Inhibition der Strobilation mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-CdR Experiment II					
Anzahl der Strobilas an Tag 21	Strobila	Tiere gesamt	Strobilation in %	Mittelwert 4-6	STABW
K 4	16	20	80		
K 5	13	20	65		
k 6	18	30	60	68	10,40
Aza 4	6	20	30		
Aza 5	8	20	40		
Aza 6	5	30	17	29	11,71

## 9.5 Übersicht über die Injektionen der Reporter-Konstrukte

**Tab. 9.3:** Übersicht der Injektionen von Reporter-Konstrukten in Embryonen von *Aurelia autita* der Jahre 2008/2009. Neben der Injektions-Nummer ist das Datum der Injektion, die Plasmid-Nummer, der Plasmid-Name, die Konzentration des Plamids und der Gehalt an RITC im Injektionsansatz angegeben. Ebenfalls angegeben ist, ob das Konstrukt linearisiert wurde und ob gDNA, Minos-Transposase mRNA oder GFP-mRNA im Injektionsansatz enthalten waren. Abschließend ist die Anzahl an injizierten Embryonen pro Tag, injizierte Embryonen gesamt und RITC-positive Embryonen sieben Tage nach der Injektion aufgelistet.

Injektions Nr.	Datum	Plasmid Nr	Plasmid - Name	Konzentration	RITC	Linearisiert	Genomische DNA NotI verdaut	Minos Transposase mRNA	GFP mRNA	Injizierte Embryonen	Injizierte Embryonen gesamt	RITC-positive
2008												
1	17.06.08	1	VTP-H12	1µg/µl	2%70Kd					13	13	0
2	18.06.08	2	VALP18	0,5µg/µl	2%70Kd					0	13	0
3	24.06.08	2	VALP18	0,9µg/µl	2%70Kd					12	25	6
4	25.06.08	1	VTP-H12	1µg/µgl	2%70Kd					20	45	2
5	26.06.08	2	VALP18	0,9 µg/µl	2%70Kd					10	55	4
6	07.07.08	3	VTTG3	2,0 µg/µl	2%70Kd					55	110	1
7	07.07.08	4	VA16M26	1µg/µl						50	160	0
8	08.07.08	5	VUG11	1µg/µl	2%70Kd					97	257	4
9	08.07.08	6	VA16G3	1µg/µl	2%70Kd					85	342	1
10	14.07.08	7	VHPII4	2µg/µl	2%70Kd					89	431	13
11	15.07.08	2	VALP18	0,9µg/µl	1%10Kd					101	532	17
12	16.07.08	6	VA16G3	2µg/µl	1%10Kd					107	639	30
13	17.07.08	7	VHPII4	2µg/µl	1%10Kd					141	780	38
14	22.07.08	2	VALP18	2µg/µl	1%10Kd					156	936	24
15	24.07.08	2	VALP18	3µg/µl	1%10Kd					113	1049	40
16	24.07.08	2	VALP18	0,8µg/µl	1%10Kd	NotI				97	1146	44
17	30.07.08	7	VHPII4	2µg/µl	1%10Kd					39	1185	10
18	04.08.08	2	VALP18	2µg/µl	1%10Kd					105	1290	32
19	06.08.08	7	VHPII4	2µg/µl	1%10Kd					42	1332	12
20	07.08.08	7	VHPII4	2µg/µl	1%10Kd					80	1412	20
2009												
21	16.06.09	8	VEGT3	1µg/µl	1%10Kd							
22	17.06.09	9	VEKT7	1µg/µl	1%10Kd					109	109	
23	18.06.09	8	VEGT3	1µg/µl	1%10Kd					57	166	
24	22.06.09	9	VEKT7	1µg/µl	1%10Kd					105	271	
25	23.06.09	10	VEG4	1µg/µl	1%10Kd					74	345	
26	24.06.09	11	VEK12	1µg/µl	1%10Kd					38	383	
27	25.06.09	9	VEKT7	1µg/µl	1%10Kd					104	487	
28	29.06.09	11	VEK12	1µg/µl	1%10Kd					136	623	
29	30.06.09	8	VEGT3	1µg/µl	1%10Kd					118	741	
30	01.07.09	9	VEKT7	1µg/µl	1%10Kd					144	885	
31	02.07.09	8	VEGT3	1µg/µl	1%10Kd					51	936	
32	06.07.09	9	VEKT7	1µg/µl	1%10Kd					87	1023	
33	07.07.09	12	VAGT2	1µg/µl	1%10Kd					141	1141	
34	08.07.09	13	VAKT1	1µg/µl	1%10Kd					178	1342	
35	09.07.09	12	VAGT2	1µg/µl	1%10Kd					161	1503	
36	13.07.09	13	VAKT1	1µg/µl	1%10Kd					159	1662	
37	14.07.09	12	VAGT2	1µg/µl	1%10Kd					135	1797	
38	15.07.09	13	VAKT1	1µg/µl	1%10Kd					79	1876	
39	16.07.09	12	VAGT2	1µg/µl	1%10Kd	NotI				57	1933	
40	16.07.09	12	VAGT2	1µg/µl	1%10Kd	NotI	100ng/µl			33	1966	
41	20.07.09	12	VAGT2	1µg/µl	1%10Kd	NotI	100ng/µl			174	2140	
42	21.07.09	8	VEGT3	1µg/µl	1%10Kd	NotI				110	2250	
43	22.07.09	8	VEGT3	1µg/µl	1%10Kd	NotI	180ng/µl			71	2321	
44	23.07.09	12	VAGT2	1µg/µl	1%10Kd	NotI	100ng/µl			166	2487	
45	27.07.09	7	VHPII4	1µg/µl	1%10Kd					37	2524	

46	28.07.09	7	VHPII4	1µg/µl	1%10Kd					171	2695	
47	29.07.09	8	VEGT3	1µg/µl	1%10Kd	NotI	180ng/µl			120	2815	
48	30.07.09	14	LigAN3	1µg/µl	1%10Kd					134	2949	
49	03.08.09	14	LigAN3	1µg/µl	1%10Kd			0,1µg/µl	0,1µg/µl	136	3085	
50	04.08.09	14	LigAN3	1µg/µl	1%10Kd			0,1µg/µl	0,1µg/µl	66	3151	
51	05.08.09	14	LigAN3	1µg/µl	1%10Kd			0,1µg/µl	0,1µg/µl	102	3253	
52	06.08.09	14	LigAN3	1µg/µl	1%10Kd			0,1µg/µl	0,1µg/µl	89	3342	

## 9.6 16S rDNA Sequenzen der *Aurelia aurita* Linien

16S rDNA Sequenzen der im Labor gehälterten Polypen von *Aurelia aurita*

>Nordsee-Polypen

CTCTTGTAAGGTGAAGCCTGCCAATGACTGTTAATAATCCAATTAACCAGTTCAATGGCCGCGGTAACCTCTG  
 ACCGTGATAAAGTAGCATAATCACTTGTCACTTAATTAGTGACTGGAATGAATGGCTAAACGAATCCTCCTCTGT  
 CTCTGAAAGAAGTCCGGCGAATTTGAAATAACAGTGAAGATGCTGTTAAATAATTGTAAGACGAAAAGACCCTAT  
 CGAGCTTTACTGAAAGCTTGTAAACAAATATGATTATCACCAACGAACCTTAAAAATTGCAAGCCTGACAGTTT  
 GGTTGGGGCGACCACCCCTAAAAAAGTATCAGGGGAACTCTAAAGGTTACCATAATATGGAAAATTGCCTTACTG  
 GAAACAAACAAGTCAATCAGTTATAATTTATAGGACATATTGACCCGTTATTTTGTTCATAATAAATAACGACTA  
 TGAAAAAAGTTACCGTAGGGATAACAGGGTAATATTTTCAGAGAGTTCATATCGATGAAAATGTTTGCCACCTCG  
 ATGTTGAATTATG

>Ostsee-Polypen

CTCTTGTAAGGTGAAGCCTGCCAATGACTGTTAATAATCCAATTAACCAGTTCAATGGCCGCGGTAACCTCTG  
 ACCGTGATAAAGTAGCATAATCACTTGTCACTTAATTAGTGACTGGAATGAATGGCTAAACGAATCCTCCTCTGT  
 CTCTGAAAGAAGTCCGGCGAATTTGAAATAACAGTGAAGATGCTGTTAAATAATTGTAAGACGAAAAGACCCTAT  
 CGAGCTTTACTGAAAGCTTGTAAACAAATATGATTATCACCAACGAACCTTAAAAATTGCAAGCCTGACAGTTT  
 GGTTGGGGCGACCACCCCTAAAAAAGTATCAGGGGAACTCTAAAGGTTACCATAATATGGAAAATTGCCTTACTG  
 GAGACAAACAAGTCAATCAGTTATAATTTATAGGACATATTGACCCGTTATTTTGTTCATAATAAATAACGACTA  
 TGAAAAAAGTTACCGTAGGGATAACAGGGTAATATTTTCAGAGAGTTCATATCGATGAAAATGTTTGCCACCTCG  
 ATGTTGAATTATG

>Roscoff-Polypen

CTCTTGTAAGGTGAAGCCTGCCAATGACTGTTAATAATCTAATAAAAAATCAGTTCAATGGCCGCGGTAACCTCTG  
 ACCGTGATAAAGTAGCATAATCACTTGTCACTTAATTGGTGACTGGAATGAATGGCTAAACGAATCCTCCTCTGT  
 CTCTGAAAGAAGTCCGGCGAATTTGAAATAACAGTGAAGATGCTGTTAAATAATTGTAAGACGAAAAGACCCTAT  
 CGAGCTTTACTGGAATCTTGCAAAGTAACATAGTTATTAAGACAAAATTATACAAATTGCAAGCCCAGAGTTT  
 GGTTGGGGCGACCACCCCTAAAAACGTATCAGGGGAACTCTAAAGGCTGTCATAATATGAAAACCGCCTTACTG  
 GAGACAAACAAGTCAATCAGTTATAATTTATAGGACATATTGACCCGTTATTTAGCTTACACAACAATAACGACT  
 ATGAAAAAAGTTACCGTAGGGATAACAGGGTAATATTTTCAGAGAGTTCATATCGATGAAAATGTTTGCCACCTCG  
 GATGTTGAATTATG

>Weißmeer-Polypen

CTCTTGTAAGGTGAAGCCTGCCAATGACTGTTAATAATCCAATTAACCAGTTCAATGGCCGCGGTAACCTCTG  
 ACCGTGATAAAGTAGCATAATCACTTGTCACTTAATTAGTGACTGGAATGAATGGCTAAACGAATCCTCCTCTGT  
 CTCTGAAAGAAGTCCGGCGAATTTGAAATAACAGTGAAGATGCTGTTAAATAATTGTAAGACGAAAAGACCCTAT  
 CGAGCTTTACTGAAAGCTTGTAAACAAATATGATTATCACCAACGAACCTTAAAAATTGCAAGCCTGACAGTTT  
 GGTTGGGGCGACCACCCCTAAAAAAGTATCAGGGGAACTCTAAAGGTTACCATAATATGGAAAATTGCCTTACTG  
 GAGACAAACAAGTCAATCAGTTATAATTTATAGGACATATTGACCCGTTATTTTGTTCATAATAAATAACGACTA  
 TGAAAAAAGTTACCGTAGGGATAACAGGGTAATATTTTCAGAGAGTTCATATCGATGAAAATGTTTGCCACCTCG  
 ATGTTGAATTATG



## 9.7 Oligonucleotide (Primer)

Name	5' Sequenz 3'	Markierung	Tm
<b>Vektor</b>			
SP 6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC	(IRD 700)	53,5
SP 7	TAATACGACTCACTATAGGG	(IRD 800)	53,2
M13 F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	(IRD 700)	62,4
M13 R	AGCGGATAACAATTCACACAGG	(IRD 800)	58,6
<b>Reporter-Gene</b>			
GFP_F (625) IRD800	CGAAAGATCCCAACGAAAAGA	(IRD800)	55,9
GFP_R (75) IRD700	GTGCCATTAAACATCACCATC	(IRD700)	57,9
aKaede_seq_R700	cttcttgactacaaggtcc	(IRD700)	55,3
aKaede_seq_F800	actgcatcagcatattgagg	(IRD800)	55,3
MCherry_R222_800	TTGGAGCCGTACATGAAC	(IRD800)	53,7
MCherry_F619_700	CATCAAGTTGGACATCACC	(IRD700)	54,5
<b>Splinkeretten</b>			
SplOutPri_2	GAATCGTAACCGTTCGTACGAG		60,3
SplinnPri 2	CGTACGAGAATCGCTGTCTCTC		61,8
<b>16S rDNA</b>			
AA_16S_L5	CTCTTGTAAGGTGAAGCC		53,7
AA_16S_H5	CATAATTC AACATCGAGG		49,1
<b>Tubulin (CL2Contig1)</b>			
aurTub_F(44)	AGTGGAAAGAGGCATTCTCG		56,7
aurTub_R(290)	ACAAAGACAGCTCTTGGGAC		57,4
aurTub_I(162)	CAAGTGCCTCTCGTCCACC		61,4
aTub_ProF_salI	CTAGTCGACCACTACAGTCTTTGGTCATGC		68,2
atub_ProR_sbfI_2	GTTCTGCAGTTTCAGCCATCTTGATTGTTTGTGCTG		71,6
Tub_F-319TGA	CATTGCAACAATCAAACCAAGAGAACC		65,2
Tub_R8TGA	CAATGGAGTCAACACCAACCCTC		62,4
Tub_R-89TGA	CTTCCTTTTCAAACATTTTATAACATTTTCAATG		61
aTub-FTer+53	AGGCCAGAGAAGATTTGGCTGC		62,1
aTub-FTer-4	ATTGACGCAGAGGGAGAAGAGG		62,1
aTub-FTer+265out	GCATCGACAATCAAATCCATTTAAAATGC		60,7
aTub-FTer+294in	GGGATGCAAAGGATTGTGGTAATAAG		61,6
Tubter R572	TTCCCATGGAATGGATCATACC		58,4
Tubter_tgaF_Asi	CAATGCGATCGCGTACTCCATTGACGCAGAGGG		74,3
Tubter R572_Asc	CAATGGCGCGCCTTCCCATGGAATGGATCATACC		73,1
<b>aktin (CL1Contig2)</b>			
aActin_F(3)	GGGTGATGAAGATGTAGCAGCTC		62,4
aActin_R(25)	GAGCTGCTACATCTTCATCACCC		62,4
aActin_R(336)	GTTGAGTGGGGCTTCTGTGAGC		64
aActin_F(1103)	CATCCATCGTCCACAGGAAATGC		62,4
aActin_F(1419)	CAAGTTGAGGCCAATTCCTCAAG		61
aACTP_Sbf_R	GATTCCTGCAGGTGCTACATCTTCATCACCCAT		69,5
aACTT_Asi_F	CAATGCGATCGCGTAAACAGCTCCCAAGAATTCATTC		70,5
aACTT_Asc_R	CAATGGCGCGCGTGTTCCTTCAGGTTTGATCTC		72,9
aACTP_Sbf_F	ACGACCTGCAGGGAGCTTCGATGGCCACTTAC		73,3
aACTT_R3	GCACTATCAACACGAAGTATAGG		58,9
aurACTP_R88_in	GAAAGTCCCACGCATGAATTGG		60,3
aurACTP_R177_out	TAATTCTACAATTAGACGTCAGACC		58,1
aActF1642salxba	CTTGTGCACATCTAGACTTTTGGTAGCAACAAAATGTTCC		68,4
<b>aktin (aurelia_bs_polyp_run090409_21)</b>			
Aactin_F57	GAAGTAGAAGAAGTCAAGAACCTTCG		61,3
Aactin_F44	GAACCTTCGTTGTCTTAGGCC		59,8
aActin_R336	ATTTAAAGGAGCTTCGGTGAGCAG		61
Aactin_F589	CTTGATGAAGATCCTCACCGAGA		60,6
Aactin_F952	CCGACAGAATGCAGAAGGAGA		59,8
Aactin_R1234	CGAGGCTGTTAAACAATACAACGG		61
AAct_PRII_R+46	GGCCTAAGACAACGAAGGTTCTG		62,4

## Kapitel 9: Anhang

AAct_PRI_R-2	GTGCTGCGATTCTTCATCACCC		62,4
Aactin_R1234	GAGGCTGTTAAACAATACAACGG		58,9
AAct_T_AsiSI_F	CTAGCGATCGCCTAAGCGCTCGCCAACCTAG		72,1
AAct_T_Asc_R	CATGGCGCGCCAATCTTTGATAAAGAACAGTGTCC		72,8
AAct_P_Sbfi_R	GATCCTGCAGGACCCATTTGATGTGTTTTTTGTTAGG		69,5
AAct_P_SaII_F	CGAGTCGACCAAAATGGTACCGTTGGCTAGACC		72
<i>ubiquitin (CL18contig1)</i>			
aurUbi_F(50)	GAAGACGTGTCGTTTTAGTTCCG		58,4
aurUbi_R(303)	TCCTCTCAGACGTAGAACAAGG		60,3
aurUbi_I(128)	TACATTGTCGATGGTGTCACTTGG		61
aurUbi_R136_out	CCCAGAATCCATCTGGATATTTCC		61
aurUbi_R58_in	TTCTCGTGTCTCGTGTGTGC		61,8
Ubi_F-761_SaIINot	AATGTCGACAGCGGCGCCTTTGACTTTGGGCCCTTGAG		76,8
Ubi_R9_Sbfi	TGTCCTGCAGGAAAGATCTGCATCTCGAAATCTCG		70,6
<i>histon 3 (CL200Contig1)</i>			
aurHis3_ATG	GTAAAAACATGGCCCGTACC		57,9
aurHis3_R(265)	GAGCAATTTCTCTACAAGCC		57,9
aurHis3_R50_I	CCAGTTGATTACGTGCTGTTTGC		61
aHis3_F-1333_Pro	GGAACATTGACAGATCTGCTTG		60,6
aHis3_R410_TGA	GTGTTTCATGCTCTCTCCACG		62,1
aHis3_F-1356SaII	CTTGTGCAGAGTCGACGACTATCTATGAAAAAGACTTGG		70,4
aHis3_R-ATG_Sbfi	CTTCCTGCAGGACGGCCATGTTTTAACTTATC		69,5
<i>EF1 (aurelia_bs_polyp_run090409_45)</i>			
EF1_F56	CCAGCGTGGAGGATTGTTACC		61,8
aEF1_F36	CCGGTATATCTGGTAATCAACTAAAAC		60,4
aEF1_R105	GTCAATACCACCACATTTGTAGATGAG		61,9
aEF1_R233	CACAAGGCAATATCAATGGTATACC		61,6
AEF1_P_Sbfi_R	GATCCTGCAGGACCCATGTTGAAGTTTTAGTTG		68,2
AEF1_P_XbaI_F	CGATCTAGAGCCAATGTACATTTTATCGTGG		65,5
<i>in situ Sonden Gene</i>			
aHZe_F_11	CCAACAAAATGAAGGCCATTTTAAAGC		60,1
aHZe_R_1180	CTTATCCCAGGATTTTGGCTTTG		58,9
MC_bs314_F+19	GCAAAGTGGGACATATTGAAAGG		61
MC_bs314_R+805	CAGTTATTCAAAGAGTGAGTCTGTGG		61,6
aMc_1764_F+2	ATGAAGCTCCAGATCTTCGTAGC		60,6
aMc_1764_R+504	TCATGGGCAAGATGGAGGAC		59,4
aMc_1900_F+1	GATGCGAAAAGTTAGGATTATATTATGC		59,3
aMc_1900_R+513	CTTTCGTTTCGATGATGATGATTGG		59,3
aMc_7145_F+68	TCTGTCCAACGCAATGTATAGC		58,4
aMc_7145_R-362	ACTGAACGATCTCTAGAAGATGG		58,9
aMc_12648_F-4	CAAAATGGCAACTAACTAGTTATTGC		58,9
aMc_12648_R+579	TTATTTGCCACAGCATGTTGGTG		58,9
aPatch2 F	CTTTCAGAGAATGCTTTATTGCTTGG		60,1
aPatch2 R	TCAAAACAAGGAATGGCACTATTCC		59,7
aCl390_F_	CGACAATGAAGGTCCTTTCTATCC		61
aCl390_R	TCAGAGATCTTTGTAGGCTCAACC		61
aCL631_F	CCATATGAAAAGTTGCCCTTGACGG		61
aCL631_R	CTCATCGGAGATACTGATAGATACC		61,3
aBMP1_F	GATGACCCACTTATAAGAGAAGTCG		61,3
aBMP1_Rin	TGCATTATATGTGCCAAGAGG		61
aBMP1_RinII	GTGCAATGATCCAGTCTCTCC		61,8
aBMP1_Rout	CTGGTACTTCTTGAGAACAACTTGC		61,6
aCL112_Fin	GCAACTGCTTCGTTGGATTTACC		60,6
aCL112_R	TTCTTGTTTCAGTGTGGTCTCC		58,9
aCL160_F	CAAGATTTTAGAGGTACACGGACG		61
aCL160_R	CCTGCATACTATTGAGAACAGGC		60,6
aCl1661_F	CACAACCCTACTCAACATGCC		60,3
aCl1661_R	CATCCATGTCTCTCATATATCGC		58,9
RXR26884_F	TGCATTTGCCCGAGAAAGTCC		59,8
RXR26884_R	TGGCATTTATTTCTGATTTTCTGTCC		58,9



RXR16788_R	CTCAATCAATTGTGGATTGCTTATCC		60,1
aPatched_F	CTCCCACTAGTCTAAATGACAGC		60,6
aPatched_R	GAGATGCATGCCATCAATAAGCC		60,6
ETS4522_F	CTATAACGAGGAATATTTTTAATAAATTACACG		60,1
ETS4522_R	TCGAATTTGTAAGCGTAACGTTTGG		59,7
aEED_F+92	GACCACAAACAGCCTATCTTTGG		60,6
aEED_R+1148	TGTCCCATCTCCAAACTGTTCC		60,3
AABud_F1	ATAGCAATGGCGATTCAAAATGCGG		59,3
AABud_R+267	CCTGAATCTTCTTCTGCGCC		59,4
AAFrzA1_F72	CCATGGGCAAAGACAATGCGG		59,8
AAFrzA1_R938	CAACTCCATTCTGTATCAATACAGG		59,7
DNMTa_F	AAGATGCAGTGGATGAATCAGTGG		61
DNMTc_R	CCAGTTTCTCCAAGAAGTCTTTCCG		61
aPax6_F1	ACTGGTCAATCCGACCAGG		59,4
aPax6_R233	CTTGCCCATCCCAAACTTCG		59,8
ATbx1II_F	GCAGGACAATTGACACACAAATGG		61
ATbx1II_R	GTTGTGTGATCATGTGATTTGATATGC		60,7
aBMPreg_F	GATCTTTCTCGAAGACATTTCAATTGC		60,1
aBMPreg_R	CTTTTCCAGTACAAAGCCACTCC		60,6
CL5_F	CAAAATGAAGATCCTTGCAATTG		54,7
CL5_R	CAGCAGCGTTGAATACGTAAG		57,9
aMegl_F+219	ATTGAGATCGACAGAAAGTACTTCG		59,7
aMegl_R+829	TAAATGCTTGCATGCTGAATCTTTGC		60,1
aCL3300II_F	AAACTGCTCTTGATGAAGAAATAGCG		60,1
aCL3300II_R	CTCTGATTTCCCTGGTTAAATCTGC		59,7
AcI4176_F-1	GATGAAGCTCATTATCTTGCTTATCC		60,1
AcI4176_R+507	GACTCGTTTTAGCAATTTCAAGTAGC		60,1
aCl1270_F1	AGTTTGTCTTGAAGCTGAAAATGGC		60,1
aCl1270_R1144	TATCATAACCATCGTTGATCCAAAGC		60,1
aCl1549_F3	AAAGGTACAAGTTGGCAGTTCAC		58,9
aCl1549_R1285	ACATGTCACGAATCCATGAAACC		58,9
melarc15429_FII	GGACAATACACTGGTACATAAGTGC		61,3
melarc15429_RII	ACACCAAATGAGACATGTCTTCCC		61
MSX13042_F	AATACATCTTGAGTTGCGAAAGTTCG		60,1
MSX13042_R	CTTCTTTTCTTTGCTCGTCGG		60,3
aNa F+437	AACATAATACCATCTGCTCGG		58,9
AAanos_R+591	CTTTCATTGAGCAATGCATTTATTAAGCC		61,3
AAcniwi2_F18	GATTCCAATGCGATCCGTAATGG		60,6
AAcniwi2_R441	ATCAAGTTTTCTGACCACCTCC		61
AAsox2_F4	TCACGTGAAAGAAGAAGAAAGATGG		59,7
soxII R 978	CATTCTAATTATCTATAATGCAAATTAACACG		59,8
AKLF13_F	TTGTTAAATGATCACTCCTCATGAAACG		60,7
AKLF13_R	CATATGAAGGATGTGAGAAAGTGTATGG		62,2
aRFam F	ATGAAACTCACCTTGCAATAGTGC		59,7
aRFam R	AATCTTTGGCATCAGTTCTCTTTGG		59,7
LW-am2 F	GGAGAAAAGAGAAAATCAACCACC		59,3
LW-am2 R	CTTTAATACTTTATCATGAAGCTTCC		56,9

### 9.8 Elektronische Daten

Aufgrund des Umfangs sind die Transkriptom-Datenbanken und die Mikroarray-Daten auf einer beiliegenden CD gespeichert.

## 10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas, sowie die kontinuierliche wissenschaftliche Unterstützung und persönliche Betreuung.

Besonders danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Konstantin Khalturin für eine Vielzahl kompetenter Ratschläge und die kreativen Diskussionen.

Herrn Jörg Wittlieb danke ich für die kompetente Umsetzung der Mikroinjektionen. Frau Dr. Friederike Anton-Erxleben danke ich für die Unterstützung bei allen mikroskopischen Techniken und Herrn Dr. Georg Hemmrich-Stanisak für die Bearbeitung der bioinformatischen Daten. Frau Maria Franck danke ich für die Organisation von jeglichem benötigten Arbeitsmaterial und Frau Christa Kuzel danke ich für die Unterstützung bei bürokratischen Problemen. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern für die schöne Zeit im und um das Labor bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Mutter Renate Brüning, meiner Schwester Britta Fuchs und meinem Vater Peter Fuchs, sowie meinen Großeltern, die sich zeitlebens für mich eingesetzt haben bedanken.

Und natürlich möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken.

## 11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbst verfasst habe. Dabei habe ich keine Hilfe, außer der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch in Anspruch genommen. Des Weiteren erkläre ich, dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Kiel, den 2. September 2010

---

Björn Steffen Fuchs