

Charakterisierung des cysteinreichen  
Virulenzfaktors CyrA im Nematoden-fangenden  
Pilz *Duddingtonia flagrans*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

**Nicole Wernet**

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer  
2. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper  
Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2021



Charakterisierung des cysteinreichen  
Virulenzfaktors CyrA im Nematoden-fangenden  
Pilz *Duddingtonia flagrans*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

**Nicole Wernet**

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer  
2. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper  
Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2021

Das Genie beherrscht das Chaos

- Albert Einstein

# Eidesstattliche Erklärung

Die Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation wurden von 2018 bis 2021 am Institut für Angewandte Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt. Die Arbeiten wurden von Prof. Dr. Reinhard Fischer betreut.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit in selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entstammen, wurden durch Angabe der jeweiligen Quelle kenntlich gemacht. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 26.06.2017, habe ich beachtet. Die elektronische Version der vorliegenden Arbeit stimmt mit der schriftlichen Arbeit überein. Weiterhin ist die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. 1 § 3 der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Institutes für Technologie beim Institut gesichert.

---

Karlsruhe, den 09.06.2021

---

Nicole Wernet

## Publikationsliste

**Wernet, N.**, Wernet, V. & Fischer, R. (2021). The small secreted cysteine-rich protein CyrA is a virulence factor of *Duddingtonia flagrans* during the *Caenorhabditis elegans* attack. Manuskript in Vorbereitung.

Yu, X., Hu, X., Mirza, M., **Wernet, N.**, Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Schaefer, J., Bunzel, M. & Fischer, R. (2021). Fatal attraction of *Caenorhabditis elegans* to predatory fungi through 6-methyl salicylic acid. Nature Communications, in Revision.

Youssar, L.\* , Wernet, V.\* , **Hensel, N.\***, Yu, X., Hildebrand, H. G., Schreckenberger, B., Hetzer, B. & Fischer, R. (2019). Intercellular communication is required for trap formation in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. PLoS Genetics, 15(3):e1008029;

\* zu gleichen Teilen beigetragen

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	i
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Lebenszyklus und Fallenbildung .....	2
1.2 Anwendung von <i>Duddingtonia flagrans</i> in der Landwirtschaft .....	4
1.3 Interspezies Kommunikation zwischen NFP und Nematoden .....	6
1.4 Effektorproteine und Virulenzfaktoren pathogener Pilze .....	7
1.5 Sekretion von Effektorproteinen und Virulenzfaktoren .....	12
1.6 Der Modellorganismus <i>C. elegans</i> .....	15
1.7 Das <i>C. elegans</i> Immunsystem .....	16
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>23</b>
2.1 Bioinformatische Analyse kleiner cysteinreicher Proteine im <i>D. flagrans</i> Sekretom .....	23
2.2 Das kleine cysteinreiche Protein CyrA wird sekretiert .....	24
2.3 Die Genexpression von <i>cyrA</i> ist während der Interaktion hoch-reguliert .....	26
2.4 Die Deletion von <i>cyrA</i> beeinträchtigt die Virulenz .....	28
2.5 CyrA lokalisiert in Fallen-spezifischen Strukturen .....	30
2.6 Die Lokalisation von Proteinen im Sekretionsweg in Fallen unterscheidet sich von der in vegetativen Hyphen .....	33
2.7 CyrA wird an der Penetrationsstelle im Wirt sekretiert .....	35
2.8 Brefeldin A inhibiert die Sekretion von Proteinen an der Infektionsstelle .....	36
2.9 Der Exocyst-Komplex ist an der Virulenz von <i>D. flagrans</i> beteiligt .....	39
2.10 Etablierung eines Expressionssystems pilzlicher Virulenzfaktoren in <i>C. elegans</i> .....	43
<b>3 Diskussion .....</b>	<b>51</b>
3.1 Die Lokalisation von Virulenzfaktoren erlaubt eine räumlich-zeitliche Einordnung der Funktion in das Infektionsgeschehen .....	52
3.2 Der Sekretionsweg in Fallen .....	53
3.3 Das Wettrüsten zwischen Nematoden und Pilzen .....	57
3.4 Die Expression pilzlicher Proteine in <i>C. elegans</i> liefert Hinweise auf ihre Funktionsweise .....	58
3.5 Mögliche Funktionen der <i>C. elegans</i> Coelomocyten während der Infektion .....	60
3.6 Fazit und Modell .....	61

<b>4 Material und Methoden</b> .....	63
<b>4.1 Verwendete Mikroorganismen und Plasmide</b> .....	63
<b>4.2 Verwendete Geräte und Chemikalien</b> .....	79
<b>4.3 Molekularbiologische Methoden</b> .....	81
<b>4.4 Mikrobiologische Methoden</b> .....	92
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	99

# Zusammenfassung

Nematoden-fangende Pilze (NFP) sind eine Gruppe faszinierender, karnivorer Mikroorganismen. Bei Nährstoffmangel sind sie in der Lage vom saprotrophen Wachstum zu einem räuberischen Lebensstil zu wechseln. Dieser Wechsel geht mit der Ausbildung hoch-spezialisierter Fallenstrukturen und der Sekretion zahlreicher Signalmoleküle einher. Die Fallen werden ausgebildet, sobald die Pilze Nematodenspezifische Ascaroside wahrgenommen haben. Nun locken die Räuber ihre Beute in die Fallen, indem sie attraktive, olfaktorische Signale abgeben. Es folgt ein ganzes Arsenal sekretierter Moleküle, um die Kolonisation der Nematoden durch die Pilze sicherzustellen. Dazu sind zunächst vor allem lytische Enzyme notwendig. Da der Fangvorgang der räuberischen Pilze relativ schnell abläuft und keine längerfristige Interaktion bestehen muss, stellt sich die Frage, ob neben den lytischen Enzymen auch kleine sekretierte Proteine eine Rolle spielen. Diese SSPs sind als Virulenzfaktoren und Effektorproteine in vielen tier- und pflanzenpathogenen Pilzen und Bakterien beschrieben. Da die Nematoden im Kontakt mit den Fallen Abwehrmechanismen aktivieren, könnten solche Virulenzfaktoren auch für die Überwindung der Strategien der Nematoden für NFP wichtig sein.

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem Nematoden-fangenden Pilz *Duddingtonia flagrans* und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* untersucht. Bioinformatische Analysen des Genoms haben ergeben, dass das Sekretom des NFPs 249 SSPs beinhaltet. Der Virulenzfaktor-Kandidat CyrA (*cysteine rich protein A*) ist eines dieser SSPs und wurde charakterisiert, um seine Rolle während der Attacke aufzuklären. Das sekretierte Protein ist außerdem eines der 170 cysteinreichen Proteinen und wurde bioinformatisch als putativer Effektor vorhergesagt. Die Induktion der Genexpression von *cyrA* in den Fallen wurde mit Hilfe einer qRT-PCR-Analyse und einem Promotor-Reporterassay gezeigt. Die Lokalisation mit fluoreszenten Proteinen ergab, dass CyrA in dynamischen, vesikelartigen Strukturen in den Fallen lokalisiert und hier an der Innenseite akkumuliert. Nach der Penetration lokalisierte das Protein im Infektionsbulbus, wo es vermutlich sekretiert wird. Besonderheiten des Sekretionswegs in den Fallen wurden durch die Fusion von GFP mit verschiedenen Signalpeptiden deutlich, die fast alle zur Lokalisation in Vesikeln in den Fallen führten, während im vegetativen Myzel keine Vesikel zu beobachten waren. Durch die Deletion des zu *Saccharomyces cerevisiae* *exo70* orthologen Gens *exoA*, einer Komponente



des Exocyst-Komplexes, wurde außerdem gezeigt, dass die Akkumulation von CyrA im Infektionsbulbus von diesem Proteinkomplex abhängig ist. Das *cyrA* Gen wurde mittels homologer Rekombination deletiert und Langzeitbeobachtungen des Infektionsprozess zeigten eine verringerte Virulenz der Mutante, die einen längeren Zeitraum für die Paralyse der Nematoden benötigte. Die heterologe Expression von *cyrA* in *C. elegans* führte zu einer verringerten Lebenszeit der Nematoden und gab Hinweise auf eine mögliche Rolle der *C. elegans* Coelomocyten während der Interaktion.

Im Laufe dieser Arbeit wurde CyrA als Virulenzfaktor von *D. flagrans* identifiziert, der für die volle Virulenz des Pilzes benötigt wird. Es wurde die Hypothese bestätigt, dass SSPs eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen NFP und Nematoden spielen. Außerdem wurden wichtige Aspekte der Zellbiologie hinter der Sekretion von Virulenzfaktoren Nematoden-fangender Pilze beleuchtet und erste Hinweise auf eine Rolle der Coelomocyten bei der Immunantwort von *C. elegans* erlangt. Diese Arbeit erlaubt einen ersten Einblick in das bisher noch weitestgehend unerforschte Feld der Analyse von Virulenzfaktoren Nematoden-fangender Pilze.

## Abstract

Nematode-trapping fungi (NTF) are a fascinating group of carnivorous microorganisms. In a low-nutrient environment, they are able to switch from saprotrophic growth to a predatory lifestyle. This switch is indicated by the formation of highly specialized trapping structures and the secretion of numerous signaling molecules and low molecular compounds. The traps are formed upon sensing of nematode-specific ascarosides. The predators lure their prey into the traps by emitting attractive olfactory signals. This is followed by secretion of a full arsenal of secreted molecules to enable colonization of the nematodes by the fungi. Initially, mostly lytic enzymes are necessary for this. Since the capturing process of the predatory fungi is relatively fast and no long-term interaction needs to be established, the question arises whether small, secreted proteins also play a role in addition to the lytic enzymes. These virulence factors and effector proteins have been described in many animal- and plant pathogenic fungi and bacteria. Since nematodes activate defense mechanisms when in contact with traps, such virulence factors could also be important in overcoming nematode strategies for NTF.

In this work, the interaction between the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* and the nematode *Caenorhabditis elegans* was analyzed. Bioinformatic analyses of the genome have revealed that the *D. flagrans* secretome contains 249 SSPs. The virulence factor candidate CyrA (cysteine rich protein A) is one of these SSPs and was characterized to elucidate its role during attack. The secreted protein is also one of the 170 cysteine rich proteins and was bioinformatically predicted to be a putative effector. Induction of the gene expression of *cyrA* in the traps was demonstrated by qRT-PCR analysis and a promoter-reporter-assay. Localization analyses with fluorescent proteins revealed that CyrA localized in dynamic vesicle-like structures in the traps where it accumulated on the inner surface. After penetration, the protein localized in the infection bulb, where it is presumably secreted. Peculiarities of the secretory pathway in the traps became evident from the fusion of GFP with various signal peptides, almost all of which led to localization in vesicles in the traps, whereas no vesicles were observed in the vegetative mycelium. Deletion of the *exoA* gene orthologous to *exo70*, a component of the Exocyst-complex, further demonstrated that accumulation of CyrA in the infection bulb was dependent on this protein complex. The *cyrA* gene was deleted by homologous recombination and long-term observations of

the infection process showed reduced virulence of the mutant as indicated by a prolonged time to paralysis. Heterologous expression of *cyrA* in *C. elegans* resulted a decrease of nematode lifespan and provided evidence for a possible role of *C. elegans* coelomocytes during the interaction.

In this work, *CyrA* was identified as a virulence factor of *D. flagrans* that is required for full virulence of the fungus. The hypothesis that SSPs play an important role in the interaction between NFP and nematodes was confirmed. In addition, important aspects of the cell biology behind the secretion of virulence factors of nematode-trapping fungi were elucidated and first evidence for a role of coelomocytes in the immune response of *C. elegans* was obtained. This work allows a first glance into the still largely unexplored field of virulence factor analysis in nematode-trapping fungi.

# 1 Einleitung

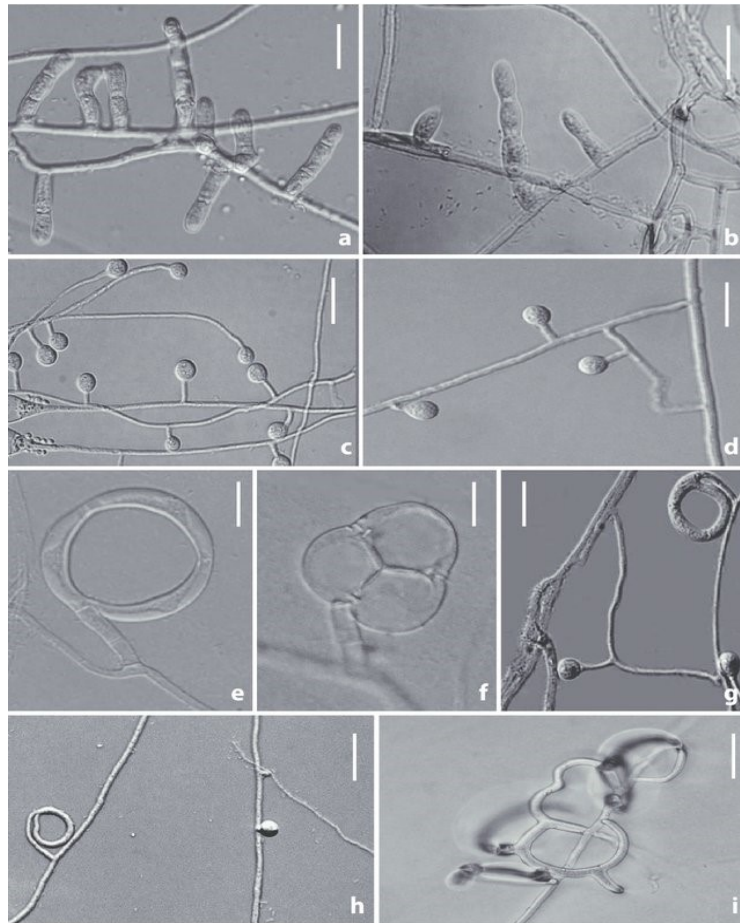
Nematoden-fangende Pilze (NFP) sind fleischfressende Mikroorganismen, die mit Hilfe ausgeklügelter Fangstrukturen Nematoden fangen und verdauen können. Die meisten Pilze dieser vielseitigen Gruppe können saprotroph leben und in Anwesenheit von Nematoden zu einem räuberischen Lebensstil übergehen, während andere obligatorische Pathogene sind.

Während viel über die Wirt-Pathogen-Interaktion pilzlicher Pflanzenpathogene und vermehrt auch über entomopathogene Pilze bekannt ist, ist die Interaktion zwischen NFP und ihrer Beute noch weitestgehend unerforscht. In Anbetracht ihrer mehrere Millionen Jahre zurückgehenden Ko-Evolution mit den Nematoden, der speziellen Morphologie und Zellbiologie der Pilze und der Bedeutung des Nematoden *Ceanorhabditis elegans* als Modellorganismus für zahlreiche menschliche Krankheiten, birgt diese Interaktion jedoch ein enormes Forschungspotential.

Nematoden-fangende Pilze haben sich bereits früh durch das Fangen von Nematoden als zusätzliche Stickstoffquelle einen kompetitiven Vorteil gegenüber rein saprotroph lebenden Pilzen verschafft (Jansson und Poinar JR 1986). Es handelt sich bei ihrem Vorkommen vermutlich um eine evolutionäre Anpassung cellulolytischer- und ligninabbauender Pilze, die in einer stickstoffarmen Umgebung auskommen mussten (Barron 2003). Das Vorkommen von Nematoden wurde anhand von 500 bis 600 Millionen Jahre alten Fossilienfunden datiert, während etwa 100 Millionen Jahre alte Bernsteinfossilien Nematoden-fangender Pilze gefunden wurden (Schmidt et al. 2007; van Megen et al. 2009). Der karnivore Lebensstil der Mikroorganismen hat sich dabei vermutlich unabhängig durch konvergente Evolution entwickelt (Yang et al. 2007).

Heute sind NFP in zahlreichen Ökosystemen verbreitet. Anhand ihres Infektionsmechanismus können sie in vier Gruppen eingeteilt werden: Nematoden-fangende Pilze, welche spezialisierte Hyphenstrukturen ausbilden; endoparasitäre Pilze; opportunistische nematophage Pilze und toxinproduzierende Pilze (Liu et al. 2009; A. Swe et al. 2011; Ke Qin Zhang und Kevin D. Hyde 2014). Aus morphologischer und zellbiologischer Sicht besonders interessant ist hierbei die Gruppe der Nematoden-fangenden Pilze, da die Bildung der Infektionsstrukturen eine große morphologische Veränderung darstellt (Meerupati Tejashwari et al. 2013). Hier können fünf Gruppen unterschieden werden: klebrige Säulen, adhäsive Netzwerke,

klebrige Fangknoten, kontraktile und nichtkontraktile Ringe (Abbildung 1) (L. Kaempfe 1997; Yang et al. 2007).



**Abbildung 1: Verschiedene Fallenmorphologien Nematoden-fangender Pilze.** (A, B) Adhäsive Säulen, (C, D) Adhäsive Knoten, (E, F) Kontraktile Ringe, (G, H) Adhäsive Knoten und nicht-kontraktile Ringe, (I) Adhäsive Netzwerke. Maßstabsbalken = 10 µm (Li et al. 2015).

### 1.1 Lebenszyklus und Fallenbildung

In einer nährstoffreichen Umgebung leben Nematoden-fangende Pilze saprotroph. Bei Nährstoffmangel sind sie in der Lage zu einem parasitären Lebensstil überzugehen (Pramer 1964; Birgit Nordbring-Hertz et al. 2011). Dieser Wechsel bedarf biotischer und abiotischer Stimuli und die Ausbildung der Fallen stellt den wichtigsten Indikator für den Wechsel dar (Birgit Nordbring-Hertz und Margaretha Stalhammar-Carlemalm 1978; Yang et al. 2011a). Der direkte Kontakt mit den Nematoden und eine nährstoffarme Umgebung sind die Voraussetzungen für den Wechsel zum parasitären Lebensstil (Anders Tunlid et al. 1992).

Nematoden werden zunächst von den Fallenstrukturen angezogen und dann abhängig vom Fangmechanismus gefangen. Dabei kann es sich beispielsweise um einen aktiven Mechanismus handeln, wie er bei kontraktiven Ringfallen zu beobachten ist. Diese Fallen bestehen aus drei Zellen, in denen bei Kontakt mit den Nematoden eine Signalkaskade aktiviert wird, die wahrscheinlich zu einem Wassereinstrom aufgrund einer Akkumulation von Glycerin und somit zum aktiven Zusammenziehen der Fallen führt (Chen et al. 2001; Muller 1958). Bei klebrigen Fallen, die beispielsweise mit extrazellulären Polymeren beschichtet sind, kommt es zur Adhäsion der Würmer (Wang et al. 2015; Tunlid und Jansson 1991; Tunlid et al. 1991). Von der Adhäsion bis zur Penetration dauert es, abhängig von der Pilz- bzw. Nematoden Spezies, nur etwa ein bis vier Stunden (Veenhuis et al. 1985a). Hierbei wird die Kutikula durch mechanischen Druck und lytische Enzyme penetriert, wobei eine rundliche Penetrationsstruktur ausgebildet wird. Nun wird der Nematode paralytisch und trophische Hyphen durchwachsen den Nematodenkörper und absorbieren die Nährstoffe durch Hydrolyse der Zellen, sodass der Wirt innerhalb weniger Stunden komplett verdaut wird (Yang et al. 2011a; Dijksterhuis et al. 1994).

Die molekularen Grundlagen der Fallenbildung sind noch weitestgehend unerforscht, mittels Gendelektionen konnten jedoch bereits einige involvierte Faktoren identifiziert werden. *Arthrobotrys oligospora* gilt bei der Forschung an NFP als Modellorganismus, wodurch er Gegenstand der meisten Studien über die Ausbildung dreidimensionaler Fallenstrukturen ist (Niu und Zhang 2011). In einer Vorwärts-Genetik Studie wurden mittels Mutagenese 15 *A. oligospora* Mutanten mit Defekten in der Fallenbildung identifiziert. *Gene Ontology*-Vorhersagen zeigten Mutationen in drei Genen, die jeweils für Proteine mit einer Proteinkinase-Domäne, einer YAP-binde/ALF4/Glomulin Domäne und einer Domäne-unbekannter-Funktion (*domain of unknown function*, DUF) kodieren (Huang et al. 2020). Die Deletion einer NADPH Oxidase in *A. oligospora* führte zu einer Reduktion der Fallenbildung, was auf eine wichtige Rolle der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) hindeutet (Li et al. 2017). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Deletion des Gens, welches für die einzige G-Protein-beta-Untereinheit kodiert, die Fallenbildung enorm reduziert (Yang et al. 2020). Dieses Protein ist ein Homolog von *S. cerevisiae* STE4 und fungiert *upstream* der FUS3/KSS1 MAPK Signalkaskade. Eine anschließende Studie konnte zeigen, dass die Wirtswahrnehmung und -antwort von *A. oligospora* vom MAPK *pheromone response pathway* gesteuert wird (Chen et al. 2021). Hierbei stellen die

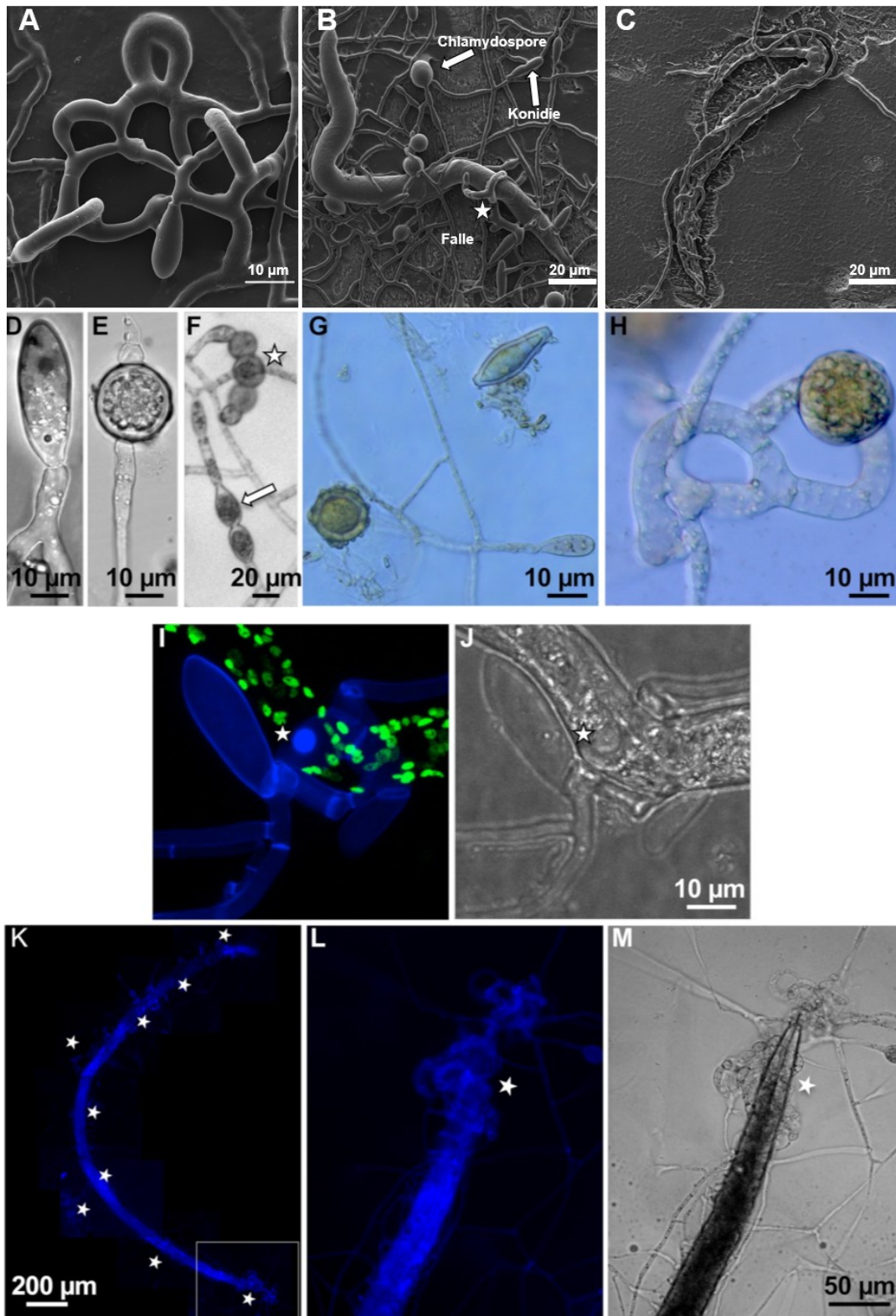
MAPK FUS3, die *upstream* Kinase STE7 und der Transkriptionsfaktor STE12 die Hauptkomponenten der Regulation der Fallenmorphogenese und der Wahrnehmung der nematodenspezifischen Signalmoleküle dar. Weitere Proteine, deren Rolle bei der Fallenbildung und Pathogenität von *A. oligospora* gezeigt werden konnte, sind kleine GTPasen der ADP-Ribosylierungsfaktor (Arf)-Familie und ihre aktivierenden Proteine (Arf-GAPs), die Protein Kinase Ime2 (*inducer of meiosis 2*), die Velvet Proteine VosA und VelB, sowie für den *high osmolarity glycerol* (HOG) Signalweg (Ma et al. 2020; Xie et al. 2019; Zhang et al. 2019; Kuo et al. 2020).

## 1.2 Anwendung von *Duddingtonia flagrans* in der Landwirtschaft

Neben ihrer faszinierenden Morphologie sind Nematoden-fangende Pilze aufgrund ihres großen Potentials als biologische Schädlingsbekämpfung relevant. Das diverse Phylum der Nematoden ist eine der am weitesten verbreiteten Tiergruppen der Erde, wobei eine Schätzung von über einer Millionen Arten ausgeht (Blaxter 2003). Für Menschen spielen vor allem tier- und pflanzenpathogene Nematoden eine Rolle, da diese große Schäden in der Landwirtschaft verursachen. Schätzungen zufolge handelt es sich dabei global um Kosten von etwa 80 Milliarden US Dollar und 8 – 15 % der weltweiten Ernteauffälle werden auf pathogene Nematoden zurückgeführt (Karin Kiontke und David H.A. Fitch 2013)

Da chemische Mittel wie 1,2-dibrom-3-chloropropan und Aldicarb (Bayer CropSciences) zur Bekämpfung der Schädlinge aufgrund ihrer potenziellen Gesundheits- und Umweltbelastung nicht mehr im Einsatz sind, werden bisher biologische Methoden wie der Wechsel der Fruchtfolge und Heißdampfbehandlung eingesetzt (Thrupp 1991; Erickson 2010; Kenneth R. Barker und Stephen R. Koenning 1998; J. Bridge 1996). Hier können zukünftig NFP als natürliche Feinde tier- und pflanzenparasitärer Nematoden eine Rolle spielen (Siddiqui und Mahmood 1996; P. Jatala 1986; Mankau 1980).

Neben der Bedrohung von Nutzpflanzen wird auch die Tierzucht von parasitären Nematoden bedroht. *D. flagrans* Sporen wurden in Feldversuchen bereits erfolgreich in Form von Pellets an Rinder und Schafe verfüttert und konnten hier die Wiederinfektionsrate und damit die allgemeine Schädlingsbelastung der Nutztiere senken (José Ángel Hernández et al. 2016; M. Eysker et al. 2006).



**Abbildung 2: Der NFP *D. flagrans* bildet dreidimensionale Fallennetzwerke und Chlamydosporen aus.** (A) Ein dreidimensionales Fallennetzwerk von *D. flagrans*. (B) *C. elegans* in einer *D. flagrans* Falle, Pfeile markieren Chlamydosporen, vegetative Sporen und Fallen. (C) Hyphenwachstum in einem vollständig verdauten Nematoden. (D) Asexuelle Spore. (E) Chlamydospore. (F) Chlamydosporenbildung aus vegetativen Zellen und Fallen. (G, H) Färbung glykogenreicher Chlamydosporen mit Lugolscher Lösung. (I, J) Akkumulation von Chitin (Stern) an der Infektionsstelle nach Färbung der Zellwand mit Calcofluor white (CFW). Die Zellkerne von *C. elegans* sind mit GFP markiert. (K) *Xiphinema index* kann in multiplen Fallennetzwerken (Sterne) gefangen und verdaut werden. (L) Vergrößerung der Kopfreion der gefangenen Nematoden aus (K). Verändert nach Youssar et al. (2019).



Aufgrund der Fähigkeit der Chlamydosporenbildung ist *D. flagrans* besonders gut für die Anwendung in der Landwirtschaft geeignet (Abbildung 2 E). Chlamydosporen sind Überdauerungsformen mit einer dicken Zellwand, die in der Lage sind nach der Passage durch den Gastrointestinaltrakt und nach der Ausscheidung in den Faeces wieder auszukeimen (Soder und La Holden 2005; Braga et al. 2015). Hier kann der Pilz den Infektionszyklus der Nematoden unterbrechen, da die Larven ebenfalls im Kot schlüpfen und sich dort zu L3-Larven entwickeln. In diesem Larvenstadium können die Nematoden nun witterungsabhängig mehrere Monate auf der Weide überleben und erneut von den Tieren aufgenommen werden (Molento et al. 2016). NFP können als natürliche Schädlingsbekämpfung helfen, diesen Kreislauf der Kontamination des Weidelandes zu unterbrechen.

Experimente mit dem obligaten Pflanzenpathogen *Xiphinema index* zeigten, dass *D. flagrans* auch in der Lage ist, Nematoden zu fangen die sehr viel größer sind als *C. elegans* (Abbildung 2 K, L, M). Dies verdeutlicht das Potenzial des NFP bei der biologischen Schädlingsbekämpfung pflanzenpathogener Nematoden (Youssar et al. 2019).

### 1.3 Interspezies Kommunikation zwischen NFP und Nematoden

Die Ko-evolution von NFP und Nematoden hat eine ausgeprägte Interspezies-Kommunikation der beiden Organismen hervorgebracht. Für die Pilze stellt die Ausbildung der Fallen einen enormen Energiebedarf dar, sodass diese die Nematoden in ihrer Umgebung zunächst wahrnehmen müssen, bevor sie den parasitären Lebenszyklus und somit die Fallenbildung einleiten (Pramer und Stoll 1959). Bereits in den 1950er Jahren wurde beobachtet, dass Nematodenextrakte und Kulturfiltrate, sogenannte „Nemine“, die Fallenbildung bestimmter NFP induzieren konnten (Pramer und Stoll 1959; Lawton 1967, 1957). Auch einige Aminosäuren und Dipeptide, wie Phenylalanin-Valin können die Fallenbildung von *A. oligospora* induzieren (Nordbring-Hertz 1973). Evolutionsbiologisch betrachtet ist es naheliegend, dass es sich bei den nematodenspezifischen, falleninduzierenden Stoffen um Moleküle handelt, die essenziell für die Tiere sind, da diese sonst aufgrund des Selektionsdrucks verloren gegangen wären. So wurden Anfang der 2000er Ascaroside als Nematoden spezifische Signalmoleküle identifiziert, die als Sexualpheromone der Tiere fungieren

und weitgehend konserviert sind (Butcher et al. 2007; Choe et al. 2012a; Kaplan et al. 2011). Diese Ascaroside sind Glykolipide aus Desoxyzuckern (Ascarylose), die glykosidisch mit Fettsäuren verknüpft sind und zählen zu den Schlüsselsignalen für die Falleninduktion Nematoden-fangender Pilze. Die Potenz dieser Stoffe als Signalmoleküle für NFP konnte anhand der Fähigkeit der Falleninduktion chemisch-synthetisierter Ascaroside gezeigt werden (Hsueh et al. 2013; Choe et al. 2012a). Es sind über 100 Ascaroside mit unterschiedlichen Funktionen in der Literatur bekannt, wobei diese sich in ihrer Zusammensetzung, Synthese und Funktion in verschiedenen Nematoden Spezies unterscheiden (Choe et al. 2012b; Jeong et al. 2005). Hieraus resultiert auch die breite Wirtsspezifität der NFP, da die Empfänglichkeit für bestimmte Ascaroside vermutlich mit dem Profil des vom jeweiligen Pilz am häufigsten angetroffenen Wirts korreliert (Hsueh et al. 2013).

Da sich Nematoden schnell fortbewegen und Pilze sessile Organismen sind, bedarf es der Anziehung der Beute seitens der Pilze, um diese zu fangen. So wurden auch umgekehrt Stoffe identifiziert, die von den NFP ausgeschieden und von den Nematoden wahrgenommen werden. *A. oligospora* produziert die flüchtigen Stoffe Dimethyl-Disulfid (DMDS), 2-Methyl-1-Butanol (MB), 2,4-Dithiapentan (DTP), Methyl 3-Methyl-2-Butanoate (MMB) und S-Methyl Thioacetat (SMT), welche von den Nematoden über olfaktorische Neuronen durch multiple G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) wahrgenommen werden. Sie imitieren für die Würmer attraktive Sex- und Nahrungssignale und locken die Nematoden so zu den Fallen (Hsueh et al. 2017). Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass auch Sekundärmetabolite an der Kommunikation beteiligt sind (Yu et al. 2021, unter Begutachtung).

#### **1.4 Effektorproteine und Virulenzfaktoren pathogener Pilze**

Ein dynamisches Wettrennen zwischen Wirt und Pathogen macht ihre Interaktion zu einem hoch komplexen, ständig evolvierenden System. Pathogene sekretieren Effektorproteine und Virulenzfaktoren, um den Wirt zu ihrem Vorteil hin zu manipulieren und die Infektion zu begünstigen. In molekularen Studien wurden bereits über 60 pilzliche Effektorproteine verschiedener Spezies mit einem breiten Wirkspektrum identifiziert. Die bisher beschriebenen Proteine stellen nur die Spitze des Eisbergs dar und die Anzahl der identifizierten Virulenzfaktoren steigt mit der

zunehmenden Anzahl sequenzierter Pathogen-Genome und der Möglichkeit der bioinformatischen Vorhersage dieser Proteine immer weiter an (Sperschneider et al. 2015). Jedoch wird die Vorhersage von Effektorproteinen in Pilzen durch einen Mangel an bekannten konservierten Proteineigenschaften und die geringe Anzahl charakterisierter Effektoren in individuellen Spezies erschwert. Die Vorhersage bakterieller Effektoren erfolgt einfacher mittels *machine learning*, da diese häufig über pathogeneigene Translokationsmechanismen, wie dem Typ III Sekretionssystem übertragen werden. Auch in Oomyceten sind konservierte Sequenzmotive, die für die Vorhersage genutzt werden können, an der Effektor-Translokation beteiligt (Sperschneider et al. 2015; Djamei et al. 2011b; Ioannis Stergiopoulos und Pierre de Wit 2009).

Das bekannteste Beispiel ist das RXLR-Motiv, das in Effektoren diverser *Phytophthora*-Spezies charakterisiert wurde. Dieses Motiv spielt eine große Rolle bei der Effektortranslokation, der Virulenz und der Erkennung durch den Wirt nach dem Gen-für-Gen Konzept (Whisson et al. 2007; Anderson et al. 2015).

Stattdessen können pilzliche Effektoren bisher nur ungenau aufgrund ihrer Lokalisation, Größe und dem Aminosäuren Gehalt vorhergesagt werden. Neuere *machine learning*-Methoden erlauben genauere funktionelle Analysen der Proteine, sind jedoch bisher stark auf pflanzenpathogene Pilze beschränkt und können noch nicht zuverlässig für Tier- und Insektenpathogene adaptiert werden (Sperschneider et al. 2016).

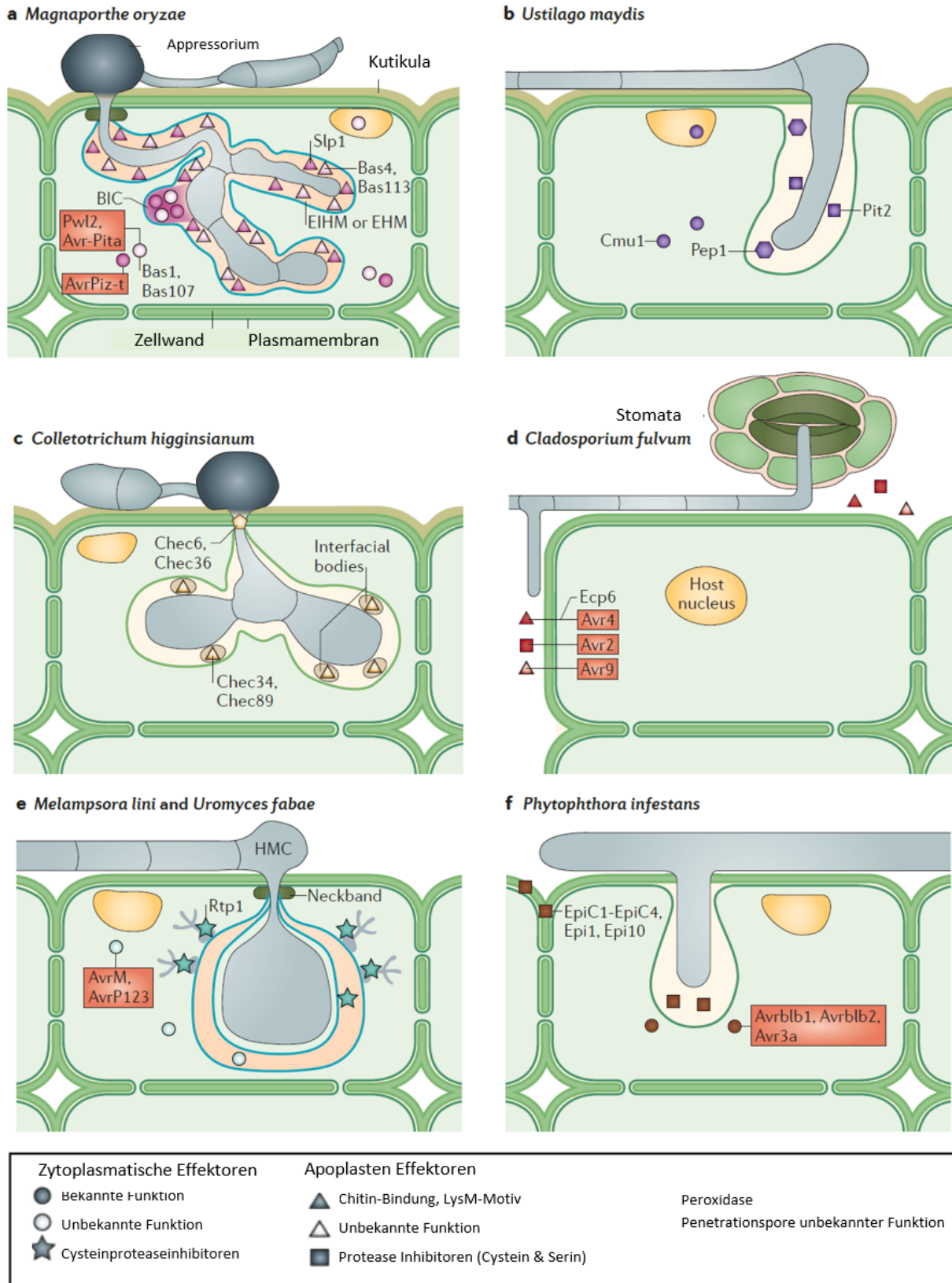
Häufig handelt es sich bei diesen von Pathogenen sekretierten Virulenzfaktoren um kleine, sekretierte Proteine (*small secreted proteins*; SSPs), die aus weniger als 300 Aminosäuren bestehen (Kim et al. 2016). Im nematophagen Pilz *Monacrosporium haptotylum* wurde die differenzielle Expression der Gene von 36 solcher SSPs während der Infektion gezeigt. Man geht davon aus, dass diese im Laufe der Evolution durch Tandem-Duplikationen gefolgt von rapiden Veränderungen anhand wiederholungsinduzierter Punktmutationen (*repeat-induced point mutations*; RIP) entstanden sind (Meerupati Tejashwari et al. 2013).

Konservierte Aminosäuremotive sind in filamentösen Pilzen bisher nur selten beschrieben, kommen jedoch bei den Crinkler-Effektoren (CRN; *crinkling and necrosis*) aller bisher identifizierten, pflanzenpathogenen Oomycetenspezies, sowie im Endomykorrhiza betreibenden Pilz *Rhizophagus irregularis* vor (Morgan und Kamoun 2007; Stam et al. 2013; Lin et al. 2014; William C. Sharpee und Ralph A. Dean 2016).

Die molekularen Funktionsweisen von Effektoren und Virulenzfaktoren sind vielfältig (Abbildung 3), sie können die Zellbiologie des Wirts verändern, Stress- und Verteidigungsmechanismen inhibieren, den Metabolismus verändern oder mit Immun-Signalkaskaden interferieren (Lanver et al. 2017). Die *Ustilago maydis* Effektoren Pit2 und Pep1 inhibieren beide wichtige pflanzliche Abwehrreaktionen des Wirts. Während Pit2 Cystein-Proteasen der Pflanze inhibiert, kann Pep1 die Pflanzenperoxidase POX12 blockieren, welche für die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Apoplasten wichtig ist (Doehlemann et al. 2009; Mueller et al. 2013).

Andere Effektorproteine bewahren die pilzlichen Hyphen vor der Erkennung durch den Wirt, wie beispielsweise der LysM-Domänen Effektor Ecp6 von *Cladosporium fulvum* (Bolton et al. 2008). Da Chitin als Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (*microbe associated molecular pattern*; MAMP) von Zelloberflächenrezeptoren des Wirts erkannt wird und daraufhin eine Immunreaktion auslöst, haben pilzliche Pathogene solche Effektoren entwickelt, um dieser Reaktion zu entgehen. Dabei können diese Proteine auch eine direkte schützende Funktion einnehmen, wie der *C. fulvum* Effektor Avr4, der die Hyphen vor der hydrolytischen Aktivität von Tomaten Chitinasen schützt (van den Burg et al. 2006).

Ein erster wichtiger Anhaltspunkt bei der Suche nach Virulenzfaktoren ist die differenzielle Genexpression während der Interaktion, bei der die Expression dieser Gene in der Regel stark reguliert ist (Sonah et al. 2016). Da in Nematoden-fangenden Pilzen bisher keine Effektoren oder Virulenzfaktoren charakterisiert wurden, stellen Genom- und Transkriptomanalysen dieser Pilze während der Infektion ihrer Wirte den wichtigsten Anhaltspunkt für die genutzten Strategien dar (Andersson et al. 2014; Ahrén et al. 2005). Diese Mechanismen können sich in Abhängigkeit des Infektionsmechanismus zwischen den unterschiedlichen nematophagen Pilzen unterscheiden. Dies wurde in einer vergleichenden Transkriptomanalyse des Knotenformenden Pilzes *M. haptotylum* und dem Fallennetzwerke ausbildenden *A. oligospora* deutlich. Zunächst wurde gezeigt, dass wie erwartet zahlreiche Enzyme, wie Subtilisin-ähnliche Peptidasen, Proteasen und Glykosidasen induziert werden. Proteine mit Pfam-Domänen (*protein families*), die mit bekannten pilzlichen Virulenzfaktoren in Verbindung gebracht werden, wie die CFEM- oder DUF-Domäne, waren ebenfalls hoch reguliert. Insbesondere kleine, sekretierte Proteine waren differenziell exprimiert und machten 64 % der infektionsrelevanten Gene aus, wobei hier fast die Hälfte der SSPs zusätzlich cysteinreich waren (Meerupati et al. 2013).



**Abbildung 3: Sekretierte Effektoren verschiedener Pflanzenpathogene.** Intrazelluläre biotrophische Hyphen liegen durch eine Plasmamembran (extrahaustorische Membran (EHM) oder extrainvasive Hyphenemembran (EIHM)) getrennt vom pflanzlichen Zytoplasma vor. Die dazwischenliegende Matrix kann im Pflanzenapoplasten liegen oder als separates Kompartiment durch eine bandartige Struktur abgetrennt sein. Effektoren in roten Boxen haben eine avirulente Aktivität. **(A)** *Magnaporthe oryzae* dringt über ein melanisiertes Appressorium in die Wirtszellen ein. Die Effektoren Bas4, Bas113 und das LysM-Protein Slp1 akkumulieren im Apoplasten. **(B)** *U. maydis* dringt über ein nicht-melanisiertes

Appressorium in die Wirtszelle ein. Die Matrix um die intrazellulären Hyphen hängt mit dem Apoplasten zusammen. Pep1 schützt die Hyphe im Apoplasten vor ROS, Pit2 inhibiert hier die Cysteinproteasen der Pflanze. Der Cytoplasmatische Effektor Cmu1 ist eine Chorismatmutase. **(C)** *Colletotrichum higginsianum* dringt über ein melanisiertes Appressorium in die Zellen ein und die hyphenumgebende Matrix hängt mit dem Apoplasten zusammen. Die Effektorkandidaten CheCs liegen im Apoplasten vor. **(D)** *Cladosporium fulvum* dringt über Stomata in die Blattzelle ein und wächst extrazellulär weiter. Der chitinbindende LysM Effektor Ecp6 wird sekretiert. **(E)** *Melampsora lini* und *Uromyces fabae* dringen über Stomata mit Hilfe nicht-melanisierter Appressorien ein. Intrazelluläre Hyphen bilden haustorische Mutterzellen (*haustorial mother cells*; HMCs) welche Haustorien in den Wirts-Mesophylzellen bilden. Der Cysteinprotease Inhibitor Rtp1 wird in das Wirts-Zytoplasma sekretiert. **(F)** *Phytophthora infestans* dringt über nicht melanisierte Appressorien in die Zellen ein und bildet fingerartige Haustorien aus, die von der mit dem Apoplasten verbundenen EHM umgeben sind. Die Protease Inhibitoren EpiC1 und EpiC2 liegen im Apoplasten vor, Avrblb2 ist ein zytoplasmatischer RXLR Effektor. Verändert nach Giraldo und Valent (2013).

Eine Analyse mit den Transkriptomdaten der drei Spezies *Monacrosporium cionopagum*, *Arthrobotrys dactyloides* und *A. oligospora* führte eine BLAST-Suche der 500 am höchsten regulierten Transkripte in der *pathogen-host interaction protein database* (PHI-base) durch. Diese Datenbank enthält experimentell nachgewiesene Virulenz-, Pathogenitäts- und Effektorgene von Pilzen, Oomyceten und Bakterienpathogenen. Hierbei konnten 97 Gene identifiziert werden, unter anderem Orthologe der Gas1 und Gas2 kodierenden Gene von *Magnaporthe grisea*, welche eine DUF3129 Domäne enthalten. Auch *Candida albicans* RBT4 orthologe Proteine, mit CAP-Domäne (*cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5 and pathogenesis-related 1 protein*) wurden bei der Studie gefunden (Andersson et al. 2014).

Außerdem können auch Sekundärmetabolite an der Infektion beteiligt sein. Bisher wurden 179 Stoffe mit nematizider Wirkung in nematophagen Pilzen identifiziert. Von den für die Produktion dieser Metabolite benötigten Enzyme, den Polyketidsynthasen (PKS) und nicht-ribosomalen Peptidsynthasen (NRPS), sind fünf PKS und sieben NRPS Cluster in *A. oligospora* zu finden und jeweils drei in *D. flagrans* (Yang et al. 2011a; Youssar et al. 2019).

Eine weitere Studie konnte mittels cDNA Microarrays die differenzielle Genexpression während verschiedener Stadien der Infektion (1 h = Adhäsion, 4 h = Penetration, 16 h = Verdau) von *C. elegans* mit *M. haptotylum* nachvollziehen. Hier wurde gezeigt, dass nach 4 Stunden, wenn etwa 40 % der Nematoden paralysiert sind, ein Cluster aus 372 Genen reguliert wird, welches nicht in den anderen Phasen der Infektion verändert ist. Die meisten Gene (928) wurden bereits nach einer Stunde nach Beginn der Infektion differenziell reguliert, wobei etwa die gleiche Anzahl an Genen hoch- wie runter reguliert wurde (Fekete et al. 2008). In dieser, als auch in den anderen Transkriptomstudien wurde außerdem gezeigt, dass die meisten der differenziell

exprimierten Gene (79 % in *M. haptotylum*) keine signifikante Ähnlichkeit zu Genen und Proteinen anderer Organismen aufweisen. Darunter befanden sich einige *non-coding* RNAs (ncRNAs) sowie zahlreiche speziesspezifische SSPs (Fekete et al. 2008; Ahrén et al. 2005; Andersson et al. 2014).

### 1.5 Sekretion von Effektorproteinen und Virulenzfaktoren

Ein Hauptkriterium für die Identifikation eines Virulenzfaktors oder Effektorproteins ist die Sekretion, die in den meisten Fällen anhand des N-terminalen Signalpeptids vorhergesagt werden kann. Diese Signalpeptide regulieren in Prokaryoten und Eukaryoten den Eintritt fast aller Proteine in den Sekretionsweg (Gierasch 1989; Heijne 1990; Rapoport 1992). Strukturell gesehen handelt es sich um positiv geladene, N-terminale Regionen, gefolgt von einer hydrophoben h-Region und einer neutralen, aber polaren c-Region. Signalpeptide werden während der Translokation durch die Membran an einer Schnittstelle prozessiert, wobei die Aminosäuren an den Positionen -3 und -1 (relativ zur Schnittstelle) klein und neutral sein müssen, um korrekt prozessiert zu werden (Heijne 1983, 1985). Bioinformatische Werkzeuge, wie SignalP, verwenden kombinierte neurale Netzwerke für die Vorhersage von Signalpeptiden und ihren Schnittstellen und erlauben so die *in silico* Generation von Sekretomen (Nielsen et al. 1997).

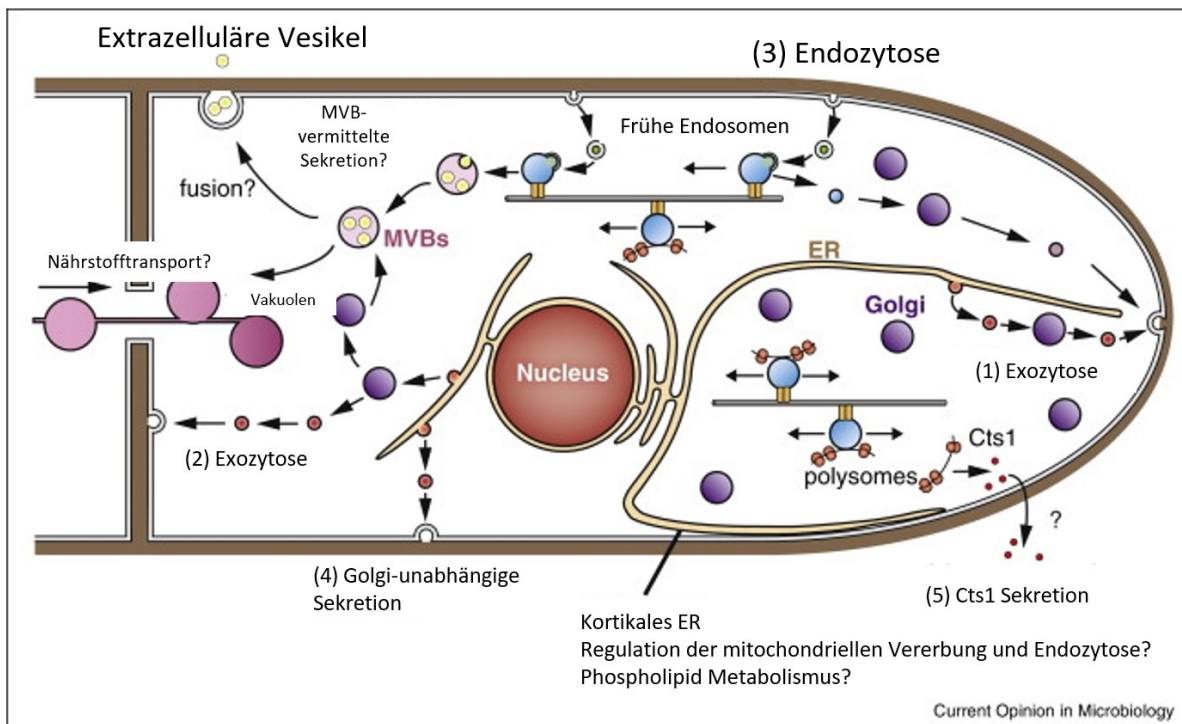
Sekretierte Proteine werden zunächst in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transloziert, wo sie korrekt gefaltet und glykosyliert werden (Abbildung 4). Danach führt der Sekretionsweg in der Regel zum Golgi-Komplex, wo die Proteine weiteren post-translationalen Modifikationen unterzogen werden. Dieser Transport verläuft über Vesikel, die in einer hochgradig organisierten Weise von den Donor-Membranen abgeschnürt werden und mit ihren Zielmembranen fusionieren. Im trans-Golgi Netzwerk (TGN) werden die Proteine sortiert und in die endosomale Route, oder für die Sekretion zur Plasmamembran eingeordnet (Pantazopoulou 2016). Sekretorische Vesikel werden entlang von Aktinkabeln zu Membranfusionsstellen an der Membran transportiert (Finger et al. 1998). Die Membranfusion ist hauptsächlich abhängig von drei Proteinklassen, den *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors* (SNAREs), Sec1 und Rab-Proteinen (Aalto et al. 1991; Rothman 1994; Rothman und Wieland 1996). Die Zielfindung der Membranfusionsstelle wird als Membran „*Tethering*“ bezeichnet und die dafür benötigten

Membraneverankerungskomplexe werden bei allen Transportschritten, von ER zu Golgi, intra-Golgi und bei der Endo- und Exozytose benötigt. Der in *S. cerevisiae* charakterisierte Exocyst-Komplex besteht aus acht miteinander interagierenden Proteinen und spielt bei der Regulation der Zielmembranfindung auch in filamentösen Pilzen eine große Rolle (TerBush et al. 1996; Hazuka et al. 1997; Hsu et al. 1996; Kee et al. 1997). Er steuert das Andocken der sekretorischen Vesikel an die Ziel-Membran vor dem SNARE-vermittelten Membranfusionsevent (Chen et al. 2015).

Die Sekretion von pathogenitätsrelevanten Proteinen und die Präsentation solcher Proteine auf der Zelloberfläche, ist ein wichtiger Aspekt der Wirt-Pathogen-Interaktion. Dabei stellt die Zelloberfläche das Schlachtfeld zwischen den beiden beteiligten Organismen dar, da hier der Großteil der Infektionsevents stattfinden: die gegenseitige Erkennung, die Adhäsion, Penetration, der Abbau von Wirtssubstraten und die Sekretion von Virulenzfaktoren (Yi und Valent 2013).

Während der generelle Sekretionsweg in zahlreichen Organismen und filamentösen Pilzen weitestgehend gut charakterisiert ist, sind bei der Sekretion und Translokation von Effektorproteinen und Virulenzfaktoren noch einige Fragen offen. Immer mehr aktuelle Studien entdecken alternative Sekretionsmechanismen, die nicht dem kanonischen Sekretionsweg von ER zur Plasmamembran via Golgi folgen (Shoji et al. 2014). In *M. oryzae* wurde gezeigt, dass zwei verschiedene Sekretionsmechanismen für die Sekretion von Effektoren während der Infektion vorhanden sind. Hier konnte ein Unterschied zwischen zytoplasmatisch-lokalisierenden und extrazellulären Effektoren gezeigt werden. Während zytoplasmatische Effektoren, welche im *biotrophic interfacial complex* (BIC) lokalisieren, unkonventionell sekretiert werden, folgen extrazelluläre, apoplastische Effektoren dem konventionellen Sekretionsweg. Dieser unkonventionelle Sekretionsweg ist abhängig vom Exocyst-Komplex und wird durch die Behandlung mit Brefeldin A (BFA) nicht beeinflusst. Die konventionelle Sekretion wird durch BFA gestört, da dieses GTP-Austauschfaktoren für Arf-GTPasen (Arf-GEFs) inhibiert, welche für die Formation von Transportvesikeln benötigt werden (Peyroche et al. 1999; Arioka et al. 1991).





**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vesikeltransportwege filamentöser Pilze.** Das ER liegt als retikuläres Netzwerk und peripher-assoziiertes-kortikales-ER vor, welches möglicherweise eine Rolle im Metabolismus und bei der Regulierung intrazellulärer Vorgänge spielt. Der Golgi-Apparat akkumuliert zunehmend an der Hyphenspitze und seine Organisation ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Polarität. Fröhe Endosomen werden entlang der Mikrotubuli transportiert und transportieren Polysomen, um die gleichmäßige Verteilung der Ribosomen zu gewährleisten. Späte Endosomen/MVBs sind Vesikelstrukturen mit internen Vesikeln, welche möglicherweise eine Rolle bei der unkonventionellen Sekretion spielen. Vakuolen sind sphärische Organellen mit tubulären Elementen, welche Nährstoffe zwischen den Hyphenkompartimenten transportieren. Im konventionellen Sekretionsweg werden Frachten durch ER und Golgi zur Plasmamembran, entweder an der Hyphenspitze (1), subapikalen Regionen (nicht gezeigt), oder Septen (2) transportiert. Mittels Endozytose (3) werden Frachten in Endosomen von der Plasmamembran entweder zum Golgi-Apparat oder zu Vakuolen transportiert. Manche sekretierten Proteine werden durch das ER, aber Golgi unabhängig zur Plasmamembran transportiert (4). Die Endochitinase Cts1 ist ein Beispiel für unkonventionelle Sekretion und wird über einen noch unbekannten Sekretionsweg sekretiert, nachdem die entsprechende RNA von Endosomen transportiert wurde (5). Extrazelluläre Vesikel (EVs) können durch die Fusion von MVBs mit der Zellmembran sekretiert werden, so werden interne Vesikel in den extrazellulären Raum abgegeben (6). Verändert nach (Shoji et al. 2014)

Extrazelluläre Vesikel (EV) machen einen weiteren Mechanismus der unkonventionellen Sekretion aus. Sie bestehen aus Lipiddoppelschichten, sind 50-400 nm klein und geben ihren Inhalt nach Fusion mit der Membran in den extrazellulären Raum frei. Die molekularen Mechanismen der Sekretion über EVs sind noch nicht komplett geklärt, sie werden jedoch häufig mit Virulenz in Verbindung gebracht (Oliveira et al. 2013; Rodrigues et al. 2008). In *Cryptococcus neoformans* wurde gezeigt, dass EVs einen Großteil der Virulenzfaktoren enthalten und in den extrazellulären Raum freigeben. Sie werden als „Virulenz-Säcke“ bezeichnet, die eine

konzentrierte Ladung pilzlicher Produkte bei der Wirtszelle abliefern (Doyle und Wang 2019).

Die Vorhersage sekretierter Proteine wird durch die unkonventionelle Sekretion von Proteinen ohne Signalpeptid erschwert. So wird beispielsweise die *U. maydis* Endochitinase Cts1 ohne SP unabhängig von ER und Golgi sekretiert, wobei der unterliegende Mechanismus noch ungeklärt ist (Koepeke et al. 2011).

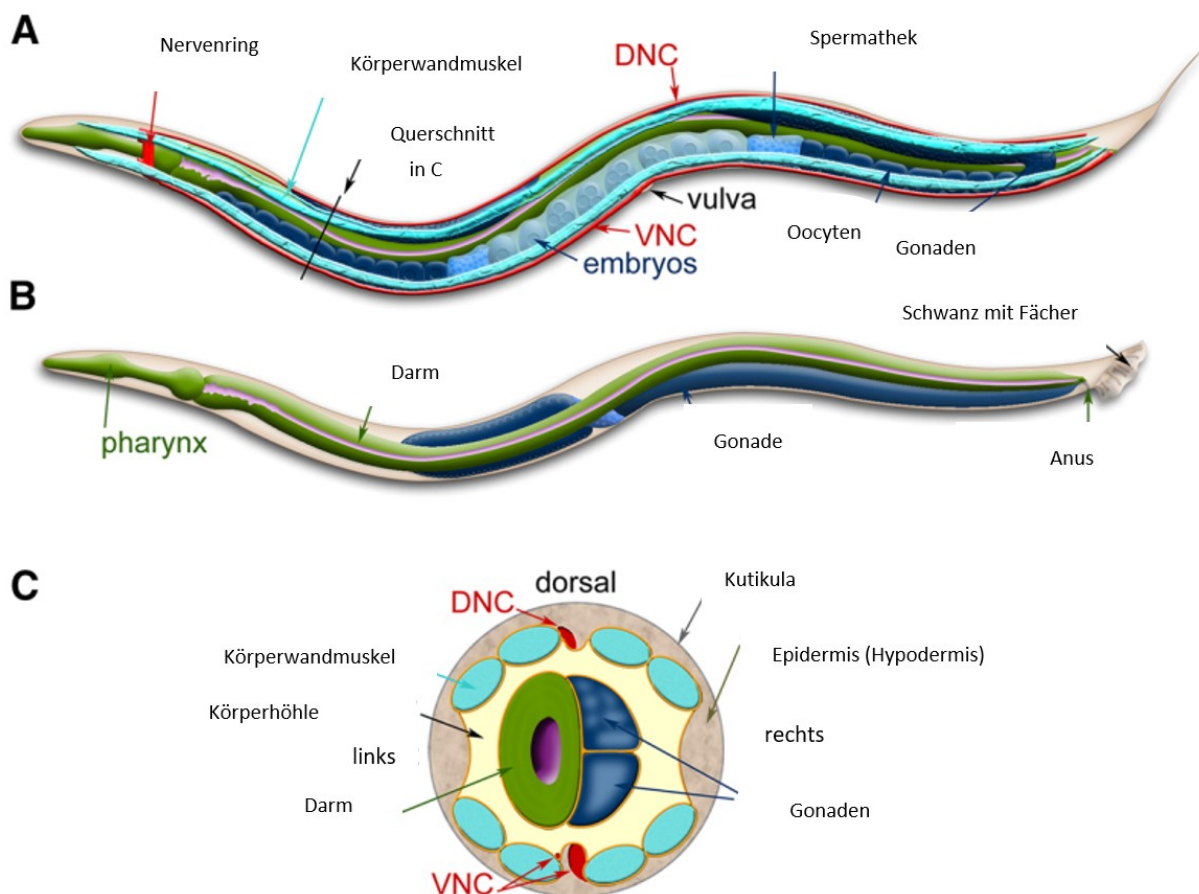
Auch die Translokation von Virulenzfaktoren pilzlicher Pathogene in Wirtszellen ist noch weitestgehend ungeklärt. Bakterielle Pathogene verwenden dafür gut charakterisierte Sekretionssysteme, wie das Typ III Sekretionssystem, welche Virulenzproteine mit Hilfe einer Nadelstruktur direkt in die Wirtszelle injizieren (Wagner et al. 2018). Ähnliche Mechanismen wurden in Pilzen jedoch noch nicht nachgewiesen. Eine aktuelle Studie konnte einen Proteinkomplex in *U. maydis* identifizieren, welcher an der Außenseite der pilzlichen Membran verankert ist und möglicherweise eine Rolle bei der Translokation von Effektorproteinen spielt (Ludwig et al. 2021).

Für den Nachweis der Translokation von Virulenzfaktoren in die Wirtszelle ist bis dato die Immunogoldfärbung Epitop-gelabelter Proteine die beste Methode (Djamei et al. 2011a; Lanver et al. 2017). Biochemische Assays für die Proteintranslokation basieren auf der *in vivo* Biotinylierung von Proteinen, die mit einem Avi-tag versehen sind. Diese werden von einer im Wirt exprimierten Biotinligase (BirA) biotinyliert und können dann mittels Streptavidin-Immunpräzipitation isoliert werden (Lo Presti et al. 2017).

## 1.6 Der Modellorganismus *C. elegans*

Der Fadenwurm *C. elegans* ist heute ein Modellorganismus für viele Forschungsbereiche, wie der prokaryotischen Genetik, dem Nervensystem und der Immunität. *C. elegans* zeichnet sich durch seinen schnellen Lebenszyklus, die Produktion von über 300 Nachkommen pro adultem Tier und die einfache Handhabung im Labor aus. Der kleine, freilebende Nematode kann weltweit in zahlreichen Nischen gefunden werden. Er entwickelt sich innerhalb von drei Tagen bei 25 °C, wobei er vier Larvenstadien durchläuft. Frisch geschlüpfte Würmer sind nur 0,25 Millimeter lang und adulte Tiere sind mit einem Millimeter für das bloße Auge sichtbar. Es liegen vor allem selbstbefruchtende Hermaphroditen vor, wobei die Population mit einer Frequenz von < 0,2 % auch männliche Tiere enthält. Die experimentelle Zugänglichkeit und die

Ähnlichkeit zellulärer und molekularer Prozesse zwischen *C. elegans* und anderen Tieren machen ihn zum optimalen Modellorganismus für viele Bereiche (Balla und Troemel 2013; Sato et al. April 25, 2014; Ermolaeva und Schumacher 2014a). Mindestens 38 % der proteinkodierenden Gene weisen Orthologe im menschlichen Genom auf und 40 % der Gene, die mit humanen Krankheiten in Verbindung gebracht werden, besitzen ein Ortholog im *C. elegans* Genom (Shaye und Greenwald 2011; Culetto und Sattelle 2000). Dies ermöglicht eine Übertragung der in *C. elegans* beobachteten Prozesse auf die bei menschlichen Erregern beobachteten Wirt-Pathogen Interaktionen (Kim 2008).



**Abbildung 5: *C. elegans* Anatomie.** Die grundlegenden anatomischen Merkmale eines Hermaphroditen (**A**) und eines Männchens (**B**) aus lateraler Ansicht. Der dorsale Nervenstrang (DNC) und ventrale Nervenstrang (VNC) erstrecken sich entlang des gesamten Tieres ausgehend vom Nervenring. Zwei der vier Zellwandmuskelquadranten sind gezeigt. Im Hermaphroditen sind die Gonaden, Oocyten, Embryos und die Vulva erkennbar. (**B**) Anordnung von Pharynx, Darm und Gonaden. Männchen sind am fächerförmigen Schwanz zu erkennen (das Nervensystem und die Muskeln wurden in dieser Ansicht ausgespart). (**C**) Querschnitt durch die anteriore Region eines *C. elegans* Hermaphroditen (Position in A durch Linie markiert). Die vier Muskelquadranten werden von der Epidermis und Kutikula umgeben. Der Darm und die Gonaden befinden sich inmitten des Pseudocoeloms. Modifiziert nach Altun et al. (2002-2021).

## 1.7 Das *C. elegans* Immunsystem

Wie viele andere Invertebraten verfügt *C. elegans* über kein adaptives Immunsystem, stattdessen muss sich der Nematode vollkommen auf die angeborene Immunität verlassen. Diese ist von großer Relevanz für den freilebenden Erdorganismus, da er sich von Bakterien ernährt und so ständig potenziellen Pathogenen ausgesetzt ist. Jedoch unterscheidet sich *C. elegans* auch von anderen Invertebraten, da er auch über keine spezialisierten Immunzellen, wie die Makrophagen-ähnlichen Hämozyten von *Drosophila*, verfügt (Clara Taffoni und Nathalie Pujol 2015).

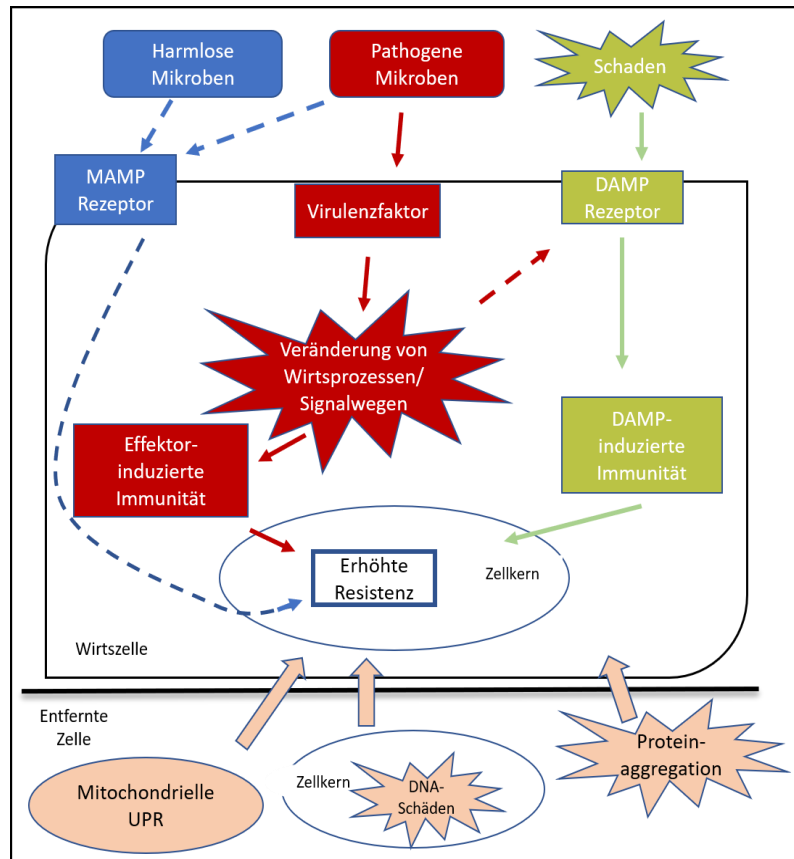
Trotzdem hat sich *C. elegans* zu einem Modellorganismus für die angeborene Immunität entwickelt. Nematoden und Menschen haben zahlreiche gemeinsame Pathogene, wodurch ihre Virulenz-Strategien und andere Aspekte der Wirt-Pathogeninteraktion an diesem einfachen Organismus mit verringerter Komplexität untersucht werden können. Die evolutionär betrachtet ältesten und konserviertesten Signalnetzwerke sind in vereinfachter Form in *C. elegans* vorzufinden und machen den Nematoden so zu einem geeigneten Modell für klassische Immunsystemstudien (Ermolaeva und Schumacher 2014b).

Drei Hauptmechanismen stehen *C. elegans* für die Abwehr mikrobieller Attacken zur Verfügung. (1) Vermeidungsverhalten: Es wurde gezeigt, dass *C. elegans* in der Lage ist, zwischen pathogenen Bakterien und Bakterien, die als Nahrungsquelle dienen, zu unterscheiden. Während die meisten Bakterien eine anziehende Wirkung haben, ist gegenüber den Pathogenen eine Aversion zu beobachten. Dieses Vermeidungsverhalten kann erlernt werden und *C. elegans* ist in der Lage, sich negative Gerüche „zu merken“. An diesem Mechanismus sind asymmetrische chemosensorische Neuronen, sowie olfaktorische Neuronen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und der einzige Toll-like Rezeptor (TLR), TOL-1 beteiligt (Schulenburg und Ewbank 2007; Pujol et al. 2001; Zhang et al. 2005). (2) Physikalische Barrieren: kommt *C. elegans* mit Pathogenen in Kontakt, wird er von einer Kutikula aus Kollagen und Chitin vor Eindringlingen geschützt. Neben dem stabilen Exoskelett kann der Pharynxgrinder oral aufgenommene Bakterien zerstören. So werden lebende Pathogene davon abgehalten den Darmtrakt zu erreichen und eine Infektion zu etablieren (Labrousse et al. 2000; Kim et al. 2002; Kurz et al. 2003). Haben Pathogene die ersten beiden Abwehrmechanismen überwunden, müssen sie noch (3) die induzierbaren Mechanismen durchstehen. Ein komplexes System multipler Signalkaskaden reguliert hier die Produktion von Immuneffektoren und

antimikrobiellen Peptiden (AMPs) in pathogen- und gewebespezifischer Weise (Alper et al. 2007; Pujol et al. 2012).

Die involvierten Signalkaskaden werden nach der Erkennung der mikrobiellen Infektion aktiviert. Diese Erkennung kann von drei Signalen ausgelöst werden (Abbildung 6). (1) Das Pathogen kann direkt anhand von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*microbe associated molecular patterns*; MAMPs) erkannt werden (Twumasi-Boateng und Shapira 2012). Diese Moleküle agieren als Liganden für spezielle Wirtsrezeptoren, die wiederum die intrazellulären Signalkaskaden für die Produktion von Abwehrmolekülen aktivieren. (2) Störungen in der Wirtsphysiologie können durch schadensassoziierte molekulare Muster (*damage associated molecular patterns*; DAMPs) erkannt werden (Zugasti et al. 2014). Dabei handelt es sich meist um endogene Moleküle, die eine nicht-endogene Lokalisation aufweisen, wie etwa mitochondrielle DNA oder Zellkernproteine im Cytoplasma. (3) Auch Veränderungen von Wirtsproteinen durch Virulenzfaktoren können als Signal für die Initiation der Immunantwort wahrgenommen werden. Dies kann auch über generelle Veränderungen, wie der Translationsinhibition oder abrupten Veränderungen des Membranpotentials, stattfinden und fällt unter den Begriff der Effektor-induzierten Immunität (*effector triggered immunity*; ETI) (Rajamuthiah und Mylonakis 2014). Hier wird oftmals von Überwachungsmechanismen gesprochen, welche in *C. elegans* evolutionsbiologisch konserviert sind (Ewbank und Pujol 2016).

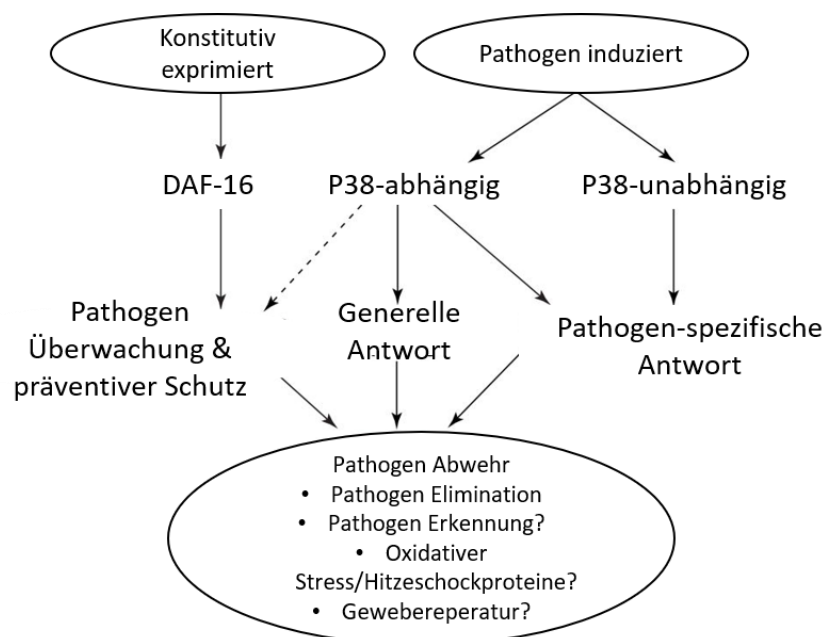
Nematoden-fangende Pilze lösen zunächst eine Immunreaktion mittels DAMPs aus, da es bei der Penetration der Kutikula und Epidermis durch die Pilze zur Verletzung der epidermalen Integrität kommt. Hierbei wird der spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptor DCAR-1 über den STAT-ähnlichen Transkriptionsfaktor STA-2 aktiviert, um die Expression antimikrobieller Peptidgene zu aktivieren. Diese Mechanismen wurden vor allem durch Studien mit dem pilzlichen Endoparasiten *Drechmeria coniospora* ergründet (Zugasti et al. 2016).



**Abbildung 6: Modell diverser Auslöser der Immunantwort durch Infektion.** *C. elegans* reagiert auf Veränderungen in verschiedenen Prozessen durch Virulenzfaktoren mit der *effektor-triggered immunity* (ETI). Verletzungen induzieren *damage associated molecular patterns* die *DAMP-triggered immunity*, um die Expression von Genen für Abwehrmechanismen zu aktivieren. Die *microbe associated molecular pattern* (MAMP) *triggered immunity* ist in *C. elegans* noch nicht beschrieben. Neben zellautonomen Mechanismen kann die Immunantwort auch durch Veränderungen in distanzierten Geweben aktiviert werden. So beispielsweise durch DNA-Schäden, Proteinaggregationen oder durch die Aktivierung der mitochondrialen *unfolded protein response* (UPR). Verändert nach Ewbank und Pujol (2016).

Die Hauptsignalwege, die an der epidermalen Immunantwort beteiligt sind, sind der p38 MAPK Signalweg, der TGF-beta Signalweg und der DAF-2 *Insulin-like* Rezeptor (ILR) Signalweg (Abbildung 7). Letzterer involviert den FOXO-Transkriptionsfaktor DAF-16, welcher nach DAF-2 Aktivierung im Zytoplasma lokalisiert und somit inaktiv ist (Singh und Aballay 2009). Eine Klasse von Molekülen, die unter Kontrolle des Insulinsignalwegs steht, sind die Lysozyme. Einige Lysozyme, wie beispielsweise Lys-7, sind bei der Infektion mit Bakterienpathogenen induziert und ihre Inaktivierung macht den Wirt anfälliger für Infektionen mit *Microbacterium nematophilum* und *Pseudomonas aeruginosa*. Der Insulinsignalweg ist jedoch auch an zahlreichen anderen physiologischen Prozessen in *C. elegans*, wie der generellen Stressantwort, beteiligt (Engelmann und Pujol 2010). Der p38 MAPK Signalweg stellt einen der Hauptsignaltransduktionswege der Nematoden-Immunantwort dar. Zahlreiche

Immuneffektoren, wie beispielsweise Irg-1 und Irg-4 (*infection response gene*) werden p38 abhängig reguliert. Bei Irg-4 handelt es sich um einen Immuneffektor der Familie der CUB-ähnlichen Proteine (benannt nach den Proteinen C1r/C1s, Uegf und Bmp1). Diese Domäne ist in verschiedenen extrazellulären- und plasmamembranassoziierten Proteinen mit verschiedenen Funktionen wie der Komplementaktivierung, Entwicklung, Gewebereparatur, Tumorsuppression und Entzündungsreaktionen involviert (Bork und Beckmann 1993; JebraMercy und Balamurugan 2012). Beide Signalwege, p38 MAPK und DAF-2/DAF-16, sind ebenfalls an Alterungsprozessen der Nematoden beteiligt (Ermolaeva und Schumacher 2014b).

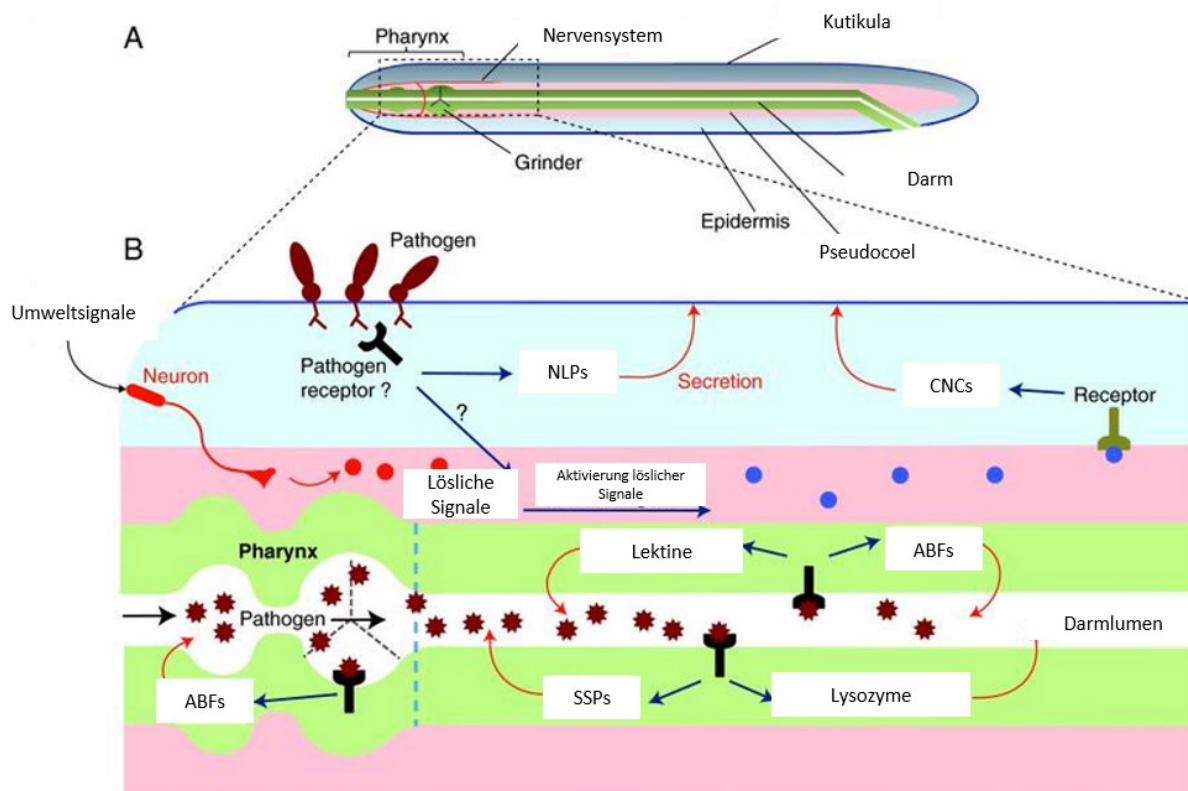


**Abbildung 7: Regulation der Pathogenabwehr in *C. elegans*.** Die Pathogenabwehr in *C. elegans* besteht vermutlich aus Pathogen-induzierten Komponenten sowie basalen, konstitutiv exprimierten Faktoren. Dabei lösen verschiedene Pathogene distinkte Signalkaskaden aus. Der PMK-1 p38 MAPK Signalweg reguliert sowohl pathogen-induzierte als auch konstitutiv exprimierte Gene. Die Pathogen-induzierten Mechanismen unterliegen jedoch auch einer PMK1- unabhängigen Regulierung. Die Gene, welche durch den DAF-16 Transkriptionsfaktor reguliert werden, überschneiden sich minimal mit den Pathogen-induzierten Genen, was auf eine Rolle von DAF-16 bei der Regulation der basalen, oder konstitutiv exprimierten antimikrobiellen Gene hindeutet. Die aktivierten Abwehrmechanismen beinhalten die Erkennung und Eliminierung des Pathogens, Proteine der Hitzeschock- und Oxidativen Stress-Antwort und Gewebereparatur. Verändert nach Shivers et al. (2008).

Bei den Proteinen, die durch die Pathogen-induzierten Signalkaskaden aktiviert werden, handelt es sich im Falle pilzlicher Pathogene, welche die Kutikula angreifen, vor allem um antimikrobielle Peptide (AMPs) wie neuropeptid-ähnliche-Proteine (*neuropeptide-like proteins*; NLPs) und Caenazine (*Caenorhabditis bacteriocin*; CNCs) (Abbildung 8) (Pujol et al. 2012). Dass diese Peptide tatsächlich antimikrobiell wirksam



sind, wurde im Falle von Nlp-31 gezeigt, für das die antimikrobielle Aktivität gegenüber *Neurospora crassa* und *Aspergillus fumigatus* getestet wurde (Couillault et al. 2004).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der epidermalen Immunantwort von *C. elegans*.** (A) *C. elegans* besteht aus zwei konzentrischen Tuben, ist umgeben von der Kutikula und der Epidermis, die durch das Pseudocoel vom Darm getrennt sind. Der Pharynx beinhaltet den Grinder zur Verkleinerung aufgenommener Nahrung. (B) Epidermale Immunantwort von *C. elegans*. Mikrobielle Pathogene werden vermutlich über noch unbekannte Rezeptoren wahrgenommen. Nematophag Pilze penetrieren die Kutikula und lösen dadurch spezifische Signalwege aus. Dies führt zur Bildung und Freisetzung von antimikrobiellen Proteinen wie NLPs und CNCs. Verändert nach Ewbank und Zugasti (2011).

Weiterhin können Expressionsprofile während der Infektion mit Pathogenen Aufschluss darüber geben, welche Immunantwort ausgelöst wird. Eine Transkriptomanalyse von *C. elegans* während der Infektion mit *M. haptotylum* hat die Induktion einiger bekannter Immunitätsmarker wie *nlp-24*, *nlp-29*, *nlp-34*, *cnc-4* und Galektinen (Galaktose-bindende Proteine) gezeigt (Fekete et al. 2008). Eine vergleichende Studie, welche die *C. elegans* Expressionsprofile während der Infektion mit *D. coniospora* mit denen während der Infektion mit dem Gram-negativen Bakterium *Serratia marcescens* untersuchte, konnte zeigen, dass es nur wenig Übereinstimmung in der Immunantwort gab (Couillault et al. 2004). Auch bei der Infektion von *M. nematophilum* und *P. aeruginosa* spielen die NLPs und CNCs keine Rolle, was die



Spezifität der *C. elegans* Immunantwort unterstreicht (O'Rourke et al. 2006; Shapira et al. 2006).

### **Ziel dieser Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese zu testen, ob SSPs als Virulenzfaktoren eine Rolle bei der Interaktion zwischen NFP und Nematoden spielen. Dazu sollte der Virulenzfaktor-Kandidat CyrA in *D. flagrans* charakterisiert werden, um so Hinweise auf seine Funktionsweise zu erlangen. Die Lokalisation des Proteins während der Interaktion sollte Aufschluss über die zeitlich-räumliche Organisation sekretierter Proteine an der Infektionsstelle und im Infektionsbulbus geben. Die Sekretionsmechanismen von Proteinen in Fallen sollten durch die Deletion von Komponenten des Exocyst-Komplexes und durch die Behandlung mit dem Inhibitor des klassischen Sekretionsweges, Brefeldin A, untersucht werden. Auch die Lokalisation von GFP, welches mit den Signalpeptiden mehrerer Proteine, sowie den Signalsequenzen verschiedener Organellen fusioniert wurde, sollte dazu beitragen, die Funktionsweise der Sekretion in den Fallen zu überprüfen. Durch die Deletion des *cyrA* Gens sollte überprüft werden, ob *cyrA* für die Virulenz des Pilzes essenziell ist. Die heterologe Expression des pilzlichen Gens in *C. elegans* sollte zeigen, ob ein direkter Einfluss von CyrA auf die Nematoden festzustellen ist. Dieser sollte anhand der Lebenszeit und der Expression von Immunitätsmarkern überprüft werden.

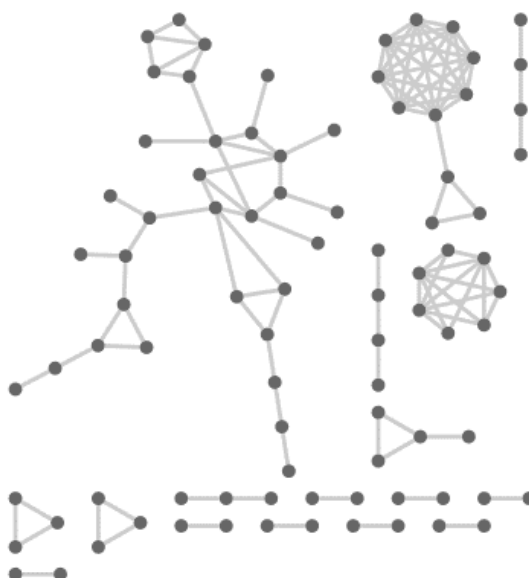
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Bioinformatische Analyse kleiner cysteinreicher Proteine im *D. flagrans* Sekretom

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Genom von *D. flagrans* sequenziert und annotiert. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden bereits publiziert (Youssar et al. 2019). Die Vorhersage des Sekretoms mittels SignalP (Nielsen 2017) ergab, dass 638 Proteine (6,4 %) über ein klassisches Signalpeptid für die Sekretion verfügen. Davon sind 249 kleine sekretierte Proteine (SSPs), mit einer Gesamtlänge unter 300 Aminosäuren. Da eine Vielzahl an der Virulenz beteiligte Proteine in anderen pathogenen Pilzen über unkonventionelle Sekretionswege sekretiert werden, sollte das Proteom zusätzlich nach solch unkonventionell sekretierten Proteinen untersucht werden. Dazu wurde SecretomeP, eine sequenzbasierte Methode für die Vorhersage unkonventionell sekretierter Proteine ohne N-terminales Signalpeptid angewandt (Bendtsen et al. 2005). Auch wenn die Datensätze für das Training der neuronalen Netzwerke des Programms von menschlichen und bakteriellen Sequenzen stammen und bisher keine Version für pilzliche Proteine verfügbar ist, kann diese Analyse einen Eindruck über die Existenz unkonventioneller Sekretion in Nematoden-fangenden Pilzen erlauben. Es wurden 538 Proteine mit einem Score  $> 0,9$  als potenziell unkonventionell-Sekretiert vorhergesagt. Diese Proteine können zukünftig als Grundlage weiterer Analysen dienen und erweitern somit das Repertoire potenzieller Virulenzfaktoren in *D. flagrans*.

Da zahlreiche Virulenzfaktoren cysteinreich sind, wurde das Sekretom außerdem nach cysteinreichen Proteinen (*small secreted cysteine rich proteins*, SSCPs) durchsucht. Solche SSCPs sind in der Regel 50 – 300 Aminosäuren lang und enthalten mindestens sechs bis 14 Cysteine. Die KAPPA (*Key Aminoacid Pattern-based Protein Analyzer*) - Plattform wurde angewendet, um cysteinreiche Proteine im Sekretom zu identifizieren. Zusätzlich wurde eine Clusteranalyse anhand von Ähnlichkeiten der Anordnung der Cysteinreste durchgeführt, da das Muster der Abstände der Cysteine auf eine funktionelle Beziehung der Proteine schließen lassen kann. Diese Untersuchung ergab, dass insgesamt 494 cysteinreiche Proteine im *D. flagrans* Sekretom vorzufinden sind, davon sind 170 auch SSPs. In der Gruppe der 170 SSCPs wurden 17 Cluster gebildet, wobei die drei größten Cluster je 7, 11 und 32

Proteine enthielten (Abbildung 9). 83 SSCPs waren Singletons, wiesen also keine Ähnlichkeiten in der Anordnung der Cysteine mit anderen Proteinen auf. Diese Analyse der kleinen, cysteinreichen Proteine kann zukünftig für die Suche nach Kandidaten-Virulenzfaktoren genutzt werden. Eine detaillierte experimentelle Untersuchung der mittels der Clusteranalyse generierten Netzwerke kann außerdem Aufschlüsse über noch unbekannte konservierte Aminosäuremuster von Virulenzfaktoren geben.

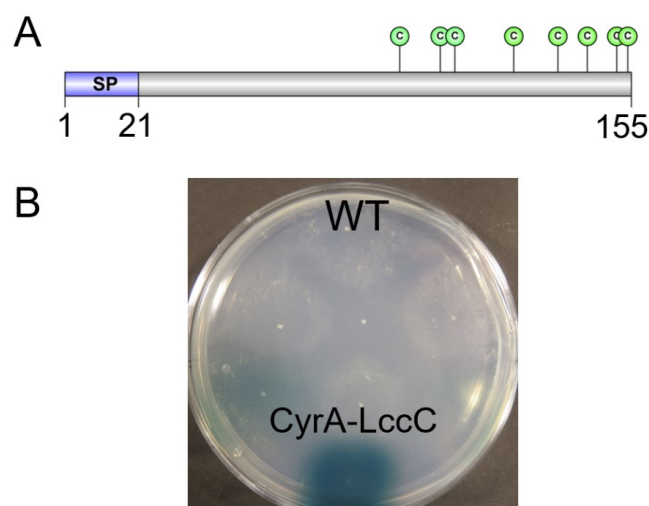


**Abbildung 9: Graphische Darstellung der 17 KAPPA-Cluster der cysteinreichen, kleinen Proteine des *D. flagrans* Sekretoms.** SSCPs wurden über eine *de novo* Analyse des Sekretoms mit dem KAPPA-Algorithmus vorhergesagt und anhand des Anordnungsmusters der Cysteine zu Clustern zusammengefügt. Das Netzwerk wurde mit Cytoscape erstellt.

## 2.2 Das kleine cysteinreiche Protein CyrA wird sekretiert

Der Virulenzfaktor-Kandidat dfl\_006389 (CyrA: *cysteine rich protein A*) ist eines der 249 SSPs des *D. flagrans* Sekretoms und außerdem unter den 117 Proteinen, die von EffektorP (Sperschneider et al. 2018) als putative Effektoren vorhergesagt wurden. CyrA besteht aus 155 Aminosäuren, enthält ein vorhergesagtes, N-terminales Signalpeptid und einen cysteinreichen C-Terminus (Abbildung 10 A). CyrA gehört somit ebenfalls zu den SSCPs, wobei es in keinem Cluster angesiedelt ist. Es sind keine konservierten Domänen vorhergesagt und orthologe Proteine sind in zwei weiteren NFP, *A. oligospora* und *Monacrosporium haptotylum* zu finden. Das orthologe Gen *H072\_8717* wurde in einer Transkriptomanalyse von *M. haptotylum* als eines der fünf induzierten SSPs bei der Interaktion mit *C. elegans* identifiziert.

Das Hauptkriterium für Virulenzfaktoren ist ihre Sekretion, daher sollte die Funktionalität des bioinformatisch vorhergesagten Signalpeptids untersucht werden. Dazu wurde ein Fusionsprotein aus CyrA und der *Aspergillus nidulans* Laccase C, ohne das native Signalpeptid der Laccase, in *D. flagrans* exprimiert. Wird dieses Fusionsprotein sekretiert, katalysiert die Laccase die Oxidation von im Medium befindlichen ABTS zu dem stabileren Radikalkation. Diese Reaktion führt zu einer grün-blauen Färbung des Mediums um die Kolonie. Für die Konstruktion des Vektors wurde das modifizierte Plasmidrückgrad des Expressionsvektors pOF018 verwendet, der das für die Laccase C kodierende *A. nidulans* Gen *lccC* unter Kontrolle des *A. nidulans* *gpdA*-Promotors enthält und zusätzlich die Hygromycinresistenzkassette (*trpC(P)::hph::trpC(T)*) für die Selektion von *D. flagrans* beinhaltet (Youssar et al. 2019). Der offene Leserahmen (*open reading frame*; ORF) von *cyrA* wurde mittels *Ascl* und *NheI*-Schnittstellen in den Vektor eingefügt und so mit dem 3'-Ende des *lccC* Gens fusioniert. *Escherichia coli* wurde für die Klonierung mit dem Konstrukt transformiert, Transformanten wurden einem Restriktionsverdau unterzogen und *D. flagrans* wurde anschließend mit dem korrekten Plasmid transformiert. Nach 48 h Inkubation der Transformanten (sNH08) auf *low nutrient agar* (LNA) mit 1 mM ABTS bei 28 °C waren blau-grün gefärbte Kolonien sichtbar, was auf die Sekretion der Laccase in das Medium und somit auf die Funktionalität des CyrA Signalpeptides hinweist (Abbildung 10 B).



**Abbildung 10: Das kleine cysteinreiche Protein CyrA wird sekretiert. (A)** Schematische Darstellung des CyrA Proteins. Es besteht aus 155 AS, einem vorhergesagten N-terminalen 21 AS Signalpeptid und einem cysteinreichen C-Terminus mit acht Cysteinen. **(B)** Der *D. flagrans* WT und der Reporterstamm, welcher die *cyrA-lccC* Fusion unter dem konstitutiven *gpdA*-Promotor exprimiert, wurden auf LNA mit 1 mM ABTS inkubiert. Die blau-grüne Färbung um die Kolonie entspricht der Umsetzung des Substrats durch die Laccase und somit der Sekretion des Fusionsproteins durch das SP.

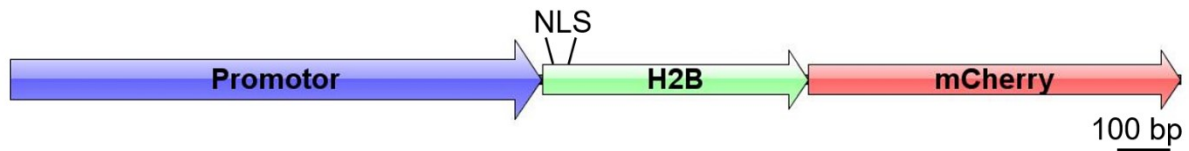
### 2.3 Die Genexpression von *cyrA* ist während der Interaktion hoch-reguliert

Virulenzfaktoren sollten lediglich in der pathogenen Lebensphase des Pilzes exprimiert werden. Um die Rolle von *CyrA* während der Infektion weiter zu analysieren, wurde daher die differentielle Expression des Gens während der *C. elegans* Infektion via qRT PCR untersucht. RNA wurde von vegetativem, nicht-induziertem Myzel, sowie von Myzel mit Fallen nach Ko-Inkubation mit *C. elegans* isoliert. Dazu wurde eine Sporensuspension einer 7 Tage alten *D. flagrans* PDA-Platte hergestellt und auf LNA-Platten mit Cellophan-Folie ausplattiert. Die LNA-Cellophan-Petrischalen wurden für 24 h inkubiert, danach wurde auf die induzierten Proben eine gemischte *C. elegans* N2 Population gegeben und beide Ansätze nochmals 24 h inkubiert. Das Myzel wurde mit einem Spatel geerntet, wobei jeweils 5 Platten für ein biologisches Replikat vereint wurden. RNA wurde mit einer Trizol-Extraktionsmethode isoliert und einem DNase-Verdau mit dem Turbo-DNA-free Kit (Thermo Fischer) unterzogen. Die qRT PCR wurde mit dem Luna One Step qPCR Kit (NEB) im biologischen- und technischen Triplikat durchgeführt. Die relative Expression wurde mit dem für gamma-Aktin (*dfl\_002353*) kodierenden Gen als interne Referenz berechnet (Abbildung 12 A). Es konnte ein signifikanter Unterschied der relativen Expression von *cyrA* im induzierten Myzel im Vergleich zum vegetativen Myzel festgestellt werden.

Die n-fache Expression der biologischen Replikate der induzierten Proben im Vergleich zu den nicht-induzierten variierte mit Werten von 5.7 ( $\pm 0.7$ ,  $n = 3$ ), 7.9 ( $\pm 1.4$ ) und 18.9 ( $\pm 2.6$ ). Diese Abweichungen zwischen den Replikaten spiegelt die Unterschiede in der Anzahl der Fallen bzw. den gefangenen Würmern auf den verschiedenen Platten wider. Prinzipiell konnte eine Induktion der Expression in der räuberischen Phase festgestellt werden.

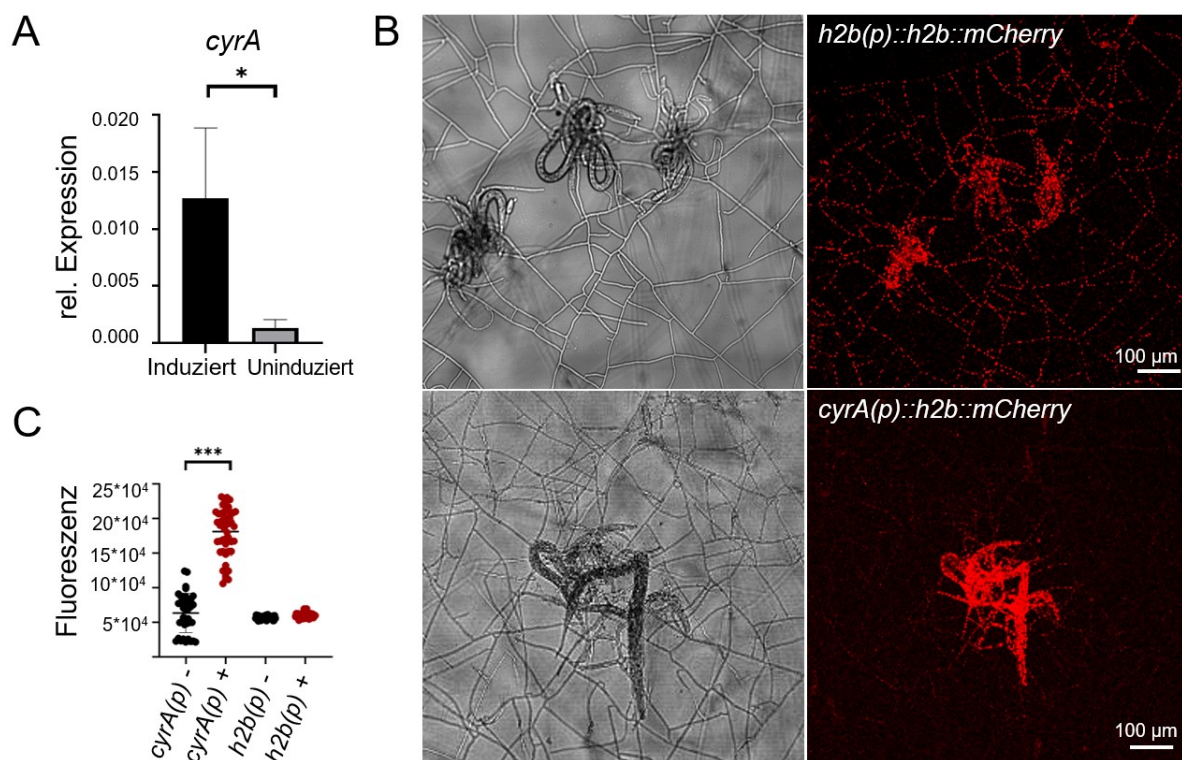
Da diese quantitative Methode aufgrund der RNA Isolation aus einer Mischung aus vegetativem Myzel und Fallen keinen Aufschluss darüber erlaubt, in welcher Phase des Fallenbildungs- und Infektionsprozess das Gen aktiviert wird, wurde ein Reporter-Assay etabliert. Damit sollte die Aktivität des *cyrA* Promotors mikroskopisch visualisiert werden. Es wurde eine Fusion bestehend aus den für das Histon H2B und mCherry kodierenden Sequenzen unter der Kontrolle des *cyrA* Promotors (1,5 kb *upstream* von *cyrA*) in *D. flagrans* exprimiert (Abbildung 11). Als Kontrolle diente der gleiche Reporter unter Kontrolle des konstitutiven *h2b*-Promotors. Die H2B-Sequenz wurde aufgrund der NLS verwendet, um das mCherry Signal in den Zellkernen zu lokalisieren und das Fluoreszenzsignal somit eindeutig von möglicher

Hintergrundfluoreszenz unterscheiden zu können. Damit kann die Fluoreszenz der Zellkerne direkt mit der Promotoraktivität und somit der Genexpression korreliert werden.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des Promotorfusions-Reporterkonstrukts für die Expressionsanalyse.** Um die Promotoraktivität zu visualisieren, wurde ein Reporterkonstrukt erstellt, in dem *h2b* und *mCherry* unter Kontrolle eines zu untersuchenden Promotors exprimiert werden. H2B enthält eine NLS zur Lokalisation des Fluorophors in den Zellkernen.

Transformanten des Reporterkonstrukts wurden mittels Southern-Blot-Analyse auf die einmalige Integration des Konstrukts hin untersucht. Sporen des jeweiligen Stammes wurden anschließend mit einem Zahnstocher auf Objektträgern mit einer dünnen Schicht LNA angeimpft und für 24 h bei 28 °C inkubiert, zur Induktion der Fallenbildung wurde zusätzlich eine gemischte Population *C. elegans* N2 auf die Objektträger gegeben. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten im *cyrA*(p)-Reporterstamm (sNH21) ein starkes Fluoreszenzsignal der Zellkerne in den Fallen und den trophischen Hyphen in befallenen Würmern, sowie ein abnehmendes Signal im Myzel um die Fallen herum (Abbildung 12 B). Vegetatives Myzel und Proben ohne Würmer zeigten ein sehr schwaches Signal, welches die basale Expression des Promotors widerspiegelt. Die *h2b*-Promotor Kontrolle zeigte ein gleichmäßig starkes Signal in Fallen, sowie in vegetativem Myzel. Die durchschnittliche Fluoreszenz einzelner Zellkerne wurde mit ImageJ analysiert (Abbildung 12 C). Die Daten bestätigten eine höhere Fluoreszenz in den Fallen im Vergleich zum vegetativen Myzel für den *cyrA*-Promotor-Reporterstamm und eine gleichmäßige Fluoreszenz in allen Hyphen für den *h2b*-Kontrollstamm. Da die Stärke der Fluoreszenz des Reporters die Aktivität des Promotors direkt widerspiegelt und visualisiert, bestätigt dieses Experiment die differenzielle Expression von *cyrA* in den Fallen.



**Abbildung 12: Die Expression von *cyrA* ist in Fallen induziert.** (A) qRT-PCR der relativen Expression von *cyrA* während der Interaktion mit *C. elegans* und der Fallenbildung normalisiert mit Aktin. Für die RNA Isolation während der Interaktion wurde *D. flagrans* für 24 h bei 28 °C auf LNA mit Cellophan inkubiert. Eine gemischte Population *C. elegans* N2 wurde zugegeben und die Ko-Inkubation erfolgte für weitere 24 h. Die nicht-induzierte Probe wurde bis auf die Zugabe der Nematoden gleich behandelt. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test ermittelt (p-Wert = 0.03; n = 3). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Promotorfusions-Reporterstämme. Für die Kontrolle wurde der H2B-mCherry Reporter unter Kontrolle des konstitutiven *h2b*-Promotors exprimiert. Um die Aktivität des *cyrA*-Promotors zu überprüfen, wurde das Konstrukt unter dem *cyrA* Promotor exprimiert und beide Stämme mit den gleichen Einstellungen mikroskopiert. (C) Quantifizierung der durchschnittlichen Fluoreszenz einzelner Zellkerne der Reporterstämme in Fallen (+) und in vegetativen Hyphen (-), berechnet mit ImageJ. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test ermittelt (n > 30).

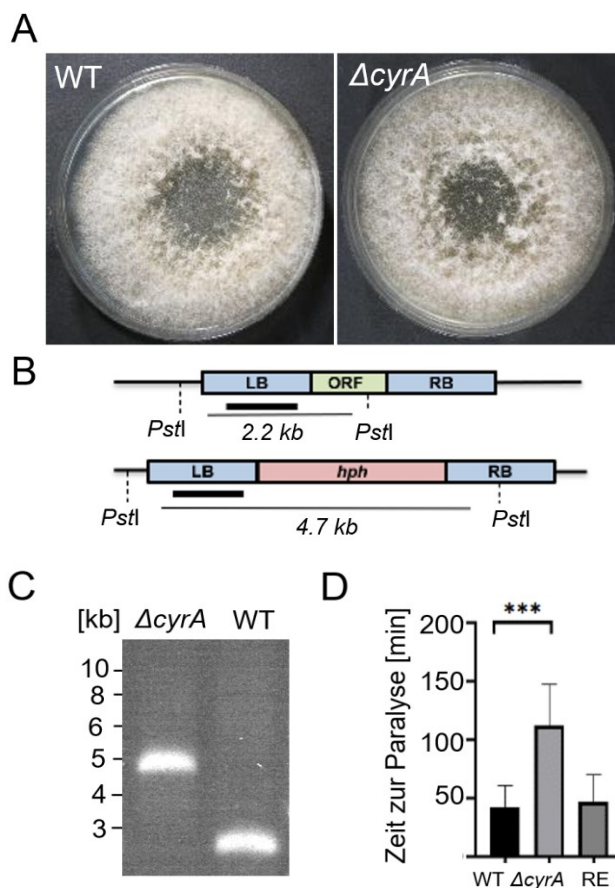
## 2.4 Die Deletion von *cyrA* beeinträchtigt die Virulenz

Um den Einfluss von CyrA auf die Virulenz von *D. flagrans* zu untersuchen, wurde das Gen mittels homologer Rekombination deletiert. Dazu wurde die Hygromycinresistenzkassette über Gibson-Assembly mit 1,5 kb *upstream*- und *downstream* Bereichen des ORF flankiert und in den Pjet1.2 Vektor eingefügt (Abbildung 13 B). *D. flagrans* wurde mit diesem Plasmid transformiert und Transformanten wurden mittels Southern-Blot-Analyse auf die korrekte, einmalige Insertion der Resistenzkassette überprüft (Abbildung 13 C). Die LB-Sonde hybridisierte, wie für die Deletion erwartet, mit einem 4,7 kb Fragment der mit dem Restriktionsenzym *Pst*I-geschnittenen gDNA des  $\Delta$ *cyrA* Transformanten und mit

einem 2,2 kb Fragment in der Wildtyp gDNA. Für die Komplementation der Deletion wurde der Deletionsstamm mit einem Vektor transformiert, der den *cyrA* ORF mit den 1,5 kb *upstream* und 0,5 kb *downstream* regulatorischen Elementen enthält.

Die *cyrA* Mutante wies keinen vegetativen Wachstumsphänotyp auf (Abbildung 13 A). Sie konnte Fallen ausbilden und Nematoden fangen. Da der Virulenzfaktor wahrscheinlich erst eine Funktion nach dem Fangen eines Nematoden erfüllt, wurde ein mikroskopisches Virulenzassay etabliert, welches die genauere Begutachtung dieser Phase zulässt. Dieses Assay wurde mit dem Deletionsstamm (sNH11), dem Komplementationsstamm (sNH27) und dem *D. flagrans* Wildtyp als Kontrolle durchgeführt. Weiterhin wurde der *C. elegans* Stamm Ban126 (*his-72p::his-72::GFP*) als Beute verwendet, da die grün fluoreszierenden Zellkerne erlauben den Verlauf der Infektion zu beobachten und den Zelltod anhand der schwindenden Fluoreszenz festzustellen. Für das Assay wurden Langzeitaufnahmen einzelner, gefangener Würmer durchgeführt und der Zeitpunkt der Paralyse, sowie der Todeszeitpunkt nach dem Fang festgestellt. Sporen der jeweiligen Stämme wurden dafür auf LNA-Objektträgern zusammen mit einer gemischten Population *C. elegans* N2 angeimpft und 24 h bei 28 °C inkubiert, um die Fallenbildung zu induzieren. Danach wurden die N2 Würmer von den Objektträgern gewaschen und kurz vor der Mikroskopie synchronisierte Ban126 L3-Larven auf das bereits induzierte Myzel gegeben. Verschiedene Fallennetzwerke wurden mit Hilfe eines mechanischen Objektisches und einem Konfokal-Mikroskop beobachtet und Aufnahmen wurden alle 2 Minuten für 12 Stunden gemacht. Bei der Analyse der Aufnahmen wurde der Zeitpunkt, zu dem ein Wurm in die Falle ging als Startzeitpunkt festgelegt (Abbildung 13 D). Sobald keine eigenständige Bewegung des Wurms mehr stattfand, wurde die Paralyse festgestellt und der Verlust des nuklearen GFP-Signals der Würmer wurde als Todeszeitpunkt berechnet. Die Auswertung dieser Daten ergab, dass der *D. flagrans* Wildtyp die Nematoden nach 49 [SD ± 27, n = 29] Minuten paralyisierte, der komplementierte Stamm nach 62 min [SD ± 39, n = 52], während der Deletionsstamm 95 [SD ± 44, n = 26] Minuten für diesen Prozess benötigte. Die Gesamtzeit bis zum Todeszeitpunkt des Deletionsstamms war mit 206 min [SD ± 141], im Vergleich zu 146 min [SD ± 80] im Wildtyp, nicht signifikant verändert. Die Beobachtung der verzögerten Paralyse deutet auf eine Rolle bei den frühen Prozessen der Interaktion hin und könnte indizieren, dass CyrA direkt oder indirekt an der Penetration oder Paralyse der Würmer beteiligt ist.



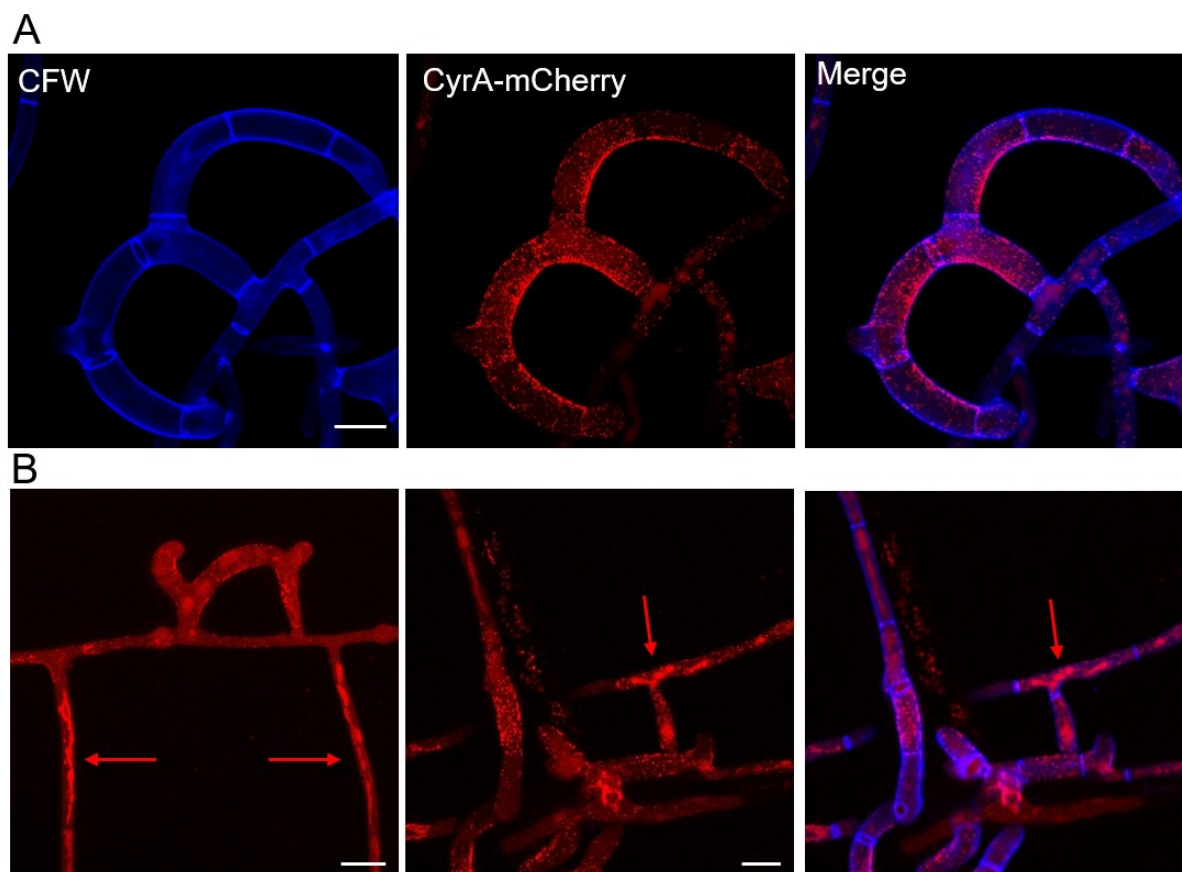


**Abbildung 13: Der *cyrA*-Deletionsstamm weist eine verringerte Virulenz auf.** (A) Der *D. flagrans* Wildtyp (WT) und die  $\Delta$ *cyrA*-Mutante wurden für sieben Tage bei 28 °C auf PDA inkubiert, die Mutante weist keinen Wachstumsphänotyp auf. (B) Schematische Darstellung der Deletionsstrategie. Der *cyrA* ORF wurde über homologe Rekombination mit 1 kb flankierenden Regionen (LB = linke Border, RB = rechte Border) (oberes Schema) durch die Hygromycinresistenzkassette (*hph*) ersetzt (unteres Schema). Die Bestätigung der korrekten Integration der Deletionskassette erfolgte durch eine Southern-Blot Analyse. Dazu wurde die genomische DNA des Wildtyps und des Transformanten mit dem Restriktionsenzym *PstI* geschnitten und eine spezifische Sonde für die Linke Border eingesetzt. (C) Die Southern-Blot Analyse zeigte die Hybridisierung der LB-Sonde mit einem 4,7 kb Fragment der gDNA des  $\Delta$ *cyrA* Transformanten und mit einem 2,2 kb Fragment im Wildtyp. (D) Für das Virulenzassay wurde eine mikroskopische Langzeitbeobachtung einzelner, gefangener Würmer durchgeführt und die Zeit vom Fang bis zur vollständigen Paralyse ausgewertet. Dazu wurden der Wildtyp (WT), die  $\Delta$ *cyrA*-Mutante und der komplementierte Stamm (RE) auf LNA mit einer gemischten Population *C. elegans* N2 induziert und kurz vor der Aufnahme Ban126 L3-Larven zugegeben. Dann wurde der Zeitpunkt von Fang bis zur Paralyse dieser Würmer beobachtet. Die Mutante zeigte eine Verzögerung der Paralyse im Vergleich zu den Kontrollen. Für die Berechnung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt.

## 2.5 *CyrA* lokalisiert in Fallen-spezifischen Strukturen

Die Lokalisation von Proteinen mit Hilfe von fluoreszierenden Proteinen erlaubt eine räumliche Einordnung der Rolle des Proteins im Infektionsgeschehen. Daher wurde *CyrA* C-terminal mit mCherry bzw. GFP fusioniert und dieses Konstrukt sowohl unter dem nativen Promotor (*cyrA(P)::GFP::trpc(T)*, sNH30) als auch unter dem konstitutiven *A. nidulans oliC* Promotor (*oliC(P)::cyrA::GFP::trpc(T)*, sNH20)

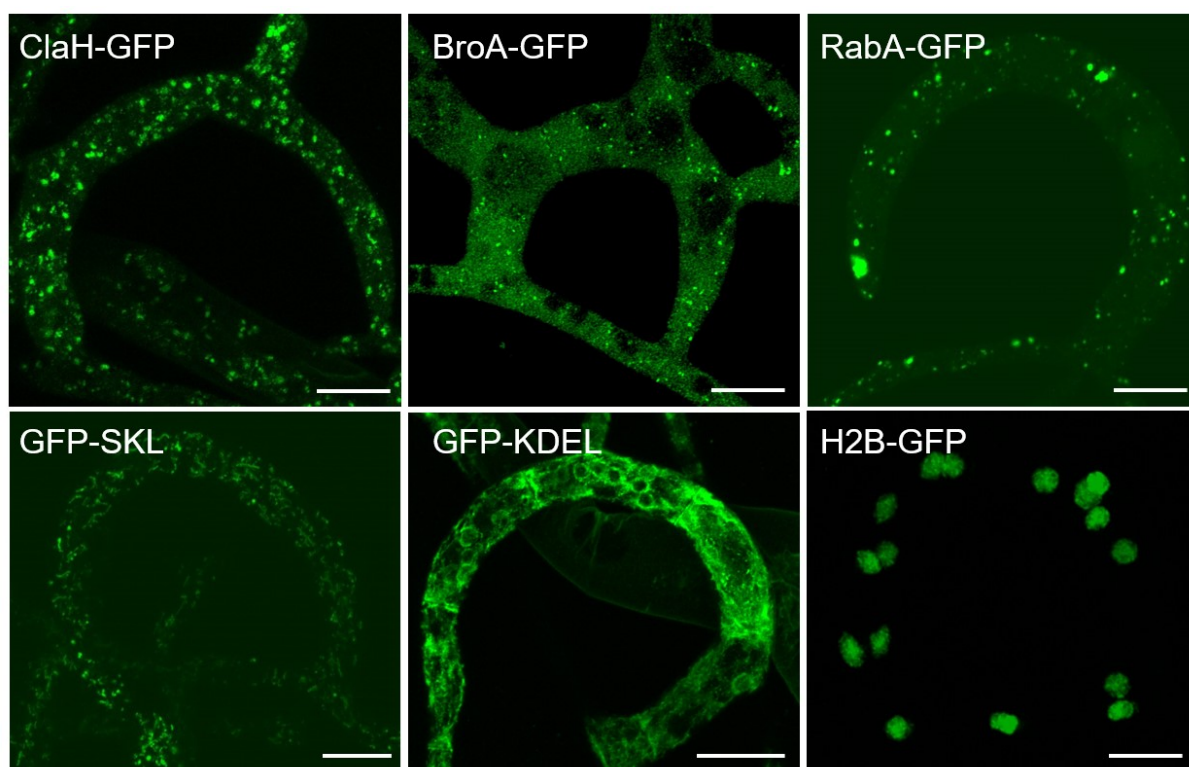
exprimiert. Das Fusionsprotein konnte in dynamischen Pünktchen innerhalb der Fallen beobachtet werden, wobei eine Akkumulation der Foci an der Falleninnenseite zu beobachten war (Abbildung 14 A). In vegetativem Myzel war entweder kein Fluoreszenzsignal zu beobachten oder es akkumulierte in den Vakuolen (Abbildung 14 B). Dies deutet auf den Abbau des Proteins außerhalb der Fallen hin.



**Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CyrA Lokalisation.** (A) Die *cyrA-mCherry* Fusion wurde unter dem konstitutiven *oliC* Promotor exprimiert. Fallen wurden auf LNA durch 24 h Ko-Inkubation mit *C. elegans* induziert. Das Fusionsprotein lokalisierte in dynamischen, vesikelartigen Strukturen in den Fallen und akkumulierte an der Falleninnenseite. Die Zellwand wurde mit Calcofluor White (CFW) gefärbt. (B) Außerhalb der Fallen lokalisierte CyrA-mCherry in tubulären Strukturen und Vakuolen (Pfeile). Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Um zu untersuchen, ob es sich bei dieser Lokalisation an der Falleninnenseite um ein generelles Phänomen in den Fallen handelt, oder ob die beobachteten, pünktchenförmigen Strukturen bekannten Vesikelpopulationen entsprechen, wurde die Lokalisation von Endosomen (RabA, dfl\_005994), Exosomen (BroA, dfl\_002479), *Clathrin coated vesicles* (ClaH, dfl\_009034), Zellkernen (H2B, dfl\_000203) sowie von Peroxisomen (GFP-SKL) und dem Endoplasmatischen Retikulum (GFP-KDEL) in den Fallen untersucht (Abbildung 15). Dafür wurden die jeweiligen orthologen Proteine der

in der Literatur als Marker beschriebenen Proteine mit GFP fusioniert und in *D. flagrans* exprimiert. Für die Lokalisation der Peroxisomen und des ERs wurden die Signalsequenzen SKL bzw. KDEL über Primer C-terminal mit GFP fusioniert und die Konstrukte unter Kontrolle des *o/iC*-Promotors exprimiert. Alle Vesikel waren, wie erwartet, gleichmäßig in den Fallen verteilt und das ER zeigte keine unkonventionelle Anordnung. Wie in der Literatur beschrieben, waren zahlreiche Peroxisomen in den Fallen vorhanden. Keine der untersuchten Organellen zeigte somit die gleiche Lokalisation an der Fallenninnenseite, wie sie für CyrA-mCherry beobachtet wurde. Weiterhin ging aus anderen Untersuchungen im Labor hervor, dass weitere Virulenzfaktorkandidaten die gleiche Lokalisation aufweisen, so u.a. NipA (Jennifer Menzner 04/2020), was auf einen fallenspezifischen Transport- und Sekretionsmechanismus hindeuten könnte, der sich von der konventionellen Sekretion an der Hyphenspitze unterscheidet.

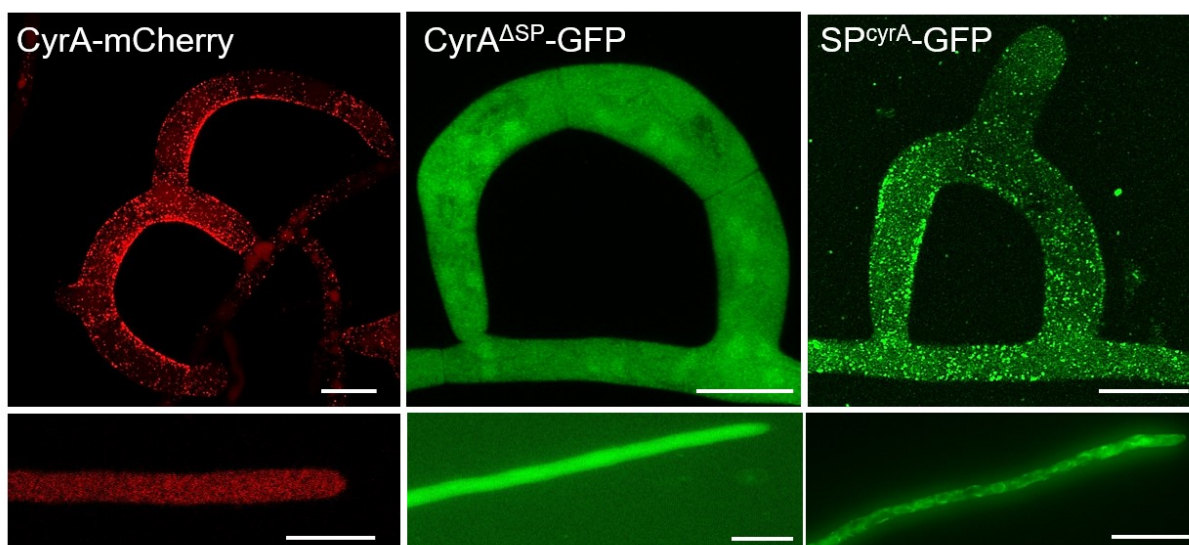


**Abbildung 15: Lokalisation diverser Vesikelpopulationen und Organellen in Fallen.** *Clathrin-coated vesicles* (ClaH), Exosomen (BroA), Endosomen (RabA) und Zellkerne (H2B) wurden mittels GFP-Fusion in Fallen lokalisiert. Weiterhin wurde GFP mit Signalsequenzen für Peroxisomen (SKL) und das ER (KDEL) fusioniert und in Fallen beobachtet. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

## 2.6 Die Lokalisation von Proteinen im Sekretionsweg in Fallen unterscheidet sich von der in vegetativen Hyphen

Um die Lokalisation des Proteins weiter zu untersuchen, wurde CyrA ohne Signalpeptid mit GFP fusioniert und in *D. flagrans* exprimiert (sNH41). In diesem Fall lokalisierte das Protein im Zytoplasma, sowohl in vegetativem Myzel als auch in den Fallen. Dies deutet auf einen Verlust der Fallenidentität hin, da das Protein mit SP im vegetativen Myzel im Gegensatz zum reifen Protein ohne SP abgebaut wurde (Abbildung 16).

Um zu überprüfen, ob das SP die Information für die korrekte Lokalisation des Proteins enthält, wurde nur das SP (AS 1-21) mit GFP fusioniert (sNH62). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass das SP allein ausreichend war, um den Fluorophor in dynamische Foci an der Falleninnenseite zu lokalisieren (Abbildung 16). Die Lokalisation von SP<sup>CyrA</sup>-GFP entsprach der des vollständigen CyrA Proteins. In vegetativem Myzel konnte eine diffuse Lokalisation im Zytoplasma beobachtet werden, es waren jedoch keine vesikelartigen Strukturen sichtbar. Die Lokalisation in vegetativen Hyphen entspricht vermutlich der des ERs, was mit dem Eintreten des Proteins in den Sekretionsweg übereinstimmen würde. Dies zeigt, dass das SP für die Lokalisation von Proteinen in Foci an der Falleninnenseite verantwortlich ist. Die Unterschiede in der Lokalisation von SP-GFP in vegetativem Myzel und in Fallen deutet auf Unterschiede im Sekretionsweg in den Fallen hin.

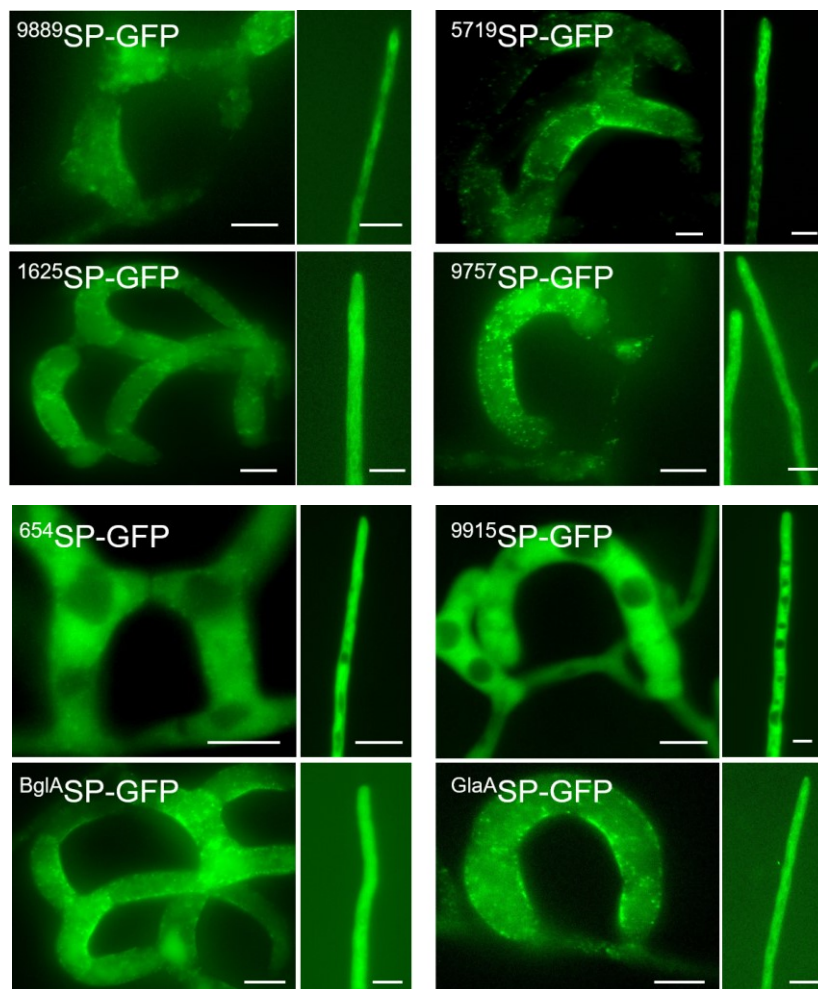


**Abbildung 16: Lokalisation von CyrA mit und ohne Signalpeptid.** *cyrA* wurde mit und ohne Signalpeptidsequenz unter dem konstitutiven *oliC* Promotor exprimiert und in Fallen, sowie in vegetativem Myzel lokalisiert. Die Fusion mit dem Volllänge-Protein lokalisierte in den dynamischen Pünktchen lediglich in den Fallen. In vegetativem Myzel war kein Signal erkennbar. Das Fusionsprotein

ohne Signalpeptid lokalisierte im Zytoplasma von Fallen und vegetativem Myzel. Ein Konstrukt aus GFP und der Sequenz, die für das 21 AS Signalpeptid von CyrA kodiert, wurde unter dem gleichen Promotor exprimiert. Das Signalpeptid allein ist ausreichend, um GFP in den fallenspezifischen, vesikelartigen Strukturen lokalisieren zu lassen. Im vegetativen Myzel waren hier ER-ähnliche Strukturen erkennbar. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Um die Sekretion von Virulenzfaktoren durch die Fallen weiter zu untersuchen, wurden die Signalpeptide acht weiterer Proteine mit GFP fusioniert (Abbildung 17). Sechs dieser Proteine wurden mittels EffektorP ebenfalls als putative Virulenzfaktoren vorhergesagt, zwei Proteine sind jeweils orthologe der beta-Glukanase (BglA) und der Glukoamylase (GlaA) und sollten der Literatur entsprechend an der Hyphenspitze sekretiert werden. Mit der Ausnahme eines Signalpeptids (dfl\_009915) führte die SP-GFP Fusion jedes SPs zur Lokalisation von GFP in dynamischen, vesikelartigen Strukturen in den Fallen und zeigte ebenso eine Akkumulation an der Fallennenseite. Dies war auch bei den Fusionsproteinen mit den Signalpeptiden der BglA und GlaA orthologen Proteine der Fall. Die Lokalisation im vegetativen Myzel unterschied sich in den verschiedenen Stämmen, wobei manche im ER lokalisierten und andere im Zytoplasma vorlagen. Dass die Lokalisation der SP-GFP Fusionen mit den BglA und GlaA Signalpeptiden der der Virulenzfaktor-Signalpeptiden entspricht, zeigt, dass die Lokalisation in den fallenspezifischen Vesikelstrukturen nicht auf ein konserviertes Motiv im Signalpeptid zurückzuführen ist. Stattdessen scheint das Lokalisationsmuster im Allgemeinen dem von Proteinen im Sekretionsweg in Fallen zu entsprechen. Dieses wiederum scheint sich von dem des vegetativen Myzels zu unterscheiden, wo die Fusionsproteine meist im ER lokalisierten. Da das ER keine ungewöhnliche Struktur in Fallen zeigte, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sich der Sekretionsweg in Fallen von dem in vegetativen Hyphen stark unterscheidet.

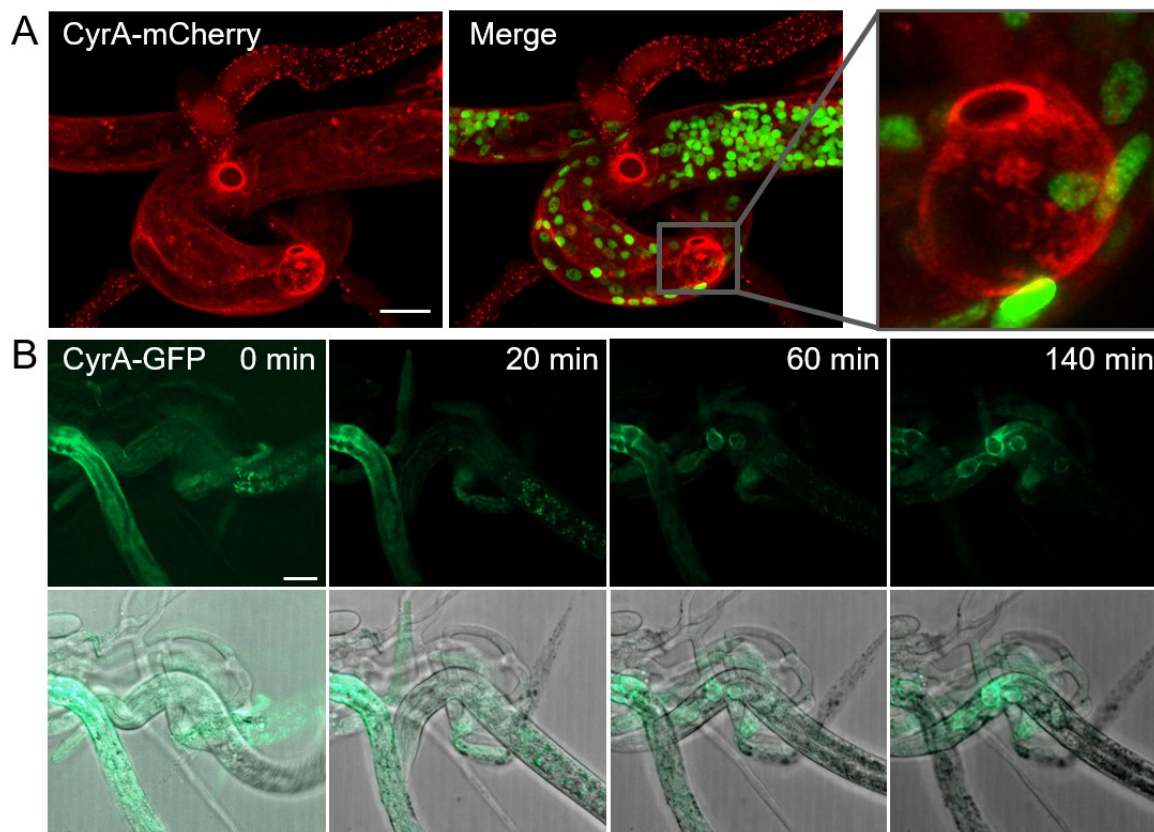




**Abbildung 17: Lokalisation der SP-GFP Fusionen diverser Proteine in Fallen und vegetativen Hyphen.** Die Signalpeptide sechs putativer Virulenzfaktoren und der beiden Enzyme GlaA und BglA wurden mit SignalP vorhergesagt und N-terminal an GFP fusioniert. Die Konstrukte wurden unter dem konstitutiven *oliC* Promotor exprimiert. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

## 2.7 CyrA wird an der Penetrationsstelle im Wirt sekretiert

Die beobachtete Lokalisation von CyrA veränderte sich, sobald Nematoden in den Fallen gefangen waren. Nun akkumulierte das Protein an der Infektionsstelle im Inneren der penetrierten Nematoden, in einer Struktur, die aufgrund ihrer runden Form auch Infektionsbulbus genannt wird (Abbildung 18 A). Langzeitaufnahmen zeigten, dass das Protein direkt nach der Paralyse der Würmer auftauchte, nachdem der Pilz die Kutikula penetriert hat (Abbildung 18 B). Unter Kontrolle des nativen Promotors war hauptsächlich die Lokalisation an der Infektionsstelle sichtbar, und nur noch wenige CyrA-mCherry Foci waren in den Fallen erkennbar. Dass nur wenig Protein in leeren Fallen zu beobachten war und es vor allem im Infektionsbulbus lokalisiert zeigt, dass CyrA offensichtlich eine Rolle in den ersten Schritten nach dem Eindringen des Pilzes in den Nematoden spielt.



**Abbildung 18: Akkumulation von CyrA-mCherry im Infektionsbulbus.** (A) Der CyrA-mCherry exprimierende *D. flagrans* Stamm wurde 24 h mit *C. elegans* Ban126 Ko-inkubiert. Eine Akkumulation des Fusionsproteins ist an den Infektionsstellen sichtbar. Die Vergrößerung zeigt die Akkumulation im Infektionsbulbus im Inneren des Nematoden. (B) Zeitlicher Verlauf der CyrA-GFP Lokalisation während der *D. flagrans* Attacke. Alle zwei Minuten wurde eine Aufnahme eines gefangenen Nematoden, der zu Beginn der Aufnahmen bereits gefangen war, im DIC und im GFP-Kanal gemacht. 20 Minuten nach Beginn der Aufnahme war der Nematode paralysiert, nach 60 Minuten war die Akkumulation des Fusionsproteins deutlich erkennbar. Maßstabsbalken = 10 µm.

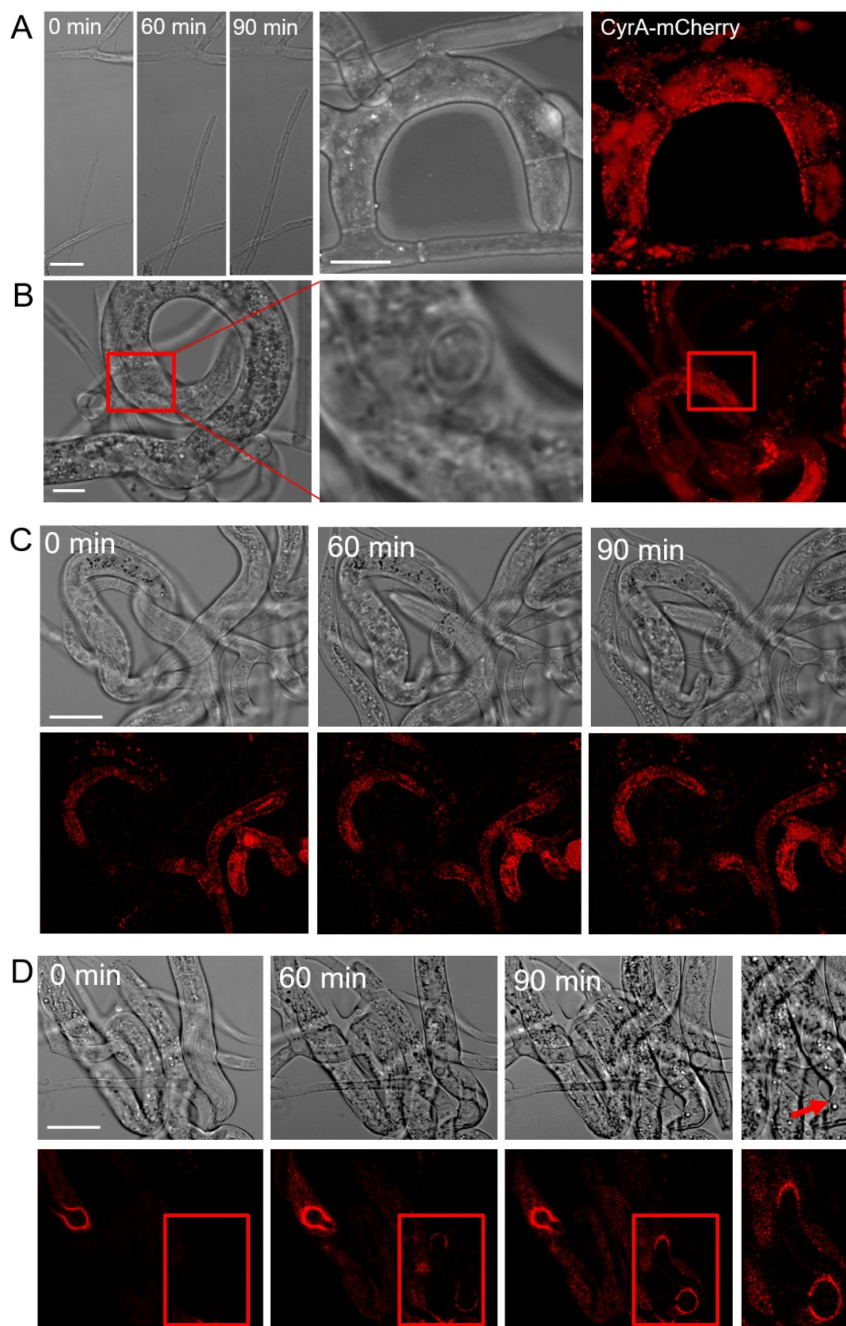
## 2.8 Brefeldin A inhibiert die Sekretion von Proteinen an der Infektionsstelle

Um den Mechanismus der Virulenzfaktor-Sekretion in den Fällen weiter zu untersuchen, wurde der *D. flagrans* Stamm sNH20 während der Interaktion mit *C. elegans* mit Brefeldin A (BFA, Sigma-Aldrich) behandelt. BFA inhibiert den konventionellen Sekretionsweg von ER über den Golgi-Apparat, sodass unkonventionell sekretierte Proteine identifiziert werden können (Arioka et al. 1991). *D. flagrans* wurde mit *C. elegans* auf einer dünnen Schicht LNA auf Objektträgern für 24 h bei 20 °C Ko-inkubiert. Um die Lokalisation von CyrA nach der BFA Behandlung nachvollziehen zu können, wurden mikroskopische Langzeitaufnahmen einzelner, gefangener Würmer gemacht. Für die Mikroskopie wurde die LNA-Schicht (0,5 cm x 0,5 cm) in einen 5 µl 50 µg/ml BFA Tropfen auf ein Deckglas überführt. Noch lebende

Würmer in Fallen wurden alle fünf Minuten für 90 Minuten beobachtet. Als Kontrolle wurden außerdem Aufnahmen des Stammes ohne BFA-Behandlung gemacht. Das Wachstum einer vegetativen Hyphse wurde verfolgt, um einen Einfluss von BFA auf das generelle Wachstum auszuschließen, ein solcher wurde nicht beobachtet (Abbildung 19 A). Die Lokalisation von CyrA-mCherry in den Fallen war unverändert, das Fusionsprotein war in dynamischen Pünktchen an der Fallenninnenseite zu finden. Starkes Signal war außerdem in den Vakuolen zu sehen (Abbildung 19 A). Die Langzeitbeobachtung gefangener Würmer zeigte, dass *D. flagrans* nach BFA Behandlung nicht mehr effizient in der Lage war, den Wirt zu penetrieren. Nach 90 Minuten waren die Würmer noch gefangen, bewegten sich aber zum Teil noch leicht und es konnte keine Penetrationsstellen oder trophische Hyphen im DIC-Kanal ermittelt werden. Zudem war keine Akkumulation des Fusionsproteins an der Infektionsstelle zu sehen (Abbildung 19 C). Vereinzelt waren auf den Proben Nematoden vorzufinden, welche bereits eine sichtbare Penetrationsstelle im DIC-Kanal zeigten, sowie Würmer, die nach 60 Minuten verdaut waren (Abbildung 19 B). Jedoch war auch hier in den meisten Fällen keine Akkumulation von CyrA-mCherry vorhanden und es konnte nicht definiert werden, ob die Penetration vor oder nach Behandlung mit BFA stattgefunden hatte. In der Kontrolle konnte im DIC Kanal bereits nach wenigen Minuten das Eindringen der Hyphen in die Nematoden beobachtet werden, kurz darauf trat das mCherry Signal des CyrA Fusionsroteins im Infektionsbulbus auf (Abbildung 19 D). Alles in allem deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Penetration der Würmer durch die Behandlung mit BFA zumindest teilweise inhibiert oder verzögert wird. In Anbetracht des Eingriffs des Inhibitors in den konventionellen Sekretionsweg könnte dies an einer Störung der Sekretion der für die Penetration benötigten, lytischen Enzyme, liegen. Diese Inhibition der Penetration erschwert die Beobachtung der Sekretion von CyrA, da diese erst im nächsten Schritt erfolgt. Es bedarf der Beobachtung von Nematoden, welche bereits kurz vor der Zugabe von BFA penetriert wurden, in denen der Infektionsbulbus jedoch noch nicht ausgebildet wurde. Einige Nematoden im entsprechenden Zustand konnten beobachtet werden und zeigten ebenfalls keine Akkumulation von CyrA im Infektionsbulbus. Da es jedoch schwierig ist, die Penetration zeitlich von der Bildung des Infektionsbulbus zu trennen und es sich hierbei um ein sehr kleines Zeitfenster handelt, ist es nicht möglich festzustellen, ob die Sekretion von CyrA wirklich direkt durch die BFA Zugabe inhibiert wurde. Die Daten deuten jedoch darauf hin, dass die



Sekretion von für die Virulenz essenziellen Proteinen an der Infektionsstelle durch BFA inhibiert wird.



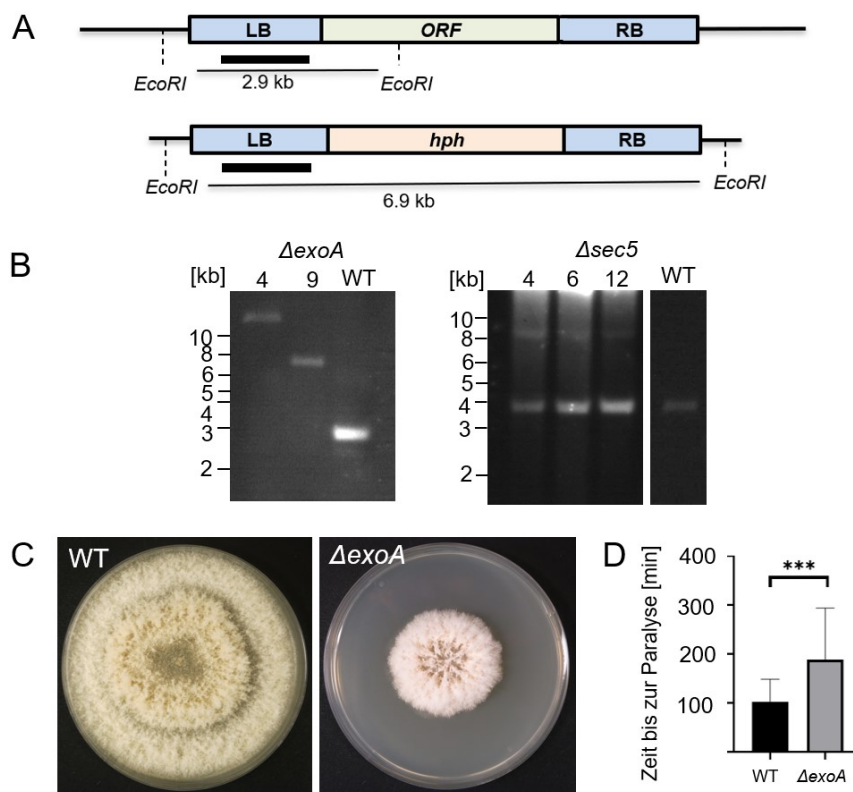
**Abbildung 19: Die Behandlung des *D. flagrans* Stammes sNH20 mit BFA inhibiert die Sekretion virulenzrelevanter Proteine. (A)** *D. flagrans* sNH20 wurde für 24 Stunden bei 28 °C mit *C. elegans* Koinkubiert und anschließend mit 5 µl 50 µg/ml BFA behandelt. Mikroskopisch wurde das Wachstum der vegetativen Hyphen und die Lokalisation von CyrA-mCherry in den Fallen überprüft. Hyphenwachstum und CyrA Lokalisation wurden durch den Inhibitor nicht beeinflusst. Maßstabsbalken = 20 µm; 10 µm **(B)** Die Penetration durch die Infektionshyphye ist im DIC-Kanal sichtbar (Vergrößerung, mittleres Bild), jedoch ist keine Akkumulation von CyrA-mCherry im Infektionsbulbus erkennbar. Die Eintrittsstelle ist mit einer roten Box markiert. Maßstabsbalken = 10 µm. **(C)** Eine Langzeitaufnahme von sNH20 nach BFA-Behandlung zeigt, dass nach 90 Minuten weder Eintrittsstellen noch Akkumulationen des CyrA-mCherry Fusionsproteins sichtbar sind. **(D)** Die Langzeitaufnahme der Kontrolle ohne BFA-Zugabe zeigt die Akkumulation von CyrA-mCherry im Infektionsbulbus nach 60 Minuten (rote Box, Vergrößerung Bild rechts). Maßstabsbalken = 20 µm.

## 2.9 Der Exocyst-Komplex ist an der Virulenz von *D. flagrans* beteiligt

In einigen pilzlichen Pathogenen, wie *M. oryzae* und *Colletotrichum orbiculare* konnte gezeigt werden, dass der Exocyst-Komplex an der Virulenz und Sekretion von Virulenzfaktoren beteiligt ist (Gupta et al. 2015; Giraldo et al. 2013). In *U. maydis* wiederum, hat die Deletion der entsprechenden Gene keinen Einfluss auf die Virulenz (Ludwig et al. 2021). Da *D. flagrans* während der Interaktion mit *C. elegans* eine Vielzahl an Proteinen sekretiert und die unterliegenden Mechanismen der Sekretion durch die Infektionshypothese der Falle noch unerforscht sind, sollte eine mögliche Rolle dieser Proteinkomplexe bei der Pathogenität von *D. flagrans* untersucht werden. Dazu sollten die *D. flagrans* Orthologe der beiden Exocyst-Komplex Proteine Exo70 (dfl\_000703, ExoA) und Sec5 (dfl\_000817, SecA) deletiert werden. Für die Deletion mittels homologer Rekombination wurden Plasmide erstellt, auf denen die Hygromycinresistenzkassette im Pjet1.2 Vektorrückgrad von 1 kb *upstream* und *downstream* Bereichen des jeweiligen Gens flankiert wird (Abbildung 20 A). Um die Sekretion des putativen Virulenzfaktors CyrA direkt in den Exocyst-Mutanten nachvollziehen zu können, wurde der *D. flagrans* Stamm sNH73, welcher *cyrA-mCherry* unter dem nativen Promotor exprimiert, mit den Plasmiden transformiert. Positive Transformanten wurden mittels Southern-Blot Analyse bestätigt. Die gDNA wurde dazu mit dem Enzym *EcoRI* geschnitten und die spezifische Hybridisierung der LB-Sonde für *exoA* und der RB Sonde für *secA* anhand des Bandenmusters im Vergleich zum Wildtypstamm überprüft. Im Falle von *exoA* hybridisierte die LB-Sonde im Wildtyp mit einem Fragment der Größe 2,9 kb und in einem der Transformanten (# 9), wie bei einer korrekten Integration in den Lokus erwartet, mit einem 6,9 kb Fragment (Abbildung 20 B). Der Southern-Blot der *sec5* Transformanten zeigte zwar die Hybridisierung der Sonde mit einem 8,4 kb Fragment, wie es für die korrekte Integration erwartet wurde, jedoch wiesen alle Transformanten eine zusätzliche Bande auf der für den Wildtyp erwarteten Höhe bei 3,3 kb auf (Abbildung 20 B). Somit war die Deletion von *exoA* erfolgreich (sNH60), es konnte aber lediglich ein heterokaryotischer *secA* Deletionsstamm generiert werden. Da die Deletion einiger Exocyst-Komponenten in manchen Pilzen letal ist, könnte dieses Ergebnis auf eine essenzielle Rolle von SecA in *D. flagrans* hindeuten.

Die  $\Delta$ *exoA*-Mutante zeigte beim Wachstum auf PDA einen starken Wachstumsphänotyp im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 20 C). Ein Virulenzassay basierend auf der mikroskopischen Langzeitbeobachtung des Infektionsvorgangs

wurde mit der  $\Delta exoA$  Mutante, wie für den  $\Delta cyrA$ -Stamm beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung zeigte, dass der Deletionsstamm mit 189 min [SD  $\pm$  105, n = 12] im Vergleich zum Wildtyp mit 103 min [SD  $\pm$  46, n = 35] deutlich länger für die Paralyse der Nematoden brauchte.



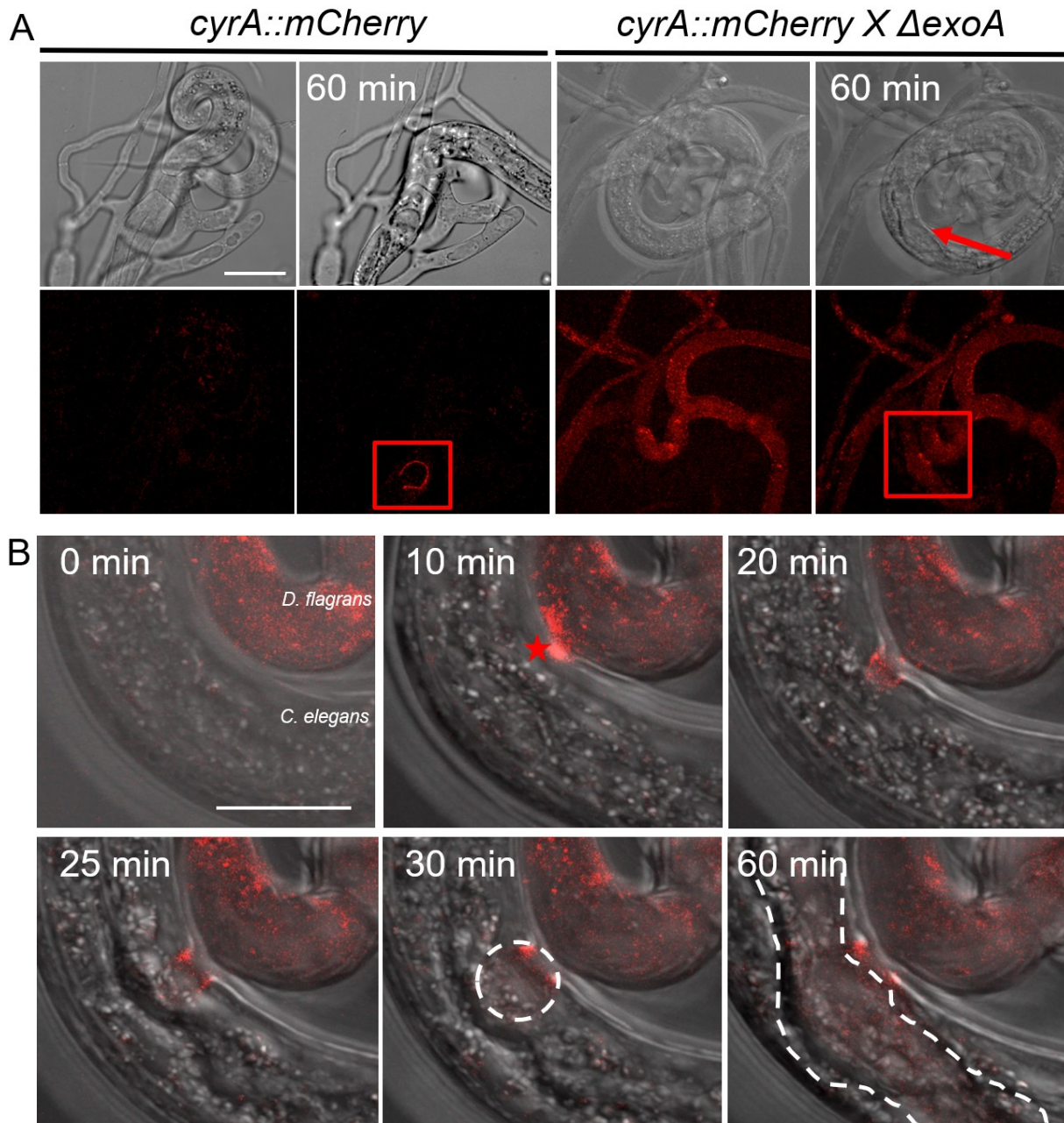
**Abbildung 20: Deletion von *exoA* in *D. flagrans*.** **A)** Schematische Darstellung der Deletionsstrategie von *exoA* mittels homologer Rekombination. Die Hygromycinresistenzkassette wurde von einer 1 kb *upstream* und *downstream* liegenden Regionen des Gens flankiert. Die Deletion wurde mittels Southern-Blot Analyse bestätigt. Dazu wurde die gDNA mit dem Enzym *EcoRI* geschnitten und nach dem Southern-Blot mit spezifischen Sonden für die *exoA* LB hybridisiert. **(B)** Transformant # 9 wies die erwartete Hybridisierung der Sonde mit einem 6,9 kb Fragment für die Deletion auf, im Wildtyp hybridisierte die Sonde mit einem 2,9 kb Fragment. Alle *secA* Transformanten wiesen sowohl eine Hybridisierung mit einem Fragment der Größe 3,3 kb wie für die Deletion erwartet auf, jedoch war zusätzlich ein Signal auf der Höhe des Wildtyp Lokus bei 8,4 kb erkennbar. **(C)** Die  $\Delta exoA$ -Mutante und der *D. flagrans* Wildtyp-Stamm wurden für sieben Tage bei 28 °C auf PDA inkubiert. Die Mutante weist einen Wachstumsphänotyp auf. **(D)** Für das Virulenz-Assay wurden der Wildtyp und der Mutantenstamm auf LNA-Objektträgern zusammen mit einer gemischten Population *C. elegans* N2 für 24 h bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine synchronisierte Population *C. elegans* Ban126 L4-Larven auf die Objektträger gegeben und alle vier Minuten eine mikroskopische Aufnahme einzelner Fallen gemacht. Die Zeit bis zur Paralyse wurde anhand dieser Daten ausgewertet und zeigte, dass die  $\Delta exoA$ -Mutante die Nematoden langsamer paralyisiert als der Wildtyp. Um die Signifikanz zu berechnen wurde ein t-Test durchgeführt.

Die Lokalisation von CyrA-mCherry in der *exoA*-Mutante wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 21). Während CyrA im Ausgangsstamm sNH73 die charakteristische Akkumulation an der Infektionsstelle aufweist, konnte diese im *exoA*-Deletionsstamm nicht beobachtet werden. Das

CyrA- mCherry Fusionsprotein lokalisierte weiterhin in dynamischen Pünktchen in den Fallen, es war jedoch kein Signal im Inneren von gefangenen Würmern zu erkennen, auch wenn die Infektionsstelle im DIC-Kanal klar erkennbar war. Langzeitaufnahmen des Infektionsprozesses dieser Stämme zeigten ebenfalls, dass in der *exoA*-Mutante kein Fusionsprotein im Infektionsbulbus akkumulierte, während die Akkumulation im Kontrollstamm sNH73 deutlich erkennbar war (Abbildung 21 A). Das Fusionsprotein schien zunächst an der Infektionsstelle zu akkumulieren, jedoch wurde es nach der erfolgreichen Penetration nicht in den Infektionsbulbus transloziert, sondern verweilte an der Außenseite der Infektionsstelle (Abbildung 21 B). Dies deutet auf eine Rolle des Exocyst-Komplex bei der Sekretion von Virulenzfaktoren in *D. flagrans* hin.

Die verlangsamte Paralyse geht mit der beeinträchtigten Akkumulation von CyrA im Infektionsbulbus einher, da der Gleiche Virulenzphänotyp auch bei der  $\Delta$ *cyrA* Mutante zu beobachten ist. Diese Beobachtung wurde durch eine im Laufe dieser Doktorarbeit betreuten Masterarbeit ergänzt, in der das für ein tSNARE Ortholog (*dfl\_009862*) kodierende Gen *ssoA* deletiert wurde (T. Grünwald). Diese Deletion führte zur Verlangsamung des Infektionsprozesses gemessen an der Zeit vom Fang bis zur Paralyse (Daten nicht gezeigt). Diese Daten verdeutlichen, dass der Exocyst- Komplex eine wichtige Rolle bei der Virulenz von *D. flagrans* spielt.





**Abbildung 21: CyrA-mCherry akkumuliert in der *exoA*-Mutante nicht mehr im Infektionsbulbus.** (A) Die *oliCP::cyrA::mCherry* exprimierende *exoA*-Mutante, sowie der sNH73 Kontrollstamm wurden für 24 Stunden bei 28 °C mit *C. elegans* Ko-inkubiert. Der Verlauf der Infektion einzelner Nematoden wurde mikroskopisch dokumentiert. Während im Stamm sNH73 nach einer Stunde trophische Hyphen den Nematoden bewachsen haben und die CyrA-mCherry Akkumulation im Infektionsbulbus deutlich erkennbar war, hat die *exoA* Mutante den Wirt ebenfalls befallen, es ist jedoch kein Fusionsprotein im Infektionsbulbus erkennbar. Die Eintrittsstelle ist jeweils mit einer roten Box markiert. Maßstabsbalken = 20 µm. (B) Vergrößerung der Penetrationsstelle der *ΔexoA*-Mutante aus (A). Nach 10 Minuten ist eine Akkumulation des CyrA-mCherry Fusionsproteins an der Infektionsstelle sichtbar (Stern). Nach 20 Minuten wurde die Kutikula durchdrungen und nach 30 Minuten war der Infektionsbulbus ausgebildet, jedoch war hier keine Akkumulation des Fusionsproteins erkennbar, das Signal verblieb außerhalb des Nematoden. Maßstabsbalken = 10 µm.

## 2.10 Etablierung eines Expressionssystems pilzlicher Virulenzfaktoren in *C. elegans*

Um die Funktion von Virulenzfaktoren während der Infektion aufzuklären und um mögliche Ziele des Proteins im Wurm zu identifizieren, können die entsprechenden Gene heterolog in den Nematoden exprimiert werden. Dafür wurde zunächst die Methode der Mikroinjektion von *C. elegans* im Labor etabliert. Die Transgene sollten als extrachromosomales Array exprimiert werden. Die Selektion findet dabei über die Ko-Injektion mit einem Marker Plasmid statt, welches zur Expression eines Fluorophors im Pharynx führt, die über den Promotor des *myo-2* Gens kontrolliert wird (*myo-2p::tdTomato* oder *myo-2p::GFP*). Für die effiziente Expression der Arrays wurden die Plasmide zunächst mittels Restriktionsverdau linearisiert und aufgereinigt. Anschließend wurde eine Konzentration von 5 ng/μl zusammen mit 5 ng/μl ebenfalls linearisiertem Marker-Plasmid, sowie 150 ng/μl der NEB 1 kb DNA-Leiter als Füll-DNA in einem Injektionsansatz gemischt. Etwa 10 Nematoden wurden zur weiteren Vorbereitung in einer Hypochlorid-NaOH-Lösung synchronisiert und die Nachkommen als junge Adulte in beide Gonaden injiziert. Individuen der F1-Generation, welche Fluoreszenz im Pharynx aufwiesen wurden vereinzelt und die F2-Generation als eine Linie definiert.

Für die heterologe Expression von *cyrA* in *C. elegans* wurden verschiedene Expressionsvektoren generiert und injiziert, welche die cDNA Sequenz des Gens in verschiedenen Varianten und unter Kontrolle diverser Promotoren enthalten. Um die Expression nachvollziehen zu können, jedoch auch eine funktionelle Beeinträchtigung eines Fusionsproteins auszuschließen, wurde CyrA sowohl ohne Fluorophor als auch als Fusionsprotein mit GFP unter verschiedenen Promotoren exprimiert (Tabelle 1). Zusätzlich wurde CyrA im jeweiligen Konstrukt mit und ohne Signalpeptid exprimiert. Nach der Infektion sollte das prozessierte Protein ohne SP die Wurmzellen erreichen, die Expression mit SP sollte jedoch eine Sekretion des Proteins durch die Wurmzellen ermöglichen, sollte das exprimierende Gewebe nicht das eigentliche Ziel des pilzlichen Proteins darstellen.

Zunächst musste ein geeigneter Promotor für die Expression des organismenfremden Gens gefunden werden. Da das Zielgewebe des Proteins unbekannt, und die Genexpression von *C. elegans* gewebespezifisch ist, wurden die verschiedenen Varianten mittels gewebespezifischer Promotoren in unterschiedlichen Zellen exprimiert und diese Stämme auf einen sichtbaren Phänotyp hin untersucht.

Hierbei wurde zunächst der ubiquitäre Promotor des Elongationsfaktors 1-Alpha (*eft-3*) getestet. Jedoch war das Expressionsmuster, gemessen an der Lokalisation des exprimierten Fusionsproteins zwischen den verschiedenen Linien variabel. Dies ist auf genetische Mosaikbildung und mitotische Instabilität der extrachromosomalen Arrays zurückzuführen (Herman et al. December 27, 2005). Da dadurch die Lokalisation der Expression nicht vorhersagbar ist, war dieser Promotor für weitere Analysen nicht geeignet.

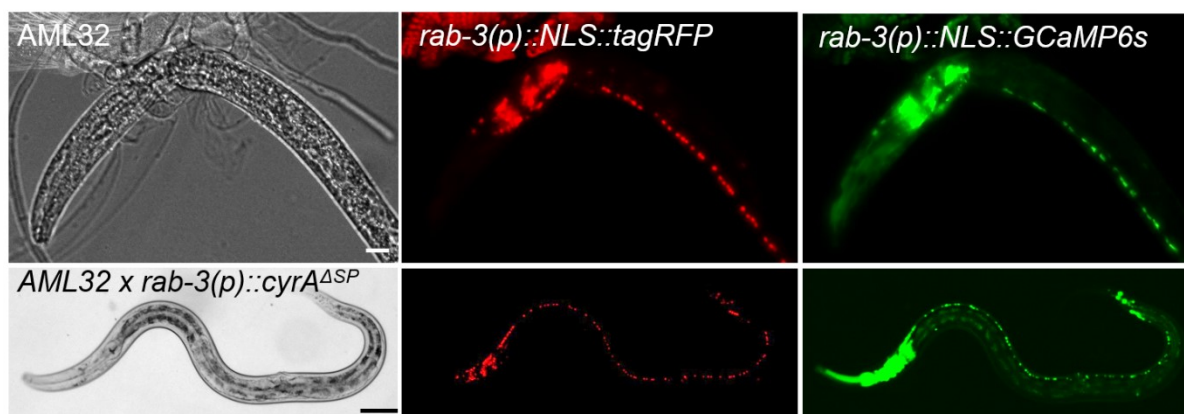
Um *cyrA* in möglichen Zielgeweben zu exprimieren, wurde die Expression im Darm (*elt-2*), in den Neuronen (*rab-3*, *unc-54*) und im Muskelgewebe (*unc-86*) getestet (Tabelle 1). Keiner der Stämme zeigte einen offensichtlichen Phänotyp.

**Tabelle 1: Liste der untersuchten Varianten der *cyrA* Expression in *C. elegans***

Promotor	Gewebe	Signalpeptid	Fluorophor	Stamm
<i>eft-3</i>	Ubiquitär	+	GFP	N2
<i>eft-3</i>	Ubiquitär	-	GFP	N2
<i>unc-86</i>	Muskel	-	-	N2
<i>unc-54</i>	Neuronen	-	-	N2
<i>rab-3</i>	Neuronen	-	-	AML32
<i>elt-2</i>	Darm	-	-	N2
<i>hsp-16.48</i>	Ubiquitär	+	Scarlet	N2, GS2478
<i>hsp-16.48</i>	Ubiquitär	-	Scarlet	N2, GS2478
<i>hsp-16.48</i>	Ubiquitär	+	-	N2, GS2478
<i>hsp-16.48</i>	Ubiquitär	-	-	N2, GS2478
<i>col-19</i>	Hypodermis	+	GFP	N2, GS2478
<i>col-19</i>	Hypodermis	-	GFP	N2, GS2478
<i>col-19</i>	Hypodermis	+	-	N2, GS2478
<i>col-19</i>	Hypodermis	-	-	N2, GS2478

Neuronen können einen möglichen Angriffspunkt von Virulenzfaktoren darstellen. In *Pleurotus ostreatus* wurde gezeigt, dass wenige Minuten nach Kontakt mit den Hyphen die Paralyse eintritt und dies mit der Nekrose diverser Neuronen einhergeht (Lee et al.

2020). Nekrose der Neuronen kann anhand ihrer Fragmentierung und mit Hilfe des Kalziumindikators GCaMP6 festgestellt werden (Nakai et al. 2001). Um zu überprüfen, ob die Nekrose der Neuronen auch während der *D. flagrans* Infektion eine Rolle spielt und ob die Neuronen durch die neuronale Expression von *cyrA* beschädigt werden, wurde *cyrA* ohne SP und ohne Fluorophor unter Kontrolle des pan-neuronalen Promotors des *rab-3* Gens im *C. elegans* Stamm AML32 exprimiert (Abbildung 22). Dieser Stamm exprimiert *GCaMP6* und *tagRFP* jeweils mit einer NLS ebenfalls unter dem *rab-3* Promotor (*rab-3p::NLS::GCaMP6s* + *rab-3p::NLS::tagRFP*). Außerdem wurde die Fluoreszenz der Neuronen im AML32 Stamm während der *D. flagrans* Infektion beobachtet. Während der Infektion war das Fluoreszenzsignal der Zellkerne im direkten Kontakt mit der Infektionsstelle verringert. Dies deutet jedoch lediglich auf den Zelltod in diesem Bereich hin. Eine systematische Fragmentierung der umliegenden Neuronen konnte nicht beobachtet werden. Auch der *cyrA* exprimierende Stamm wies keine sichtbare Veränderung auf, die Fluoreszenz der neuronalen Zellkerne und des Kalziumindikators war hier unverändert. Dies deutet darauf hin, dass der Mechanismus der von *D. flagrans* induzierten Paralyse sich von dem in *P. ostreatus* beobachteten unterscheidet. Außerdem wurden die Neuronen als direkter Angriffspunkt von *CyrA* ausgeschlossen.



**Abbildung 22: Interaktion von *D. flagrans* mit dem *C. elegans* Stamm AML32.** Oben: Der *C. elegans* Stamm AML32, der sowohl *tagRFP* als auch *GCaMP6s* mit einer NLS in den Neuronen exprimiert, wurde für 24 h mit *D. flagrans* ko-inkubiert und die Fluoreszenz der Marker in gefangenen Nematoden beobachtet. Nur an der direkten Interaktionsstelle war kein Signal mehr zu beobachten, die Zellkerne der umliegenden Neuronen waren intakt. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ . Unten: *cyrA* wurde ohne Signalpeptidsequenz unter Kontrolle des neuronalen *rab-3* Promotors im *C. elegans* Stamm AML32 exprimiert. Die Zellkerne der Neuronen waren weiterhin intakt. Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

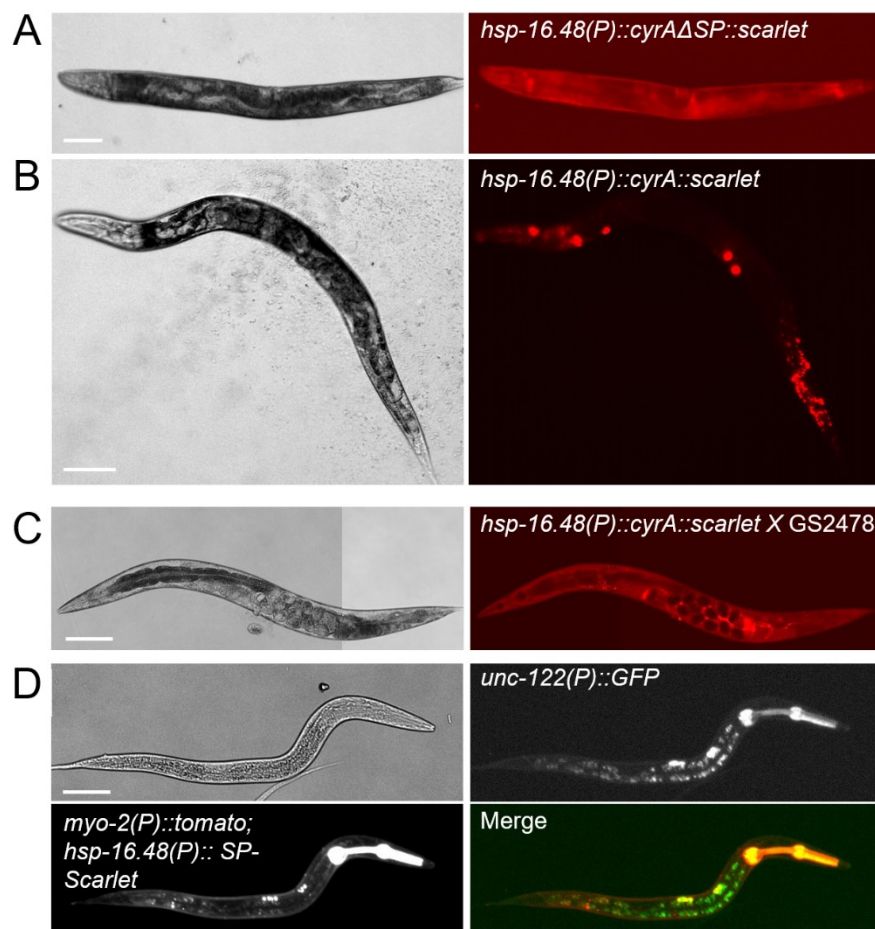
Um die Expression im Falle eines möglicherweise fatalen Phänotyps steuern zu können, wurde *cyrA* weiterhin unter dem Hitzeschock regulierbaren *hsp-16.48*



Promotor exprimiert (Abbildung 23). Transgene Linien, die *hsp-16.48p::cyrA::scarlet::unc-54UTR* und *hsp-16.48p::cyrA::unc-54UTR* als extrachromosomales Array exprimierten wurden mit *myo-2p::GFP* als Ko-Marker erstellt. *myo-2p::GFP* führt zur grünen Fluoreszenz des Pharynx für die Selektion positiver Transformanden. Ein *hsp-16.48p::scarlet::unc-54UTR* exprimierender Stamm wurde als Kontrolle generiert. Um die Genexpression zu induzieren, wurden die Stämme für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die Induktion des Promotors wurde unter einem Fluoreszenz-Stereomikroskop beobachtet. Im Kontrollstamm und dem Stamm ohne Signalpeptid war das Fluoreszenzsignal gleichmäßig, dem *hsp-16.48*-Promotor Expressionsprofil entsprechend, verteilt (Abbildung 23 A). Der Stamm der *cyrA* mit der Signalpeptidsequenz exprimierte wies Akkumulationen des Fusionsproteins in spezifischen Bereichen der Würmer auf (Abbildung 23 B). Diese Lokalisation entsprach der in der Literatur beschriebenen Lokalisation von Coelomocyten. Dabei handelt es sich um große, mesodermale *Scavenger*-Zellen, die Flüssigkeit in der Körperhöhle (Pseudocoel) mittels Endozytose aufnehmen (Fares und Greenwald 2001). Das sekretierte Fusionsprotein schien von den Coelomocyten aufgenommen und abgebaut zu werden. Da die Coelomocyten unspezifisch alle Proteine im Pseudocoel aufnehmen, akkumulieren auch sekretierte Fluorophore in diesen Zellen. Um zu zeigen, dass die Sekretion durch das CyrA Signalpeptid zur Lokalisation im Pseudocoel und zur anschließenden Aufnahme durch die Coelomocyten führt, wurde der Fluorophor Scarlet mit dem CyrA Signalpeptid fusioniert und in *C. elegans* zusammen mit dem Coelomocyten-Marker *unc-122P-GFP* exprimiert (Abbildung 23 D). Es konnte eine Ko-lokalisierung der beiden Proteine beobachtet werden, welche die Funktionalität des CyrA SPs in *C. elegans* aufzeigt und die Aufnahme der so exprimierten Proteine durch die Coelomocyten bestätigt.

Um die Rolle der Coelomocyten zu untersuchen, wurde das gleiche Konstrukt mit SP in einem *C. elegans* Stamm exprimiert, in dem die Endozytose der Coelomocyten nichtmehr funktionell ist. Dieser Stamm (GS2478; *myo-3p::ssGFP* + *dpy-20(+)*) weist eine Mutation im Endozytose-relevanten Gen *cup-8* auf (*coelomocyte uptake deficient*). Die Fluoreszenz des Fusionsproteins mit SP lag in diesem Stamm gleichmäßig verteilt vor (Abbildung 23 C), was bestätigte, dass es sich bei der im Wildtyp beobachteten Lokalisation um die Akkumulation in den Coelomocyten handelte. Zunächst schien es möglich, dass der Abbau des pilzlichen Proteins durch die Coelomocyten mit seiner Funktion im Wurm interferiert, jedoch zeigte auch der

Coelomocyten defiziente Stamm keinen offensichtlichen Phänotyp. Allerdings könnte die Beobachtung eines möglichen Phänotyps in diesem System auch durch die Verwendung des Hitzeschock-Promotors erschwert werden, da ein Hitzeschock allein bereits zu Verhaltens und Aussehens-Veränderungen der Würmer führt. Weiterhin führt der Hitzeschock zur differentiellen Expression zahlreicher Gene, von denen viele auch an der Immunität beteiligt sind.



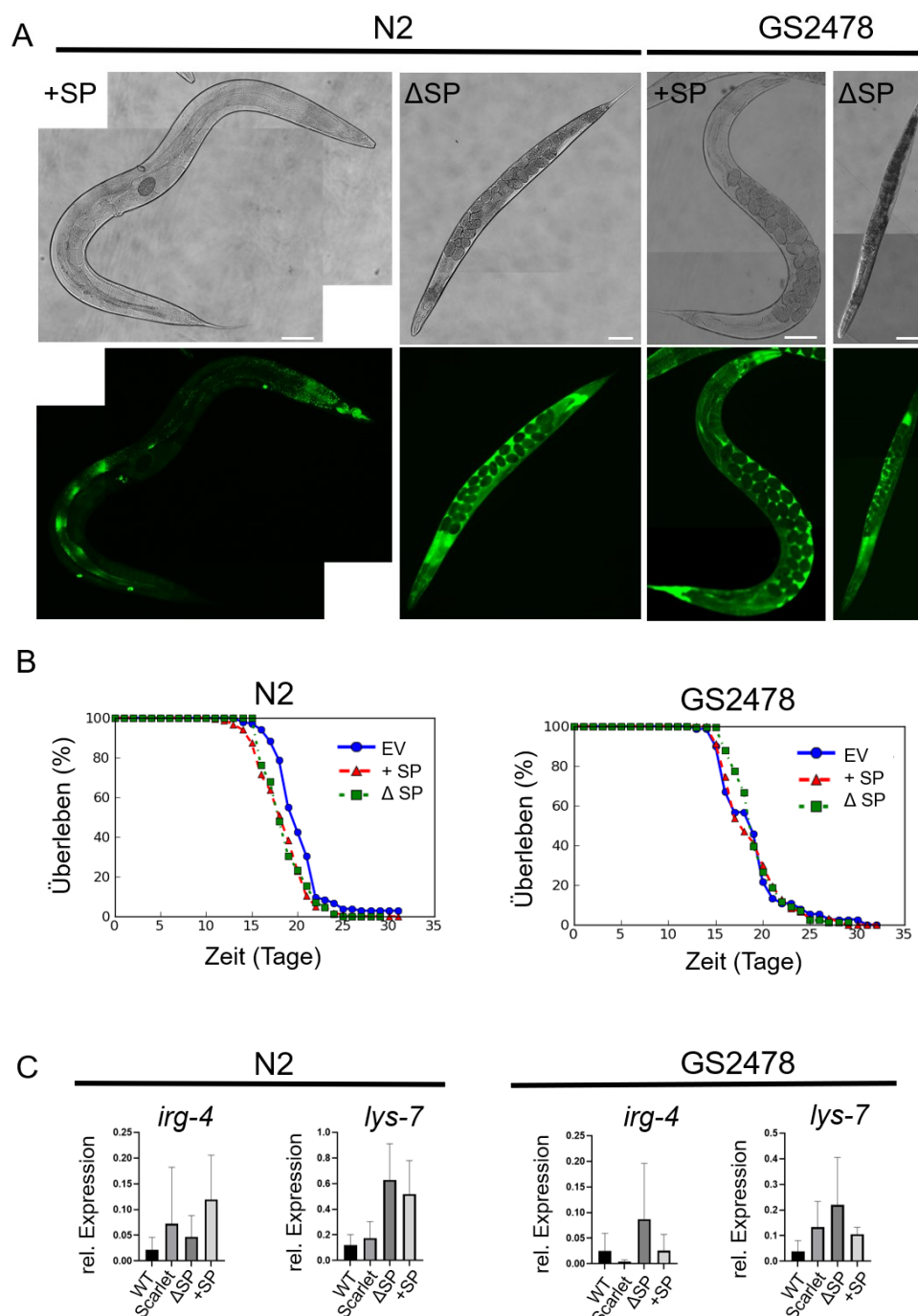
**Abbildung 23: Die Expression von *cyrA* mit Signalpeptidsequenz führt zur Akkumulation des Proteins in den Coelomocyten.** Die cDNA Sequenz von *cyrA* wurde unter Kontrolle des hitzeinduzierbaren *hsp-16.48* Promotors mit Signalpeptidsequenz (**B, C**) und ohne (**A**) in *C. elegans* exprimiert. Für die Induktion des Promotors wurden die Nematoden eine Stunde bei 37 °C inkubiert. (**A**) *CyrA* ohne SP lokalisierte gleichmäßig in der Hypodermis. (**B**) Die Expression des Konstrukts mit SP im N2 Wildtypstammhintergrund führte zur Akkumulation von *CyrA* in spezifischen Regionen des Nematoden-Körpers. (**C**) Das gleiche Konstrukt mit Signalpeptidsequenz wurde im Stamm GS2478 exprimiert, in dem die Coelomocyten funktionsunfähig sind. Das Fluoreszenzsignal war hier gleichmäßig verteilt. (**D**) Der Fluorophor Scarlet wurde mit dem SP von *CyrA* fusioniert und die Sekretion führte zur Akkumulation in Coelomocyten, gezeigt durch die Ko-Lokalisation mit GFP welches unter Kontrolle des in Coelomocyten aktiven *unc-122* Promotors stand. Maßstabsbalken = 10 µm

Während der Infektion von *C. elegans* penetriert *D. flagrans* zunächst die Kutikula des Wurms und trifft danach auf die Hypodermis. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Hypodermis ein mögliches Ziel von *CyrA* darstellt, vor allem da *C. elegans* mit einer

epidermalen Immunantwort auf pilzliche Infektionen reagiert. Daher wurde CyrA mit und ohne SP, sowie mit und ohne GFP unter dem hypodermalen *col-19* Promotor (*cuticle collagen-19*) in N2 und GS2478 Würmern zusammen mit dem Ko-Marker *myo-2P::tdTomato* exprimiert. Transgene Tiere, die *cyrA-GFP* als extrachromosomales Array exprimierten wiesen im adulten Entwicklungsstadium grüne Fluoreszenz in der Epidermis auf, welche dem Expressionsprofil des Promotors entspricht (Abbildung 24 A). Im N2-Stammhintergrund war bei der Expression mit SP die Akkumulation in den Coelomocyten erkennbar, im GS2478 Stammhintergrund war der Fluorophor gleichmäßig verteilt. Die transgenen Nematoden, die CyrA ohne GFP exprimierten, wiesen keinen offensichtlichen Phänotyp auf.

Da die Expression von *cyrA* einen subtilen Effekt haben könnte, der sich nicht in einem dramatischen Phänotyp äußert, wurden Lebensdauer-Analysen der Stämme mit und ohne SP (ohne GFP-Reporter) durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der heterologen Expression des Virulenzfaktors auf die Langlebigkeit der Würmer zu untersuchen. Als Kontrolle wurde der Leervektor zusammen mit dem gleichen Marker Plasmid injiziert. Jeweils 30 adulte Individuen der verschiedenen Stämme wurden auf drei Petrischalen mit NGM-Medium und OP50 Bakterien als Futterquelle überführt. Das Medium enthielt zusätzlich 150  $\mu\text{M}$  5'Fluorodeoxyuridin (FudR), um die Bildung von Nachkommen zu verhindern. Die Nematoden wurden täglich überprüft und Würmer die nichtmehr auf Berührung reagierten als tot ermittelt. Das Experiment wurde zweimal mit jeweils 90 Nematoden wiederholt. Die Kaplan-Meier-Schätzung wurde angewandt, um die Fraktion der überlebenden Nematoden nach einer bestimmten Zeit widerzugeben und so einen Vergleich der Lebenszeit der Stämme zu ermöglichen. Die gewonnenen Daten ergaben, dass die *cyrA* exprimierenden Würmer im N2-Stammhintergrund mit SP ( $p\text{-Wert} = 1.2\text{e-}06$ ) und ohne SP ( $p\text{-Wert} = 0.0001$ ) eine etwas kürzere Lebensdauer als die Leervektor Kontrolle aufwiesen (Abbildung 24 B). Dies war sowohl bei der Expression mit, als auch ohne Signalpeptidsequenz, zu beobachten. Die Verringerung der Lebenszeit lässt nicht direkt auf die Funktion von CyrA schließen, da die Interaktion zwischen *C. elegans* und *D. flagrans* innerhalb weniger Stunden abgeschlossen ist. Jedoch zeigt die Verkürzung der Lebenszeit, dass das Protein möglicherweise die Physiologie der Tiere negativ beeinflusst. Dies könnte mit einem direkten oder indirekten Einfluss von CyrA auf die Expression von Immunitätsgenen bzw. der Induktion der Immunantwort zusammenhängen, die wiederum an den Alterungsprozessen beteiligt ist. Dass im GS2478

Stammhintergrund keine Veränderung der Lebensdauer im Vergleich zur Leervektorkontrolle erkennbar war, könnte auf eine Rolle der Coelomocyten bei der für die Alterung benötigten Signalwege hindeuten. Vor allem da bereits ein Einfluss dieser Zellen auf die Langlebigkeit bekannt ist (Park und Park 2017).



**Abbildung 24: Die Expression von *cyrA* in der Hypodermis verringert die Lebensdauer von *C. elegans*.** (A) Die cDNA von *cyrA* wurde mit und ohne Signalpeptidsequenz unter Kontrolle des hypodermalen, adult spezifischen *col-19* Promotors in *C. elegans* N2 und GS2478 exprimiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen adulter Tiere zeigten die Akkumulation in Coelomocyten des Proteins mit SP im N2 Wildtypstammhintergrund und eine gleichmäßige Fluoreszenz des

Fusionsproteins ohne SP, sowie im GS2478 Stammhintergrund. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ . **(B)** Ein Überlebensassay wurde durchgeführt, indem jeweils 30 L4-Larven auf NGM-Medium mit 150  $\mu\text{M}$  FudR überführt, und täglich auf ihr Überleben hin untersucht wurden. Das Experiment wurde zweimal im biologischen Triplikate durchgeführt. Die Kaplan-Meyer-Schätzung ergab eine verringerte Lebensdauer der Stämme, die CyrA mit (p-Wert =  $1.2\text{e-}06$ ) und ohne SP (p-Wert = 0.0001) im N2-Stammhintergrund exprimierten. Die Kaplan-Meyer-Kurve wurde mit OASIS erstellt (Yang et al. 2011b) und der P-Wert wurde mit dem Log-Rank-Tests ermittelt. **(C)** Relative Expression der Immunitätsmarker-Gene *irg-4* und *lys-7* in den *cyrA* exprimierenden *C. elegans* Stämmen mit und ohne SP und im *col-19(p)::scarlet* exprimierenden Kontrollstamm, normalisiert mit Aktin. Es wurde keine signifikante Induktion der beiden Gene festgestellt.

Da die verkürzte Lebenszeit der *cyrA*-exprimierenden *C. elegans* Stämme mit einer Induktion der Immunantwort in Zusammenhang stehen könnte, sollte exemplarisch die Expression von *irg-4*, welches unter Kontrolle des p38 MAP-Kinaseweges steht und *lys-7*, welches vom Insulinsignalweg kontrolliert wird, mittels qRT-PCR getestet werden. Die Auswertung der qRT PCR ergab keinen signifikanten Anstieg der Expression der *cyrA*-exprimierenden Stämme im Vergleich zu den Kontrollen. Eine Induktion anderer *downstream*-Gene der beiden Immunitäts-Signalwege durch *cyrA* ist jedoch nicht ausgeschlossen.

### 3 Diskussion

Pilzliche Pathogene sekretieren Virulenzfaktoren und Effektorproteine, um die Infektion zu etablieren und die Wirtsabwehr zu überwinden. Während zahlreiche dieser Virulenzfaktoren pflanzenpathogener Pilze wie *U. maydis* oder *M. oryzae* im Detail beschrieben sind und ihre Funktion aufgeklärt wurde, sind viele der von Nematodenfangenden Pilzen sekretierten Proteine noch unerforscht. Es ist nur wenig über die Waffen bekannt, welche die karnivoren Pilze bei der Interaktion mit den Nematoden nutzen, obwohl *C. elegans* als Modellorganismus für zahlreiche menschliche Krankheiten gilt und solche Analysen daher ein großes Lernpotential für viele Forschungsgebiete abdecken könnten. Transkriptom- und Sekretomanalysen von NFP während der Interaktion mit dem Wirt zeigen, dass diese Pilze ein großes Arsenal pathogenitätsrelevanter Proteine besitzen, die bisher jedoch nur bioinformatisch analysiert wurden. Auch das Sekretom von *D. flagrans* enthält zahlreiche Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Virulenz spielen können, wie in einer vorhergehenden Publikation und in dieser Arbeit gezeigt wurde (Youssar et al. 2019). Unter den 638 als sekretiert vorhergesagten Proteinen befinden sich 249 kleine Proteine (SSPs), von denen 170 hier zusätzlich als cysteinreich identifiziert wurden (cysteinreiche sekretorische Proteine, CRISPs) (Lu und Edwards 2016). Die Analyse solcher CRISPs resultierte unter anderen in pathogenen Pilzen wie *Fusarium graminearum* und *Verticillium dahliae* in der Identifikation von Effektorproteinen (Zeng et al. 2018; Wang et al. 2020). Auch die Analyse von Aminosäure-Mustern kann auf Proteine, die an der Virulenz beteiligt sind, hindeuten. Eine solche konservierte Abfolge der Cysteinreste weisen beispielsweise Proteine der CAP-Superfamilie (*cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins*) auf, die an der Virulenz einiger pilzlicher Pathogene beteiligt sind. Wie für viele andere cysteinreiche Proteine ist die genaue Funktion der CAP-Domänen-Proteine jedoch nicht geklärt, sie sind vermutlich am Sterol-Export beteiligt (Schneiter und Di Pietro 2013). Auch in dem zellwand-modifizierenden *U. maydis* Kerneffektor Sta1 ist die Abfolge der Cysteine konserviert (Tanaka et al. 2020). Damit stellen die hier identifizierten 17 Cluster mit Ähnlichkeiten in der Cysteinabfolge eine solide Grundlage für weitere Analysen von Virulenzfaktoren dar.

Im Laufe dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwiefern SSPs eine Rolle bei der Virulenz von NFP spielen. Dazu wurde ein putativer Virulenzfaktor von *D. flagrans*

charakterisiert, um so einen ersten Eindruck über einen kleinen Teil der Infektionsstrategie des NFP zu erhalten. Es wurden weiterhin Methoden im Labor etabliert, die zukünftig schnelle Analysen von kleinen, sekretierten Proteinen erlauben.

Das cysteinreiche Protein CyrA ist ein kleines sekretiertes Protein, das ausschließlich während der pathogenen Lebensphase von *D. flagrans* exprimiert wird. Dies wurde anhand von Expressionsanalysen mittels qRT-PCR und einem Promotorfusions-Reporterassay gezeigt. Die Deletion des Gens hatte einen negativen Einfluss auf die Virulenz nach der Fallenbildung, was auf eine Funktion des Proteins in den ersten Schritten der Attacke hindeutet.

Da in CyrA keine konservierten Domänen zu finden sind und es auch in der Cluster-Analyse der Cystein-Anordnung unter den Singletons ohne Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen war, gibt die Struktur des Proteins keinen Hinweis auf seine Funktion. Der cysteinreiche C-Terminus und die im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen jedoch, dass CyrA eine Funktion bei der Virulenz erfüllt.

### **3.1 Die Lokalisation von Virulenzfaktoren erlaubt eine räumlich-zeitliche Einordnung der Funktion in das Infektionsgeschehen**

Die Lokalisation des CyrA-mCherry Fusionsproteins zeigte, dass CyrA vor allem im Infektionsbulbus im Inneren des Nematoden nach der Penetration akkumuliert. Diese rundliche Struktur wird während der Penetration durch lytische Enzyme und hohen osmotischen Druck ausgebildet und stellt die erste direkte Kontaktstelle zwischen der pilzlichen Hyphe und den Nematoden-Zellen dar, nachdem die Kutikula durchdrungen wurde (Veenhuis et al. 1989). Es ist naheliegend, dass die Proteine, die hier sekretiert werden, eine wichtige Rolle bei der Überwindung der ersten Wirtsabwehrreaktionen spielen. Bei den später von den trophischen Hyphen sekretierten Proteinen, handelt es sich vor allem um Enzyme für die Zersetzung des Gewebes und die Nährstoffaufnahme (Veenhuis et al. 1989; Veenhuis et al. 1985b). Aufnahmen von CyrA zu späteren Zeitpunkten der Infektion zeigten keine Fluoreszenz der vom Infektionsbulbus ausgehenden trophischen Hyphen. Dies unterstützt die Hypothese, dass CyrA während der ersten Schritte der Interaktion relevant ist. Proteine wiederum, die in den initialen Schritten während der Adhäsion und Penetration, noch vor der Bildung des Infektionsbulbus eine Rolle spielen, lokalisieren vermutlich eher an der Infektionsstelle als im Infektionsbulbus im Inneren der Nematoden. Eine solche

Lokalisation von Enzymen und Adhäsionsmolekülen wurde bereits in frühen Studien beschrieben (Veenhuis et al. 1985b; Veenhuis et al. 1985a). Dies ging auch aus weiteren Untersuchungen im Labor hervor, wo gezeigt wurde, dass der putative Virulenzfaktor NipA in leeren Fallen zunächst wie CyrA in vesikelartigen Strukturen an der Fallenninnenseite akkumulierte. Bei der Interaktion mit *C. elegans* war eine deutliche Akkumulation des NipA-Fusionsproteins an der Infektionsstelle, und nicht im Infektionsbulbus sichtbar (Jennifer Menzner 04/2020). Eine solche stadienspezifische Lokalisation von Effektorproteinen wurde auch in *Colletotrichum higginsianum* mikroskopisch beobachtet (Kleemann et al. 2012). Die Lokalisation ging hier mit der Expression der Gene einher, die in fünf stadienspezifischen Wellen beobachtet wurde. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Fusion von Virulenzfaktoren mit fluoreszenten Proteinen eine zeitlich-räumliche Einordnung ihres Auftretens während der Infektion erlaubt und dadurch auf ihre Rolle während der Interaktion hindeuten kann.

### 3.2 Der Sekretionsweg in Fallen

In leeren Fallen lag das CyrA-mCherry Fusionsprotein in dynamischen, vesikelartigen Strukturen vor, welche an der Fallenninnenseite akkumulierten. Solche zytoplasmatischen und elektronendichten Partikel in den Fallen wurden bereits in frühen elektronenmikroskopischen Studien von *Dactylella ellipospora* und *A. oligospora* beschreiben (Kojima und Saikawa 2002). Jedoch liegen keine weiteren Analysen über die verschiedenen Vesikelpopulationen in den Fallenstrukturen von NFP vor. Die Lokalisation bekannter Vesikelpopulationen und Organellen in *D. flagrans* zeigte, dass es sich bei diesem distinkten Lokalisationsmuster um keine beschriebene Struktur handelt. Obwohl die Forschung der Proteinexportmechanismen in Pilzen in den letzten Jahren expandiert ist, sind hier noch viele Fragen und Mechanismen ungeklärt. Extrazelluläre Vesikel beispielsweise sind in filamentösen Pilzen noch kaum erforscht (Rodrigues et al. 2011; Panstruga und Dodds 2009). Daher ist es nicht auszuschließen, dass Virulenzfaktoren Nematoden-fangender Pilze in fallenspezifischen Vesikeln transportiert werden. Dies ist auch in Anbetracht der einzigartigen Physiologie der Fallen wahrscheinlich, da es sich um gekrümmte Zellen handelt, die physiologisch distinkt von den vegetativen Zellen sind und bis zur Ausbildung der Penetrationshyphe keine klassische Spitze für die Sekretion besitzen. In Anbetracht dessen, ist vor allem die Akkumulation des CyrA-Fusionsproteins an der



Innenseite der Fallen interessant. Es scheint, als wüsste die Zelle bereits, wo die Proteine sekretiert werden sollen, bevor ein Wurm gefangen und eine Penetrationshyphse gebildet wurde. Bleibt ein Wurm an der Außenseite einer Falle kleben, wird das Fusionsprotein interessanterweise zur eigentlichen Penetrationsstelle transportiert. Frühe Studien beschreiben einen solchen Transport elektronendichter Vesikel zur Kontaktstelle, die zuvor gleichmäßig verteilt im Zytoplasma vorliegen in *D. ellipsospora* (Kojima und Saikawa 2002). Dieser Pilz nutzt zwar adhäsive Knoten und keine dreidimensionalen Fallennetzwerke, die unterliegenden, jedoch noch ungeklärten Mechanismen könnten allerdings die Gleichen sein wie sie für CyrA beobachtet wurden. Dass das beschriebene Lokalisationsmuster auch bei anderen Virulenzfaktor-Kandidaten im Labor zu beobachten ist, deutet außerdem auf einen allgemeinen Mechanismus für den Virulenzfaktor-Transport in Fallen hin. Weiterhin zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Effektorkomplexes in *U. maydis* ein ähnliches Lokalisationsmuster in vesikelartigen Pünktchen. Hierbei handelt es sich um einen Komplex aus sieben Effektoren, deren Interaktion mittels Massenspektrometrie gezeigt wurde (Ludwig et al. 2021). Die Suche nach Interaktionspartnern von CyrA in *D. flagrans* könnte zukünftig Aufschluss über einen ähnlichen gemeinsamen Transport von Virulenzfaktoren in Fallen geben.

Trotz der Expression des Fusionskonstrukts unter einem konstitutiven Promotor war kein Fluoreszenzsignal in vegetativen Hyphen sichtbar, vermutlich wurde es hier abgebaut. Die Deletion des Signalpeptids führte zu einer zytoplasmatischen Lokalisation in den Fallen und ebenso im vegetativen Myzel, die Spezifität der Lokalisation in den Fallen war hier somit nicht mehr gegeben. Die Fusion des 21 AS Signalpeptids von CyrA mit GFP führte zu einer ähnlichen Lokalisation wie der des volllänge-Proteins in den vesikelartigen Strukturen in den Fallen, jedoch lag die SP-GFP Fusion im vegetativen Myzel in ER-artigen Strukturen vor und keine Vesikel waren an den Hyphenspitzen erkennbar. Diese Beobachtungen deuten auf Unterschiede des Sekretionsweges zwischen Fallen und vegetativem Myzel hin. Proteine mit einem Signalpeptid werden normalerweise beim Eintritt in den Sekretionsweg in das ER transloziert. In *S. cerevisiae* wurde GFP mit verschiedenen Signalpeptiden fusioniert und die Lokalisation mikroskopisch untersucht. Hier war das GFP-Signal in den meisten Fällen im ER zu beobachten und teilweise in Vakuolen oder dem Golgi-Apparat (Li et al. 2002).

Eine Untersuchung in Säugetierzellen zeigte ein ähnliches Phänomen bei der Lokalisation einer Signalpeptid-GFP Fusion. Hier war ein SP ebenfalls ausreichend, um GFP in regulierte sekretorische Granula zu lotsen. Diese Vesikel sind Aufbewahrungskompartimente für sekretorische Proteine in neuroendokrinen Zellen, die erst nach einem Stimulus sekretiert werden. Hierbei handelt es sich um einen zusätzlichen Sekretionsmechanismus, da neuroendokrine Zellen auch über einen konstitutiven Sekretionsmechanismus verfügen (Loh et al. 2004). Die Frage, wie der Fluorophor in die Vesikel gelangte nachdem die Signalpeptidsequenz bei der Translokation in das ER entfernt wurde, blieb auch hier ungeklärt (Park und Loh 2008). Ein Vergleich der Sekretion in Fallen mit dem regulierten Sekretionsweg endokriner Zellen ist interessant, da auch die pilzlichen Proteine offensichtlich bis zu einem Stimulus an der Fallenninnenseite gelagert werden. Bei der regulierten Sekretion in Säugerzellen werden die Proteine über den Sekretionsweg via ER und Golgi transportiert und dann im Aktin-Kortex und an die Plasmamembran befestigt, wobei ein Teil der Vesikel immobilisiert wird. Während der Stimulation können die bereitgestellten Vesikel sofort mit der Plasmamembran fusionieren und ihren Inhalt in den extrazellulären Raum freigeben (Loh et al. 2004).

Eine Lokalisation der SP-GFP Fusion in *D. flagrans* im ER war im vegetativen Myzel zu beobachten, jedoch nicht in den Fallen. Da die Lokalisation von GFP-KDEL in Fallen allerdings kein unübliches Muster aufwies, ist davon auszugehen, dass die Strukturen, in denen die SP-GFP-Fusion in den Fallen lokalisiert, keine fallenspezifische Form des ER-Lumens darstellen. Die Fusion verschiedener Signalpeptide zeigte außerdem, dass dieser Effekt nicht von einem konservierten Aminosäuremuster abhängt, da auch die Signalpeptide von an der Spitze sekretierten Proteinen zur gleichen Lokalisation führten.

In *M. oryzae* wurde bereits ein spezieller Sekretionsmechanismus für zytoplasmatische Effektoren beschrieben, die anders als apoplastische Effektoren über einen unkonventionellen Sekretionsweg transportiert werden (Giraldo et al. 2013). In dieser Untersuchung wurde außerdem gezeigt, dass der Exocyst-Komplex und das t-SNARE Protein Sso1 für die Sekretion der zytoplasmatischen Effektoren essenziell sind. Da die Deletion der orthologen Gene zu *exo70* und *ss01* auch in *D. flagrans* einen Einfluss auf die Virulenz zeigten, könnte der unterliegende Mechanismus der Sekretion von Virulenzfaktoren in Fallen ähnlich dem zytoplasmatischer Effektoren in *M. oryzae* sein.

Das Scheitern der Deletion des *sec5* orthologen Gens zeigt, dass der Exocyst-Komplex auch in anderen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, da dies auf die Letalität bzw. auf einen ausgeprägten Wachstumsphänotyp der Deletion hindeutet. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Deletionen der für die Exocyst-Komponenten SecA, SecH und SsoA kodierenden Gene in *Aspergillus niger* letal sind (Kwon et al. 2014).

Die Inhibition des konventionellen Sekretionswegs mit Brefeldin A kann dabei helfen, den Sekretionsweg zu identifizieren (Arioka et al. 1991). BFA inhibiert den Transport von ER zu Golgi, sodass konventionell sekretierte Proteine nach der Behandlung mit dem Inhibitor nichtmehr sekretiert werden können. Es sind bereits einige Proteine bekannt, deren Sekretion nicht durch BFA gestört wird und deren unkonventionelle Sekretion so gezeigt werden konnte, beispielsweise Chitinsynthasen von *Neurospora crassa* (Riquelme et al. 2007). Die BFA-Behandlung des CyrA-mCherry exprimierenden *D. flagrans* Stamms führte dazu, dass das Fusionsprotein nichtmehr im Infektionsbulbus akkumulierte. Jedoch wurde im DIC-Kanal beobachtet, dass bereits die Penetration von der BFA-Behandlung beeinflusst wurde, da hier in der Langzeitaufnahme nach 60 Minuten noch keine Eintrittsstellen erkennbar waren. Die Penetration der Nematoden Kutikula setzt die Sekretion von Enzymen voraus, die vermutlich konventionell über den ER-Golgi-Weg sekretiert werden. Die Ausbildung des Infektionsbulbus erfolgt direkt nach der Penetration und kann somit kaum zeitlich von dieser getrennt werden. Damit ist es mit dieser Methode schwer festzustellen, ob Proteine im Inneren der Nematoden, nach der Penetration, ebenfalls den konventionellen Sekretionsweg nehmen und daher die Akkumulation des Fusionsproteins an der Infektionsstelle ausblieb. Die Lokalisation der Vesikel an der Innenseite der Fallen war auch nach der BFA-Behandlung unverändert.

Da in *M. oryzae* gezeigt wurde, dass einige Effektoren konventionell und andere unkonventionell sekretiert werden (Giraldo et al. 2013), ist es nicht auszuschließen, dass auch in NFP verschiedene Mechanismen für die Sekretion von Virulenzfaktoren vorkommen. Dass solche Proteine häufig kein Signalpeptid besitzen, erschwert allerdings ihre Vorhersage. Die Analyse des Proteoms mit dem SecretomeP-Algorithmus ergab die Vorhersage von 538 potenziell unkonventionell sekretierten Proteinen ohne SP. Da diese sequenzbasierte Vorhersage jedoch auf Daten menschlicher und bakterieller Proteine basiert, ist die Verlässlichkeit der Analyse fragwürdig. Es bedarf der experimentellen Verifikation der Sekretion dieser Proteine, um dies beurteilen zu können. Es wurde bereits gezeigt, dass SecretomeP für

pflanzliche Proteine keine zuverlässigen Daten liefert (Lonsdale et al. 2016). Um den Nutzen der Anwendung in Pilzen zu überprüfen, müssen jedoch mehr unkonventionell sekretierte Proteine experimentell belegt werden. Die Untersuchung von Virulenzfaktoren sollte sich jedoch nicht ausschließlich auf Proteine mit Signalpeptid begrenzen.

### 3.3 Das Wettrüsten zwischen Nematoden und Pilzen

Die *cyrA* Mutante war weiterhin in der Lage Nematoden zu fangen und zu verdauen. Ein kleiner Effekt der Deletion auf die Virulenz war jedoch durch die verlängerte Zeit bis zur Paralyse des Wirts erkennbar. Es ist nicht ungewöhnlich, dass die Deletion einzelner Virulenzfaktoren oder Effektoren keinen, oder nur einen dezenten Phänotyp hervorruft. Diese Beobachtung wurde bereits bei zahlreichen pathogenen Organismen gemacht und ist in Anbetracht des großen, diversen Arsenal sekretierter Proteine auch offensichtlich (McGowan und Fitzpatrick 2017; Liu et al. 2019; Mukhi et al. 2020). Diese Vielfalt entwickelte sich im Laufe des evolutionären Rüstungswettlaufs zwischen Wirt und Pathogen. Das Konzept ist auch als Red-Queen-Hypothese (*red queen hypothesis*) bekannt (Clay und Kover 1996). Ein Begriff der 1973 von Leigh Van Valen geprägt wurde, der eine Analogie zu Lewis Carols Roman „*Alice hinter den Spiegel*“ machte, in dem die Rote Königin zu Alice sagt „Hierzulande musst du so schnell rennen, wie du kannst, wenn du am gleichen Fleck bleiben willst.“ (Van Valen 1973). Dies lässt sich auf die Interaktion zwischen Wirt und Pathogen übertragen, da Pathogene immer wieder neue Strategien entwickeln müssen, um die Wirtsabwehr zu überwinden und umgekehrt. Der dezente Effekt der *cyrA*-Deletion auf die Virulenz zeigt, dass dieses Konzept, welches in Pflanzenpathogenen gut erforscht ist, auch auf die Interaktion zwischen Nematoden und NFP zutrifft. Diese Interaktion ist ein geeignetes Modell für solche Analysen, da NFP und Nematoden in über 419 Millionen Jahren gemeinsamer Evolution eine ausgeprägte Interspezies-Beziehung entwickelt haben. Allgemein ist das Wettrüsten zwischen Pathogenen und multizellulären Wirten noch kaum erforscht (Schulte et al. 2010). Ko-Evolutionsexperimente können dabei helfen, Krankheiten zu erforschen, neue Strategien für die biologische Schädlingsbekämpfung zu entwickeln und neue Medikamente zu finden, indem sie unser Verständnis der Virulenzfaktoren und der Wirtsantwort erweitern (Horton et al. 2007; Joop und Vilcinskis 2016).

CyrA ist somit nur eine kleine Komponente in einem komplexen Zusammenspiel vieler Proteine. Zukünftige Analysen könnten sich mit der Frage nach Effektorclustern in *D. flagrans* auseinandersetzen, um die für die Virulenz essenziellen und zusammenspielenden Proteine zu identifizieren. In *U. maydis* führte die Deletion eines kompletten Effektorclusters zu einem starken Virulenz-Phänotyp, während die Deletionen einzelner Proteine des Clusters nur dezente Effekte aufwiesen (Brefort et al. 2014). Neue Methoden für die genetische Manipulation von Mikroorganismen sind außerdem in der Entwicklung, die zukünftig genutzt werden können, um mehrere Virulenzfaktor-Kandidaten gleichzeitig zu deletieren und so die Virulenz-Kernproteine zu identifizieren. Eine solche, auf CRISPR/Cas basierende Methode wurde kürzlich für *B. cinerea* beschrieben und könnte an NFP angepasst werden (Hahn und Scalliet 2021).

### **3.4 Die Expression pilzlicher Proteine in *C. elegans* liefert Hinweise auf ihre Funktionsweise**

Die Deletion und Lokalisation putativer Virulenzfaktoren im pathogenen Organismus können einige Anhaltspunkte über die Funktionsweise der Proteine liefern. Die heterologe Expression dieser Proteine im Wirt kann es ermöglichen, anhand des verursachten Phänotyps weitere Schlüsse bezüglich der Funktion der Proteine ziehen zu können. Durch die Expression des bakteriellen Pertussis-Toxins (PTX) in *C. elegans* konnten G-Proteine als Ziel dieser Gifte identifiziert werden (Darby und Falkow 2001). Auch der Effekt von Virulenzfaktoren auf die Immunantwort von *C. elegans* kann so überprüft werden. Die Expression des *Shigella* Virulenzfaktors OspF in der Hypodermis verhinderte die Expression des antimikrobiellen Peptids (AMP) Nlp-29 (Lee et al. 2018). Diese Analyse zeigt außerdem, dass die Wahl eines adäquaten Promotors für die heterologe Expression entscheidend ist. So führte die Expression von *ospF* im Darm zu keinem Effekt, während die Expression in der Hypodermis die *nlp-29* Expression inhibierte. Dies wurde auch im Verlauf dieser Arbeit ersichtlich, bei der sich sowohl der ubiquitäre *eft-3* Promotor als auch der hitzeaktivierte *hsp-16.48* Promoter als ungeeignet für das System herausstellten. Da *D. flagrans* die Nematoden über die Kutikula angreift und darunter die Hypodermis liegt, ist es wahrscheinlich, dass Ziele der pilzlichen Virulenzfaktoren in der Hypodermis liegen. Somit hat sich der hypodermale *col-19* Promotor als passend erwiesen. Dieser ist zusätzlich nur in

adulten Tieren aktiv, sodass ein möglicher negativer Effekt der Genexpression erst nach der Entwicklung auftritt. Die epidermale Immunantwort ist neben der intestinalen außerdem ein zentraler Schaltpunkt des *C. elegans* Immunsystems.

Dass das Immunsystem des Wirts ein möglicher Angriffspunkt von Virulenzfaktoren nematophager Pilze ist, zeigt auch die Expression pilzlicher Enterotoxine von *D. coniospora* in *C. elegans*. Die Toxine induzierten hier die Immunantwort gemessen an der Expression verschiedener Immunitätsmarker und AMPs (Zhang et al. 2020). Im Laufe dieser Arbeit wurde ebenfalls die Expression einiger bekannter Immunitätsmarker, wie *lys-7* und *irg-4* in den *cyrA* exprimierenden Stämmen gemessen, jedoch konnte für diese Gene keine Induktion festgestellt werden. Mittels RNAseq-Analysen könnte die Immunantwort zukünftig umfangreicher untersucht werden.

Die heterologe Expression von *cyrA* in *C. elegans* führte zu einer verringerten Lebensdauer der Nematoden. Dies stellt höchstwahrscheinlich keinen direkten Effekt des pilzlichen Proteins dar, da der Infektionsprozess von *D. flagrans* innerhalb weniger Stunden abläuft. Stattdessen deutet die verkürzte Lebensdauer auf einen physiologischen Effekt in *C. elegans* hin. Dem könnte die Induktion der Immunantwort zugrunde liegen, da zahlreiche Immunitätsgene auch in Alterungsprozessen involviert sind. In beiden Prozessen spielt der DAF-2/DAF-16 Signalweg eine zentrale Rolle. DAF-2 ist Teil des Insulin-Signalwegs und inhibiert die Aktivierung des Forkhead-Transkriptionsfaktors DAF-16. Ein weiterer an der Immunität beteiligter Signalweg ist der p38 MAP-Kinaseweg. Dieser scheint an der Stress- und Pathogenantwort beteiligt zu sein, spielt vermutlich jedoch keine Rolle in Alterungsprozessen (Kurz und Tan 2004). Somit könnte die verringerte Lebensdauer der *cyrA* exprimierenden Nematoden grob auf mögliche Ziele des Virulenzfaktors hinweisen. Dies impliziert allerdings nicht, dass CyrA direkt die Immunabwehr beeinflusst. Da *C. elegans* auch über eine Effektor-induzierte Immunantwort (ETI) verfügt, könnten auch andere von CyrA-induzierte Prozesse eine Immunantwort und daraufhin eine Verringerung der Lebensdauer hervorrufen (Rajamuthiah und Mylonakis 2014). Bakterielle Effektoren lösen die ETI beispielsweise durch das Blockieren der Translation über die Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 aus, was zur Induktion des p38 MAP-Kinasewegs führt (Dunbar et al. 2012; Stuart et al. 2013). Um einen umfangreichen Eindruck der potenziell durch CyrA ausgelösten Immunantwort zu bekommen, sollten zukünftig Transkriptomanalysen der *cyrA* exprimierenden Nematoden durchgeführt werden.

Auch die Suche nach möglichen Interaktionspartnern von CyrA im Wirt mittels Massenspektrometrie könnte weitere Hinweise auf die genaue Funktion des Virulenzfaktors geben. So wurde ein ADP Ribosylierungsfaktor (ARF) als Interaktionspartner von *D. coniospora* Enterotoxin A (DcEntA) identifiziert (Zhang et al. 2020).

### 3.5 Mögliche Funktionen der *C. elegans* Coelomocyten während der Infektion

Wie andere Invertebraten steht *C. elegans* für die Abwehr von Pathogenen lediglich die angeborene Immunität zur Verfügung. Jedoch besitzen andere Organismen zusätzlich spezialisierte Immunzellen, wie beispielsweise die Makrophagen-ähnlichen Hämocyten von *Drosophila*, welche in *C. elegans* nicht vorzufinden sind. Die einzigen Zellen, die einen vagen Vergleich zulassen, sind die Coelomocyten, jedoch führen diese keine aktive Phagozytose durch. Die Beobachtung der Aufnahme des sekretierten CyrA-Scarlet Fusionsproteins eröffnet nun die Frage nach einer möglichen Rolle dieser Zellen im Laufe der *D. flagrans*-Attacke, möglicherweise bei der Aufnahme und dem Abbau von Virulenzfaktoren, die in das Pseudocoel abgegeben werden. Eine Funktion der Coelomocyten während der Infektion mit verschiedenen pathogenen Bakterien wurde bereits beschrieben. Hier regulieren sie den Umsatz extrazellulärer Proteine in der Körperhöhle durch Endozytose (Fares und Greenwald 2001). Dieser Vorgang ist essenziell während des Infektionsprozesses, da so die Optimierung der extrazellulären Proteostase ermöglicht wird. Dies ist wichtig, um eine systematische Immunantwort aufrechtzuerhalten und die korrekte intrazelluläre Signalweiterleitung zu gewährleisten (Gallotta et al. 2020).

Die verkürzte Lebenszeit der *cyrA*-exprimierenden Stämme war lediglich im N2 Wildtypstammhintergrund erkennbar. Die Expression im Stamm mit Funktionsstörung der Endozytose durch die Coelomocyten zeigte hier keine Veränderung. Auch das könnte mit der Beteiligung der Zellen an Signalweiterleitungsprozessen erklärt werden. Dies ist bereits im Zusammenhang mit Alterungsprozessen im Kontext der Hunger-Antwort der Nematoden beschrieben (Park et al. 2010). Wird *C. elegans* auf Diät gesetzt, führen Signale der ASI Neuronen zu einer Steigerung der Endozytose in den Coelomocyten, was wiederum zur neuronalen Signalweiterleitung und zur Aktivierung weiterer Gene führt, die für die Verlängerung der Lebenszeit zuständig sind. In Stämmen, bei denen die Funktion der Coelomocyten beeinträchtigt ist, ist diese

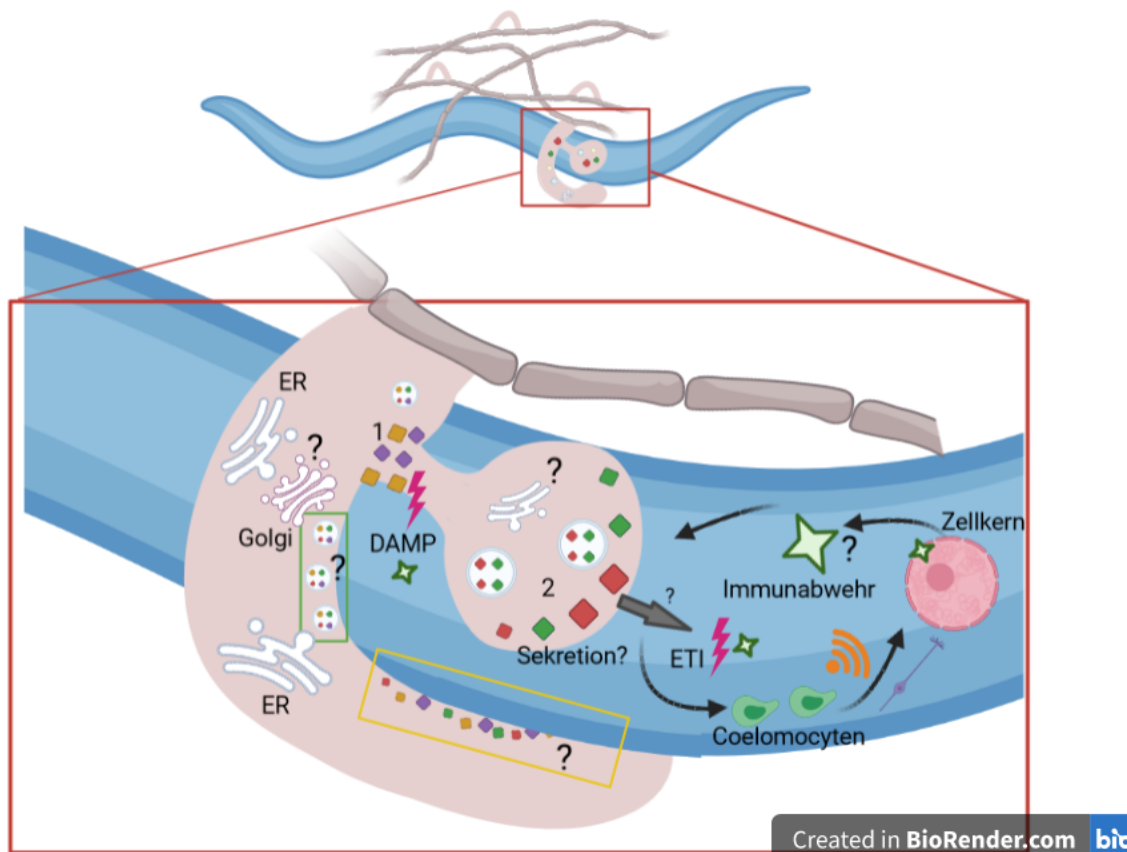
Verlängerung der Lebenszeit nicht mehr zu beobachten. Dies zeigt, dass die Coelomocyten vielseitige Funktionen ausführen, die noch nicht ausreichend erforscht sind. Dass der durch die *cyrA*-Expression ausgelöste Effekt auf die Lebenszeit nur im Wildtypstammhintergrund zu beobachten ist, kann auf eine essenzielle Rolle der Coelomocyten bei der Signalweiterleitung und somit auf eine noch unerforschte Funktion der Zellen hindeuten.

Alles in allem weisen die Beobachtungen auf eine direkte oder indirekte Rolle der Coelomocyten bei der *D. flagrans*-Attacke hin. Zukünftige Analysen der Immunantwort von *C. elegans* während der Interaktion mit *D. flagrans* können dabei helfen, diese ungeklärten Aspekte der *C. elegans* Immunität aufzuklären. Dabei wären Transkriptomanalysen hilfreich, die einen Vergleich zwischen den aktivierten Genen im Wildtyp und in Coelomocyten defizienten Stämmen erlauben.

### 3.6 Fazit und Modell

Im Laufe dieser Arbeit wurde der Virulenzfaktor CyrA als erstes SSP in Nematodenfangenden Pilzen charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das Protein an der Virulenz von *D. flagrans* beteiligt ist. Es wurde deutlich, dass die Erforschung von Virulenzfaktoren Nematodenfangender Pilze viele zellbiologische und immunologische Fragestellungen umfasst, die es noch aufzuklären gilt (Abbildung 25). Darunter beispielsweise die Sekretionsmechanismen in den Fallen. Zukünftig sollten weitere Komponenten der Sekretionsmaschinerie auf ihre Rolle bei der Sekretion von Virulenzfaktoren hin untersucht werden. Die Lokalisation von Virulenzfaktoren in verschiedenen Deletionsstämmen kann hier zur Untersuchung dieses Aspekts beitragen.





**Abbildung 25: Modell der Sekretion von Virulenzfaktoren in Fallen und der Erkennung durch den Wirt.** Virulenzfaktoren sind mikroskopisch als dynamische Pünktchen erkennbar, die an der Fallennenseite akkumulieren. Dabei könnte es sich um fallenspezifische Vesikel (grüne Box) handeln, oder die Proteine liegen in anderer Form, beispielsweise als Komplexe mehrerer Proteine (gelbe Box) vor. Die Lokalisation von Proteinen, die an der Infektionsstelle sekretiert werden (1, gelb, lila), ist von der von Proteinen im Infektionsbulbus (2, rot, grün) zu unterscheiden. Die Behandlung von *D. flagrans* mit BFA zeigte, dass der Inhibitor die Penetration zumindest teilweise blockiert, was auf die konventionelle Sekretion von Proteinen an der Infektionsstelle (1) schließen lässt. Die Sekretionsmechanismen von Virulenzfaktoren im Infektionsbulbus (2) und die Existenz unkonventioneller Sekretionswege dieser Proteine ist ungeklärt. Die Immunantwort (Sterne) des Wirts wird vermutlich durch die Erkennung von Schadens-assoziierten-molekularen-Mustern (DAMPs) und die Erkennung von Effektoren via ETI induziert. Die Coelomocyten spielen möglicherweise zusätzlich eine Rolle in der Signalweiterleitung, die zur Induktion der Immunantwort führt. Das Schema wurde mit BioRender erstellt.

Einen wichtigen Punkt der Interaktion stellt die Immunantwort der Nematoden dar. Hier hat diese Arbeit gezeigt, dass die Rolle der Coelomocyten weiterverfolgt werden sollte. Zukünftig sollten Transkriptomanalysen von *C. elegans* während der Infektion, sowie von Nematodenstämmen, die pilzliche Virulenzfaktoren exprimieren, durchgeführt werden, um eine Übersicht der aktivierten Abwehrmechanismen zu bekommen.

Die Interaktion zwischen NFP und Nematoden birgt großes Potenzial für die Erforschung zahlreicher Prozesse, die in Hinblick der Rolle von *C. elegans* als Modellorganismus für menschliche Krankheiten auch auf andere Systeme übertragen werden können.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

#### Stämme

##### *E. coli* Stämme

Tabelle 2: In dieser Tabelle sind alle verwendeten *E. coli* Stämme aufgeführt. Für alle Klonierungen wurde der *E. coli* Stamm Top10 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
<b>Top10</b>	F- <i>mcrA</i> _( <i>mrr-hsdRMSmcrBC</i> ) _80 <i>lacZ</i> _M15 _ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> _( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galk rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Amp <sup>R</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>OP50</b>	<i>ura-</i>		Institut für Biologie, Bioinformatik und Molekulargenetik, Freiburg

##### *D. flagrans* Stämme

Tabelle 3: In dieser Tabelle sind alle verwendeten, sowie die in dieser Arbeit hergestellten *D. flagrans* Stämme aufgeführt.

Name	Genotyp	Resistenz	Herkunft
<b>sNH08</b>	<i>gpd(p)::cyrA-Laccase</i> <sup>ΔAS1-18</sup> <i>pNH10</i>	hph	Masterarbeit Nicole Wernet
<b>sNH11</b>	Δ <i>cyrA pNH12</i>	hph	Masterarbeit Nicole Wernet
<b>sNH16</b>	<i>dfTubA(p)::GFP-SKL::gluC(t) pNH18</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH20</b>	<i>oliC(p)::CyrA::bcmCherry::gluC(t)</i> <i>pNH24</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH21</b>	<i>cyrA(p)::h2b::mCherry::tubT pNH19</i>	hph	Diese Arbeit

<b>sNH22</b>	<i>oliC(p)::dnaJ::GFP::KDEL::gluC(t)</i> <i>pNH20</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH23</b>	<i>oliC(p)::CyrA::bcGFP::gluC(t)</i> <i>pNH21</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH24</b>	<i>oliC(p)::GFP-CyrAΔSP::gluC(t)</i> <i>pNH22</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH25</b>	<i>oliC(p)::CyrA-mCherry::gluC(t)</i> <i>pNH24</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH27</b>	<i>sNH11 x cyrA(p)::cyrA::cyrA(t); G418;</i> <i>Recomplementation; pNH29</i>	hph, G418	Diese Arbeit
<b>sNH28</b>	<i>sNH11 x H2B::mCherry::G418</i>	hph, G418	Diese Arbeit
<b>sNH29</b>	<i>oliC(p)::GFP::rabA::gluC(t)</i> <i>pNH38</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH30</b>	<i>cyrA(p)::CyrA::gfp::gluC(t)</i> <i>pNH32</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH31</b>	<i>cyrA(p)-h2b-mCherry::Tub(t)</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH33</b>	<i>broA(p)::broA::GFP:: ::gluC(t)hph</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH37</b>	<i>sNH20 x oliC(p)::BroA::GFP::G418</i> <i>pNH46</i>	hph, G418	Diese Arbeit
<b>sNH41</b>	<i>oliC(p)::cyrAΔ::GFP</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH42</b>	<i>oliC(p)::SP::GFP</i> <i>pNH62</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH46</b>	<i>cyrA(p)::cyrA::cyrARB</i> <i>pNH71</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH47</b>	<i>sNH11 X cyrA(p)::cyrA::gfp::gluC(t);</i> <i>tub(p)::G418</i> <i>pNH72</i>	G418, hph	Diese Arbeit
<b>sNH48</b>	<i>oliC(p)::SP(654)::GFP</i> <i>pNH75</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH50</b>	<i>oliC(p)::SP(BglA)::GFP</i> <i>pNH77</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH51</b>	<i>oliC(p)::broA::mCherry::G418 x</i> <i>pNH42</i>	G418	Diese Arbeit
<b>sNH52</b>	<i>sNH20 X oliC(p)::BroA::GFP;</i> <i>trpcP::G418::TrpcT</i> <i>pNH46</i>	G418	Diese Arbeit
<b>sNH53</b>	<i>sNH20 X oliC(p)::GFP::RabA::G418</i> <i>pNH40</i>	G418, hph	Diese Arbeit
<b>sNH54</b>	<i>oliC(p)::SP(1625)::GFP</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH55</b>	<i>oliC(p)::SP(9757)::GFP</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH56</b>	<i>oliC(p)::SP(9889)::GFP</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH57</b>	<i>oliC(p)::SP(3229)::GFP</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH58</b>	<i>oliC(p)::SP(5719)::GFP</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH59</b>	<i>oliC(p)::SP(GlaA)::GFP</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH60</b>	<i>ΔexoA X</i> <i>sNH73</i>	G418, hph	Diese Arbeit
<b>sNH61</b>	<i>ΔsecA X</i> <i>sNH73</i>	G418, hph	Diese Arbeit
<b>sNH62</b>	<i>oliCP::bglA::mCherry::gluC(t);</i> <i>tub(p)::G418</i>	G418	Diese Arbeit

<b>sNH63</b>	<i>bglAP::bglA::mCherry::gluC(t); tub(p)::G418</i>	G418	Diese Arbeit
<b>sNH64</b>	<i>oliC(p)::SP(cyrA)-mCherry::gluC(t); G418</i>	G418	Diese Arbeit
<b>sNH65</b>	<i>cyrA(p)::cyrA::mCherry::gluC(t); tub(p)::G418</i>	G418	Diese Arbeit
<b>sNH66</b>	<i>claHP::claH::GFP::gluC(t)</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH67</b>	<i>glaAP::glaA::mCherry::gluC(t); G418</i>	G418	Diese Arbeit
<b>sNH68</b>	<i>oliCP::cyrA::h2b::mCherry::gluC(t)</i>	hph	Diese Arbeit
<b>sNH73</b>	<i>cyrA(p)::cyrA::mCherry::gluC(t); tub(p)::G418</i>	G418	Diese Arbeit

### C. elegans Stämme

Tabelle 4: In dieser Tabelle sind die verwendeten, sowie die in dieser Arbeit hergestellten *C. elegans* Stämme aufgeführt.

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
<b>KIT01</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato col19(p)::SP::cyrA::GFP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT02</b>	<i>myo-2(p)::GFP hsp(p)::SP::cyrA::scarlet</i>	Diese Arbeit
<b>KIT03</b>	<i>myo-2(p)::GFP hsp(p)::scarlet</i>	Diese Arbeit
<b>KIT04</b>	<i>myo-2(p)::GFP hsp(p)::cyrAΔSP::scarlet</i>	Diese Arbeit
<b>KIT05</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato unc-4(p)::cyrAΔSP::GFP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT06</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato unc86(p)::cyrAΔSP::GFP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT08</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato Myo3(p)::cyrAΔSP::GFP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT09</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato hsp(p)::cyrA+SP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT10</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato hsp(p)::cyrAΔSP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT11</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato eft-3(p):: SP::cyrA::GFP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT12</b>	<i>myo-2(p)::GFP elt-2P::cyrAΔSP X AML32</i>	Diese Arbeit
<b>KIT13</b>	<i>myo-2(p)::GFP rab-3P::cyrAΔSP X AML32</i>	Diese Arbeit
<b>KIT14</b>	<i>myo-2(p)::GFP hsp16.48P::SP(cyrA)::Scarlet</i>	Diese Arbeit
<b>KIT15</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato unc122P::GFP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT18</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato col-19P::cyrAΔSP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT21</b>	<i>myo-2(p)::GFP col-19P-Scarlet</i>	Diese Arbeit
<b>KIT22</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato col-19P::cyrA+SP</i>	Diese Arbeit
<b>KIT23</b>	<i>myo-2(p)::tdTomato col-19P::cyrAΔSP::GFP</i>	Diese Arbeit

## Plasmide

Tabelle 5: In dieser Tabelle sind die verwendeten, sowie die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide aufgeführt.

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
pOF018	<i>gpd(p)::lccC</i>	Pyr4, hph, amp	Dr. Oleksandra Fokina (Karlsruhe)
pNH10	<i>gpd(p)::cyrA::lccC<sup>ΔAST-18</sup></i>	Pyr4, hph, amp	Masterarbeit Nicole Wernet
pNH12	<i>ΔcyrA x pJET1.2</i>	hph, amp	Masterarbeit Nicole Wernet
pNH13	<i>oliC(p)::GFP-SKL::gluC(t) x pJET1.2</i>	hph, amp	Masterarbeit Nicole Wernet
pNH20	<i>dfTubA(p)::DnaJ::GFP::KDEL::gluC(t) in Efimov hph</i>	hph, amp, pyr4	Diese Arbeit
pWB01	<i>trpC(p)::hph:trpC(t), oliC(p)::bcGFP::gluC(t) in pJet1.2</i>	hph, amp	Bachelor 2018
pWB02	<i>TrpC(p)::hph:trpC(t), oliC(p)::bcGFP::gluC(t) in pJet1.2</i>	hph, amo	Bachelor 2018
pNH21	<i>oliC(p)::cyrA::bcGFP::gluC(t)</i>	hph, amp	Diese Arbeit
pNH22	<i>oliC(p)::GFP::cyrAΔSP::gluC(t)</i>	hph, amp	Diese Arbeit
pNH24	<i>oliC(p)::cyrA::bcmCherry::gluC(t)</i>	hph, amp	Diese Arbeit
pPF37	<i>ttT15605 cb-unc-119</i> (basiert auf pCFJ350)	amp	Phil Frankino UC Berkeley
pCFJ90	<i>myo-2(p)::tdtomato</i>		Phil Frankino UC Berkeley
pEGFP- Myo-2	<i>myo-2(p)::GFP</i>		Institut für Biologie, Freiburg
pHN29	<i>cyrA(p)::cyrA::cyrA(t)::G418</i>	hph, G418, amp	Diese Arbeit
pHN30	<i>cyrA(p)-H2B-mCherry::tubT</i>	hph, amp	Diese Arbeit
pNH32	<i>cyrA(p)::cyrA::gfp::gluC(t)</i>	hph, amp	Diese Arbeit

<b>pNH38</b>	<i>oliC(p)::bcGFP::dfRabA::gluC(t)</i>	hph, amp	Diese Arbeit
<b>pNH40</b>	<i>oliC(p)::mCherry::dfRabA::gluC(t)::G418</i>	G418, amp	Diese Arbeit
<b>pNH42</b>	<i>broA::mCherry::G418</i>	hph ,amp	Diese Arbeit
<b>pNH45</b>	<i>broA::GFP:: ::gluC(t)</i>	hph ,amp	Diese Arbeit
<b>pNH46</b>	<i>oliC(p)::BroA::GFP::gluC(t); trpcP::G418::TrpcT</i>	G418, amp	Diese Arbeit
<b>pNH48</b>	<i>col19(p)::SP::cyrA::GFP</i>	hph ,amp	Diese Arbeit
<b>pNH49</b>	<i>col19P::cyrA+SP::gfp</i>		
<b>dBt753</b>	<i>mScarlet</i>	amp	B. Tursun, MDC Berlin
<b>pNH52</b>	<i>oliC(p)::GFP::BroA; trpcP::G418::TrpcT</i>	amp, G418	Diese Arbeit
<b>pNH54</b>	<i>unc86(p)::cyrAwoSP::GFP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH55</b>	<i>unc54(p)::cyrAwoSP::GFP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH58</b>	<i>hsp(p)::cyrA+SP::scarlet ::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH59</b>	<i>hsp(p)::scarlet::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH61</b>	<i>oliC(p)::cyrAΔSP::GFP</i>	amp, hph	Diese Arbeit
<b>pNH62</b>	<i>oliC(p)::SP::GFP</i>	amp, hph	Diese Arbeit
<b>pNH63</b>	<i>hsp(p)::cyrAΔSP::scarlet::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH67</b>	<i>myo3(p)::cyrAwoSP::GFP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH68</b>	<i>hsp(p)::cyrA+SP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH69</b>	<i>hsp(p)::cyrAΔSP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH70</b>	<i>oliC(p)::cyrA::glucT</i>	amp, hph	Diese Arbeit
<b>pNH71</b>	<i>cyrA(p)::cyrA::cyrA(t)</i>	amp, hph	Diese Arbeit
<b>pNH72</b>	<i>cyrA(p)::cyrA::gfp::gluC(t); tub(P)::G418</i>	amp, G418	Diese Arbeit
<b>pNH73</b>	<i>elt-2P::cyrAΔSP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH74</b>	<i>rab-3P::cyrAΔSP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH75</b>	<i>oliC(p)::SP(654)::GFP</i>	amp, hph	Diese Arbeit
<b>pNH76</b>	<i>oliC(p)::SP(PefB)::GFP</i>	amp, hph	Diese Arbeit
<b>pNH77</b>	<i>oliC(p)::SP(BglA)::GFP</i>	amp, hph	Diese Arbeit
<b>pNH78</b>	<i>hsp16.48P::SP(cyrA)::Scarlet::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH79</b>	<i>unc122P::GFP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
<b>pNH81</b>	<i>oliC(p)::SP(1625)::GFP::gluC(t)</i>	amp, hph	Diese Arbeit
<b>pNH82</b>	<i>oliC(p)::SP(9757)::GFP::gluC(t)</i>	amp, hph	Diese Arbeit

pNH83	<i>oliC(p)::SP(9889)::GFP::gluC(t)</i>	amp, hph	Diese Arbeit
pNH84	<i>oliC(p)::SP(3229)::GFP::gluC(t)</i>	amp, hph	Diese Arbeit
pNH85	<i>oliC(p)::SP(5719)::GFP::gluC(t)</i>	amp, hph	Diese Arbeit
pNH86	<i>oliC(p)::SP(GlaA)::GFP::gluC(t)</i>	amp, G418	Diese Arbeit
pNH88	$\Delta$ <i>exoA</i>	amp, hph	Diese Arbeit
pNH89	$\Delta$ <i>secA</i>	amp, hph	Diese Arbeit
pNH90	<i>col-19P::cyrA<math>\Delta</math>SP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
pNH91	<i>oliCP::BglA::mCherry::gluC(t); tub(p)::G418</i>	amp, G418	Diese Arbeit
pNH92	<i>bglAP::BglA::mCherry::gluC(t); tub(p)::G418</i>	amp, G418	Diese Arbeit
pNH93	<i>oliC(p)::SP(cyrA)-mCherry; G418</i>	amp, G418	Diese Arbeit
pNH94	<i>cyrA(p)::cyrA::mCherry::gluC(t); tub(P)::G418</i>	amp, G418	Diese Arbeit
pNH97	<i>claHP::ClaH::GFP::gluC(t)</i>	amp, hph	Diese Arbeit
pNH99	<i>oliCP::cyrA::H2B::mCherry::gluC(t)</i>	amp, hph	Diese Arbeit
pNH103	<i>col-19P-Scarlet::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
pNH104	<i>col-19P::cyrA+SP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit
pNH106	<i>col-19P::cyrA<math>\Delta</math>SP+GFP::unc-54UTR</i>	amp	Diese Arbeit

## Oligonukleotide

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide in 5' -> 3'-Richtung angegeben.

Name	Sequenz	Anwendung
Hph_kass_for	AAGTGTAATGCTAGTGGAGGTC	hph Kasette
Hph_kass_rev	TGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	hph Kasette
Backbone_Efi_for	TTAATTAACCGGGATCCAAGTG	Backbone Amplifikation efimov
Backbone_Efi_rev	GAATTCACTGGCCGTCGTTT	Backbone Amplifikation efimov
Efi_bb_pac_ba_m_for	TTAATTAACCGGGATCCAAGTG	TubA(P)- GFP-SKL in Efimov
Backbone_rev	GAATTCACTGGCCGTCGTTT	TubA(P)- GFP-SKL in Efimov

<b>dfTubP_OLefi_for</b>	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCAAGAGGTAGC TCGCCCTTTT	TubA(P)- GFP-SKL in Efimov
<b>dfTubP_OLgfp_rev</b>	TACTTACCTCACCCCTTGGAAACCATTGCAATTGTTG ATGTTTCAGGC	TubA(P)- GFP-SKL in Efimov
<b>bcGFP_tubOL_for</b>	GAAAGCCTGAACATCAACAATTGCAATGGTTTCCAA GGGTGAGGT	TubA(P)- GFP-SKL in Efimov
<b>bcGFP_term_OLhph_rev</b>	TTACACTTGGATCCCGGTTAATTAATCTTGTTGGG GGGAAGG	TubA(P)- GFP-SKL in Efimov
<b>H2B-NLS_for</b>	ATGCCACCAAAGCCGCC	Backbone Amplifikation
<b>DF_tubP_rev</b>	TGCAATTGTTGATGTTTCAGGC	tubA(P)- dnaJ-GFP- KDEL-gluc(T)
<b>TgluC_for</b>	CGTATGTAGATAAGATGTATGATT	tubA(P)- dnaJ-GFP- KDEL-gluc(T)
<b>dfDnaJ_OLtub_for</b>	GAAAGCCTGAACATCAACAATTGCAATGCTGTTCTT GCAGCTGCT	tubA(P)- dnaJ-GFP- KDEL-gluc(T)
<b>dfDnaJ_OLgfp_rev</b>	GATTACTTACCTCACCCCTTGGAAACCGGATTAACCC CAACCTTCT	tubA(P)- dnaJ-GFP- KDEL-gluc(T)
<b>GFP_OLdnaj_for</b>	GAGGCAGAAGGTTGGGGTTAATCCGGTTTCCAAGG GTGAGGTAAG	tubA(P)- dnaJ-GFP- KDEL-gluc(T)
<b>GFP_KDEL_OLtgluc rev</b>	TAATCATAACATCTTATCTACATACGTCATAGCTCATC CTTAGCGGCCGCTTTGTAAAGTT	tubA(P)- dnaJ-GFP- KDEL-gluc(T)
<b>GFP_SKL_for</b>	ATCTTGTTGGGGGGAAGGG	Amplifikation GFP-SKL
<b>GFP_SKL_rev</b>	CTATTCCTTTGCCCTCGGA	Amplifikation GFP-SKL
<b>tGluc_seq_rev</b>	CTCCACAAGGGTCCATGC	Sequenzieru ng N-terminal GFP
<b>pOliC_seq for</b>	CGTATTTAGGTGCTAGGGC	Sequenzieru ng C-terminal GFP
<b>pNH18_seq_f</b>	CCTCCGTTTTAACCCATCAG	Sequenzieru ng pNH18
<b>CyrA_ohneSP_asc_for</b>	GGCGGCCCATGAACCCCAATGTATACGAC	GFP Fusion CyrA
<b>CyrA_pac_rev</b>	TTAATTAATTAGTAGCACTTTTCGCACAAA	GFP Fusion CyrA
<b>CyrA_asc_for</b>	GGCGGCCCATGCAGCTCCTCAGCACTA	GFP Fusion CyrA
<b>CyrA_nostop_pac_rev</b>	TTAATTAAGTAGCACTTTTCGCACAAAGT	GFP Fusion CyrA
<b>CyrA_genomic_for</b>	AATTGGCAGCATCGATACTCG	Kornfirmation des KO



<b>CyrA_genomic_rev</b>	CCATAACGCCAAGCGCTT	Kornfirmation des KO
<b>CyrA_rev</b>	CTTAATTAAGTAGCACTTTTCGCA	C-terminale mCherry Fusion von cyrA in supermorph
<b>tGluC_for</b>	CGTATGTAGATAAGATGTATGATT	C-terminale mCherry Fusion von cyrA in supermorph
<b>cherry_cyraOL_for</b>	GTGCGAAAAGTGCTACTTAATTAAGATGGTAAGCAA GGGCGAGGT	C-terminale mCherry Fusion von cyrA in supermorph
<b>cherry_glucTO_L_rev</b>	TAATCATACATCTTATCTACATACGCTAAGCGGCCG CTTTGTAGA	C-terminale mCherry Fusion von cyrA in supermorph
<b>CyrA_P_rev</b>	GTAGCACTTTTCGCACAAAGTC	Effektor Expression in c.elegans ohne GFP
<b>Ppf37_3utr_P_for</b>	TGAGAGCTCCGCATCGGC	Effektor Expression in c.elegans ohne GFP
<b>Peft3_P_rev</b>	GAGCAAAGTGTTTCCCAACTG	freies GFP in C.elegans
<b>Ce_GFP_P_for</b>	TCAGGTGGATCTGGAGGCT	freies GFP in C.elegans
<b>Trpc_term_for</b>	AGTAGATGCCGACCGATCC	Austausch von hph gegen g418
<b>Trpc_prom_rev</b>	TTGGATGCTTGGGTAGAATAG	Austausch von hph gegen g418
<b>Peft3_Phos_rev</b>	CATGAGCAAAGTGTTTCCCAAC	freies GFP in C.elegans mit ATG and Phosphorylation
<b>Ce_GFP_Phos_for</b>	TCAGGTGGATCTGGAGGCT	freies GFP in C.elegans mit ATG and Phosphorylation
<b>cyrA_LB_pjetOL_for</b>	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATTTTCCTAAAGC CAAGTGTTCC	Rekomplementation cyrA KO

<b>cyrA_RB_trpcTol_rev</b>	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTTGGAATCCCGGCTCGTTTA	Rekomplementation cyrA KO
<b>pjetBB_rekomb_rev</b>	ATCTTGCTGAAAACTCGAGC	Rekomplementation cyrA KO
<b>trpcP_for</b>	AAGTGTAATGCTAGTGGAGGT	Rekomplementation cyrA KO
<b>bcmCherry_for</b>	ATGGTAAGCAAGGGCGAGG	PromotorFusion Promotor-H2B-mCherry
<b>H2B_cyrapOL_for</b>	CTTCTTTTCACAAATACTGTGCGAAAATGCCACCAAAAGCCGCC	PromotorFusion Promotor-H2B-mCherry
<b>H2B_mcherryOL_rev</b>	GATTACTTACCTCGCCCTTGCTTACCATTTTGGCAGACGAGGAAGAGT	PromotorFusion Promotor-H2B-mCherry
<b>LecA(p)_efiOL_for</b>	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCCTCTTGTAGGGAGGAATTAGA	PromotorFusion Promotor-H2B-mCherry
<b>LecA(p)_H2Bol_rev</b>	TTTTCGGCGGCGGCTTTTGGTGGCATCTTTTATATACTGCTGGGGTTAT	PromotorFusion Promotor-H2B-mCherry
<b>H2B_lecA(p)OL_for</b>	GATAAGATAACCCCAGCAGTTATATAAAAGATGCCACCAAAGCCGCC	PromotorFusion Promotor-H2B-mCherry
<b>dfH2B_for</b>	ATGCCACCAAAAGCCGCC	PromotorFusion Promotor-H2B-mCherry
<b>Olic(p)_rev</b>	TTGGATCGATTGTGATGTGATG	Klonierung
<b>bcmCherry_atg_for</b>	ATG GTA AGC AAG GGC GAG GTA A	Klonierung
<b>rab_asc_for</b>	ATGGCGCGCCATGGCTGAAGGCGGTCCA	RabA-GFP
<b>rab_pac_rev</b>	GCTTAATTAACATAACAAGCACAACCGTCCT	RabA-GFP
<b>bcCherry_mid_for</b>	GACTACACCATCGTCGAACA	Sequenzierung
<b>bcCherry_mid_rev</b>	TTCATGAACTCCTTGATAATGG	Sequenzierung
<b>bcGFP_mid_rev</b>	TTGGAACGACGCCAGTGAA	Sequenzierung
<b>Lccc_ohneSP_for</b>	TCTTGGGTCTTTGAGCACGAC	Amplifikation laccase plasmid
<b>gpdP_rev</b>	GGCGCGCCTGTGATGTCT	Amplifikation laccase plasmid
<b>hph_lccc_for</b>	CGGGTGTCTAGTTAATTAA GGATCCTAAGTGTAAATGC TAGTGGAGGTC	Integration von hph in laccase plasmid
<b>hph_lccc_rev</b>	TGCATGCCTGCAGGTCGAC TTGGGGGGAGTTTAGGGA AAG	Integration von hph in laccase plasmid

<b>ppf37_rev</b>	CAT CCA TTC CAA GAG TTA TTC C	
<b>ppf37_rev</b>	CAG TTG GGA AAC ACT TTG CTC	Amplifikation von pLZ29
<b>Ppf37_3utr_P_for</b>	TGA GAG CTC CGC ATC GGC	Amplifikation von pLZ29
<b>mCherry_Tub(T)OL_rev</b>	GCAAAGTAGGAATGACATCAGATATCTAAGCGGCC GCTTTGTAGAG	PromotorFusion full H2B
<b>mcherry_h2bOL_rev</b>	TTTCGGCGGCGGCTTTTGGTGGCATAGCGGCCGCT TTGTAGAG	C-terminale Promotorfusion
<b>H2B_cherryOL_for</b>	GGATGAACTCTACAAAGCGGCCGCTATGCCACCAA AAGCCGCC	C-terminale Promotorfusion
<b>H2B_tubtOL_rev</b>	CAAAGTAGGAATGACATCAGATATCTATTTGGCAGA CGAGGAAGAGTA	C-terminale Promotorfusion
<b>col19_mcsOL_for</b>	AGATATCCTGCAGGAATTCTCGAGACGTACCATTA TTCGAGACAAC	col19 Promotor (hypodermal) in ppf37 cyrA-GFP
<b>col19_cyraOL_rev</b>	ATGAGTCGTATACATTGGGGTTCATGTTGATGAACT GATGTCTTTCTAAA	col19 Promotor (hypodermal) in ppf37 cyrA-GFP
<b>cyrA_ohneSP_for</b>	ATGAACCCCAATGTATACGACT	col19 Promotor (hypodermal) in ppf37 cyrA-GFP; Backbone
<b>unc_UTR_for-P</b>	TGAGAGCTCCGCATCGGC	Effektoren in ppf37 ohne GFP
<b>CyrA_rev-P</b>	GTAGCACTTTTCGCACAAAGTCT	Effektoren in ppf37 ohne GFP
<b>cherry_tubtOL_rev</b>	GCAAAGTAGGAATGACATCAGATATTTATTTGTAGA GTTTCATCCATTCC	PromotorFusion H2B Cherry new
<b>trpcT_rev</b>	TGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	C-terminal cyrA RFP unter cyrA(P)
<b>cyrA_P_trpctOL_for</b>	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATGCATTCCAAT CACTCAACCC	C-terminal cyrA RFP unter cyrA(P)
<b>cyrA_P_cyraOL_rev</b>	GAACGATAGTGCTGAGGAGCTGCATTTTCGACAGT ATTTGTGAAAAGAAGT	C-terminal cyrA RFP unter cyrA(P)
<b>cyrA_P_mid_for</b>	CTC TTT GCA AAC TTG ACT AAA AG	Sequenzierung PromotorFusions cyrAP

<b>eftP_mid_for</b>	ACCGTCCGCACTCTTCTTA	Sequenzierung ppf37
<b>CyrA_halfSP_rev_P</b>	ACGGCAAGAACGATAGTGCTGAGGAGCTGCATGAG CAAAGTGTTTCCCA	CyrA mit SP for C. <i>elegans</i>
<b>CyrA_halfSP_for_P</b>	CCCTCTTTTCATGTCTGTGCGCCATGGCCAACCCCAA TGTATACGACTC	CyrA mit SP for C. <i>elegans</i>
<b>unc_seq_rev</b>	AGCACAGGGAGAAAGAGCAT	Klonierung
<b>RabA_inkl_asc_for</b>	AGGCGCGCCATGGCTGAA	RabA_Cherry
<b>Olic(p)_2_rev</b>	GGTTGGATCGATTGTGATGTGAT	RabA_Cherry
<b>mCherry_olicOL_for</b>	CCATCACATCACAATCGATCCAACCATGGTAAGCAA GGGCGAGG	RabA_Cherry
<b>mcherry_rabOL_rev</b>	GACCGCCTTCAGCCATGGCGCGCCTAGCGGCCGC TTTGTAGAGT	RabA_Cherry
<b>olicP_rev</b>	TTGGATCGATTGTGATGTGATGG	olic H2B mCherry Promotorfusion Kontrolle
<b>bcmCherry_no_start_for</b>	GTA AGC AAG GGC GAG GTA AG	olic H2B mCherry Promotorfusion Kontrolle
<b>H2B_olipOL_for</b>	CTCCATCACATCACAATCGATCCAAATGCCACCAAA AGCCGCC	olic H2B mCherry Promotorfusion Kontrolle
<b>H2B_cherryOL_rev</b>	GATTACTTACCTCGCCCTTGCTTACTTTGGCAGACG AGGAAGAGT	olic H2B mCherry Promotorfusion Kontrolle
<b>BroA_asc_for</b>	TATGGCGCGCCATGGCCGGACTTCACCAAG	C-terminale GFP Fusion
<b>BroA_pac_rev</b>	GCGTTAATTAATCTCCAAGATTGAAGACCTGAC	C-terminale GFP Fusion No stop
<b>BroA_vector_rev</b>	CTTAATTAATCTCCAAGATTGAAGA	BB austausch c-terminal mCherry in supermorf mit pacl schnittstelle
<b>cherry_broOL_for</b>	TCTTCAATCTTGGAGATTAATTAAGGTAAGCAAGGG CGAGGTAA	austausch c-terminal mCherry in supermorf mit pacl schnittstelle
<b>cherry_tglucOL_rev</b>	TAATCATAACATCTTATCTACATACGCTAAGCGGCCG CTTTGTA	austausch c-terminal mCherry in supermorf mit

		pacl schnittstelle
<b>col19_mcsOL_for</b>	AGATATCCTGCAGGAATTCCTCGAGACGTACCATTA TTCGAGACAAC	col19 Promotor cyrA-GFP
<b>col19_cyraSP OL_rev</b>	GAACGATAGTGCTGAGGAGCTGCATGTTGATGAAC TGATGTCTTTCTAA	col19 Promotor SP cyrA-GFP
<b>ppf37_MCS_rev</b>	CCTGCAGGAATTCCTCGAG	col19 Promotor cyrA-GFP; Backbone
<b>ppf37_MCS_rev_new</b>	CTCGAGGAATTCCTGCAGG	col19 Promotor cyrA-GFP; Backbone
<b>cyra_mid_rev</b>	TGTTGTCATAGGCCTTGTTG	Sequenzierung von cyrA N-terminal
<b>cyrA_qPCR_for</b>	TCTTGCCGTCCTCTTTTCA	qRT-PCR cyrA
<b>cyrA_qPCR_rev</b>	TCCGGTATCTTTGGCACCAT	qRT-PCR cyrA
<b>CyrA_Q1_for</b>	ATGCAGCTCCTCAGCACTAT	qPCR
<b>CyrA_Q1_rev</b>	GCACCATACTTGGTAGGGGT	qPCR
<b>CyrA_Q2_for</b>	ATGCCAAAGACACCCCTACC	qPCR
<b>CyrA_Q2_rev</b>	GATTGTTCCGCATCCCTTGG	qPCR
<b>GFP_olicOL_for</b>	CTCCATCACATCACAATCGATCCAAATGGTTTCCAA GGGTGAGGT	N-terminal GFP Fusion BroA; start codon
<b>GFP_BroAol_rev</b>	TCATAGGAGCTTGGTGAAGTCCGGCAGCGGCCGCT TTGTAAAGTT	N-terminal GFP Fusion BroA; GFP no stop; Broa no start
<b>BroA_GFPol_for</b>	GGATGAACTTTACAAAGCGGCCGCTGCCGGACTTC ACCAAGCT	N-terminal GFP Fusion BroA; GFP no stop; Broa no start
<b>BroA_gluCTol_rev</b>	TAATCATACATCTTATCTACATACGTTATCTCCAAGA TTGAAGACCTG	N-terminal GFP Fusion BroA; broA stop
<b>dfIGPD_bbOL_for</b>	TCGAGTTTTTCAGCAAGATGGATCCGGTATCTATTA CATTGCATTGC	<i>D. flagrans</i> gpd promoter g418
<b>dfIGPD_g418O L_rev</b>	CGTGCAATCCATCTTGTTCATCATTGTTGAATTATTG ACTTTTGTGCGAG	<i>D. flagrans</i> gpd promoter g419
<b>G418_for</b>	ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG CA	<i>D. flagrans</i> gpd promoter g420

<b>SMBackbone_rev</b>	GGATCCATCTTGCTGAAAACT	<i>D. flagrans</i> gpd promoter g421
<b>SPcyrA_rev_P</b>	GGGGTTGGCCATGGCGAC	cyrAP::SP- GFP in pNH32/pNH2 1
<b>bcGFP_nostart_for_P</b>	GTTTCCAAGGGTGAGGTAAGTAAT	cyrAP::SP- GFP
<b>unc54_MCSol_for 57.6</b>	AGATATCCTGCAGGAATTCCTCGAGGAATCTAAAA TGGTTCGGTAAC	CyrA Expression in <i>C. elegans</i>
<b>unc54_cyraOL_rev 56.4</b>	ATGAGTCGTATACATTGGGGTTCATGATTTCTCGCT TCTTCAAATG	CyrA Expression in <i>C. elegans</i>
<b>myo3_MCSol_for 57.6</b>	AGATATCCTGCAGGAATTCCTCGAGCAATTTCTGAA ACGCGTTCTTAA	CyrA Expression in <i>C. elegans</i>
<b>myo3_cyraOL_rev 57.5</b>	ATGAGTCGTATACATTGGGGTTCATTTCTAGATGGA TCTAGTGGTC	CyrA Expression in <i>C. elegans</i>
<b>unc86_MCSol_for 55.9</b>	AGATATCCTGCAGGAATTCCTCGAGAACGAATGAAA AAGTGAAATTGAA	CyrA Expression in <i>C. elegans</i>
<b>unc86_cyraOL_rev</b>	ATGAGTCGTATACATTGGGGTTCATAAGTGGATTTG TCAACTGCG	CyrA Expression in <i>C. elegans</i>
<b>myo3_MCSol_for_V2</b>	AGATATCCTGCAGGAATTCCTCGAGCTGAAACTACC GATCATTGAAC	CyrA Expression in <i>C. elegans</i>
<b>unc54_MCSol_for_V2</b>	AGATATCCTGCAGGAATTCCTCGAGAGAATTGAAG CAATCGTGCAG	CyrA Expression in <i>C. elegans</i>
<b>unc54_for</b>	GAGCTCCGCATCGGCCCG	scarlet unter hsp-16.48 Promoter
<b>miniPPF_rev</b>	GGGCCCTGTGAAATTGTTATCCG	scarlet unter hsp-16.48 Promoter
<b>hspP_ppfOL_for</b>	AGCGGATAACAATTTACAGGGCCCGCTGGACGGA AATAGTGGTAA	scarlet unter hsp-16.48 Promoter
<b>hspP_uncOL_rev</b>	TAACTGCCTCTCCCTTGCTGACCATTTCTTGAAGTT TAGAGAATGAACAG	scarlet unter hsp-16.48 Promoter
<b>scr_hspPol_for</b>	CTGTTTATTCTCTAAACTTCAAGAAATGGTCAGCAA GGGAGAGG	scarlet unter hsp-16.48 Promoter
<b>scr_uncOL_rev</b>	GACAGCGGCCGATGCGGAGCTCTTACTTGTAGAGC TCGTCCATTC	scarlet unter hsp-16.48 Promoter
<b>hspP_cyraOL_rev</b>	GAACGATAGTGCTGAGGAGCTGCATTTCTTGAAGTT TAGAGAATGAACAG	CyrA scarlet unter hsp- 16.48 Promoter

<b>cyrA_hspPol_for</b>	CTGTTTCATTCTCTAAACTTCAAGAAATGCAGCTCCT CAGCACTAT	CyrA scarlet unter hsp- 16.48 Promoter
<b>cyrAnoSTOP_scrOL_rev</b>	TGATAACTGCCTCTCCCTTGCTGACGTAGCACTTTT CGCACAAAGTC	CyrA scarlet unter hsp- 16.48 Promoter
<b>scr_cyraOL_for</b>	TAAGACTTTGTGCGAAAAGTGCTACGTCAGCAAGG GAGAGGCA	CyrA scarlet unter hsp- 16.48 Promoter
<b>cyrA_noSP_oliOL_for</b>	CTCCATCACATCACAATCGATCCAAATGAACCCCAA TGTATACGACTCAT	C-terminal CyrA ohne SP
<b>cyrA_nostop_gfpOL_rev</b>	GATTACTTACCTCACCTTGGAAACGTAGCACTTTT CGCACAAAGT	C-terminal CyrA ohne SP
<b>hsp16.48P_rev</b>	TTCTTGAAGTTTAGAGAATGAACAG	Klonierung
<b>Scar_for</b>	GTC AGC AAG GGA GAG GCA	Klonierung
<b>olicP_efiOL_for</b>	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCTGCAGCTGTG GAGCCGCATT	SP-CyrA in efi Backbone
<b>cyraSP_GFPol_rev</b>	TACTTACCTCACCTTGGAAACCATGGGGTTGGCC ATGGCGAC	SP-CyrA in efi Backbone
<b>irg-1_Q_for</b>	CCGAAGACCGCACAAAAGTA	qPCR
<b>irg-1_Q_rev</b>	TGTCCATGTCCCCAACTAGC	qPCR
<b>CyrA_stop_uncOL_rev</b>	GATGACAGCGCCGATGCGGAGCTCTTAGTAGCAC TTTTCGCACAAAGT	CyrA ohne tag in elegans; 112 or 121 for
<b>CyrA_olicOL_for</b>	CTCCATCACATCACAATCGATCCAAATGCAGCTCCT CAGCACTAT	CyrA ohne tag in Dfl
<b>CyrA_tglucOL_rev</b>	TAATCATACTTATCTACATACGCTAGTAGCACTT TTCGCACAAAGT	CyrA ohne tag in Dfl
<b>cyrALB_trpcOL_for</b>	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATGCATTCCAAT CACTCAACC	CyrA ohne tag in Dfl
<b>cyrARB_Bbol_rev</b>	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATCTGATGAATAC TGCTATTTGGAT	CyrA ohne tag in Dfl
<b>SuMo_BB_for</b>	ATC TTT CTA GAA GAT CTC CTA CA	Klonierung
<b>Rab-3P_miniBBol_for</b>	AGCGGATAACAATTTACAGGGCCCGATCTTCAGA TGGGAGCAGT	<i>C. elegans</i> neuronal promoter CyrA
<b>Rab-3P_cyrAol_rev</b>	ATGAGTCGTATACATTGGGGTTCATCTGAAAATAGG GCTACTGTAGA	<i>C. elegans</i> neuronal promoter
<b>elt-2P_miniBBol_for</b>	AGCGGATAACAATTTACAGGGCCCTAATTTTCGAAA TGTATGAACTCCAAT	<i>C. elegans</i> intestinal promoter
<b>elt-2P_cyrAol_rev</b>	TCGTATACATTGGGGTTCATTCTATAATCTATTTTCT AGTTTCTATTTTA	<i>C. elegans</i> intestinal promoter
<b>bgIA_SP_for</b>	TCACAATCGATCCAACCGGCGGCCATGGCTCCCA GCAAAGTCTT	SP-GFP Fusion

<b>bgIA_SP_rev</b>	GATTACTTACCTCACCTTGGAACTTCTTGGGCGC CCGTTAG	SP-GFP Fusion
<b>PefB_SP_for</b>	TCACAATCGATCCAACCGGCGCGCCATGCTTCGCA AAGTCGTCGTC	SP-GFP Fusion
<b>PefB_SP_rev</b>	GATTACTTACCTCACCTTGGAAACGGGGGCAGCA GCCACG	SP-GFP Fusion
<b>654_SP_for</b>	TCACAATCGATCCAACCGGCGCGCCATGCGCGGTC TCCTCACTTA	SP-GFP Fusion
<b>654_SP_rev</b>	GATTACTTACCTCACCTTGGAAACGGGACCGGCG AGGGCC	SP-GFP Fusion
<b>9889_SP_for</b>	CATCACATCACAATCGATCCAATCTAGAATGAACT CTTCGCTTTCTGTT	SP-GFP Fusion
<b>9889_SP_rev</b>	TGAAAAGCTCCTCACCTTGGAACTCCCTGAGCTA GAACCGCGG	SP-GFP Fusion
<b>1625_SP_for</b>	CATCACATCACAATCGATCCAATCTAGAATGCAGCT GACTAATCTCATCC	SP-GFP Fusion
<b>1625_SP_rev</b>	TGAAAAGCTCCTCACCTTGGAACTGGGCTCGCG TTCAGGGC	SP-GFP Fusion
<b>3229_SP_for</b>	CCATCACATCACAATCGATCCAATCTAGAATGCAGC TCTCAAACTCGCC	SP-GFP Fusion
<b>3229_SP_rev</b>	TGAAAAGCTCCTCACCTTGGAAACGGCGGCAGCC AGGACGGT	SP-GFP Fusion
<b>9757_SP_for</b>	TCACATCACAATCGATCCAATCTAGAATGAAAGGAA TTTACATCACCGTC	SP-GFP Fusion
<b>9757_SP_rev</b>	TGAAAAGCTCCTCACCTTGGAAACAGGGGCGGCG AAAGCTGC	SP-GFP Fusion
<b>5719_SP_for</b>	TCCATCACATCACAATCGATCCAATCTAGAATGAAG GCCGCTTTCCTCTT	SP-GFP Fusion
<b>5719_SP_rev</b>	TGAAAAGCTCCTCACCTTGGAAACGGTTTGAGCC AAAGCGCCA	SP-GFP Fusion
<b>cherry_cyraOL_for</b>	TAAGACTTTGTGCGAAAAGTGCTACGTAAGCAAGG GCGAGGTAA	CyrA- mCherry- G418/ 5 rev
<b>cyrA_SP_scar OL_rev</b>	TGATAACTGCCTCTCCCTTGCTGACGGGGTTGGCC ATGGCGAC	SP-Scar
<b>unc122P_MCS ol_for</b>	AGATATCCTGCAGGAATTCCTCGAGGTTTTCCCGCT GATAAATTGTA	unc-122P- GFP
<b>unc122P_GFP ol_rev</b>	CTGAGCCTCCAGATCCACCTGACATATTGTGAGCC CAATGAAGTAAAATT	unc-122P- GFP
<b>emGFP_unc12 2Pol_for</b>	AATTTTACTTCATTGGGCTCACAATATGTCAGGTGG ATCTGGAGGC	unc-122P- GFP; MCS_rev
<b>Cherry_glucTO L_rev_2</b>	TAATCATACATCTTATCTACATACGCTAAGCGGCCG CTTTGTAG	CyrA- mCherry
<b>Cherry_nostar cyrA_for</b>	TAAGACTTTGTGCGAAAAGTGCTACGTAAGCAAGG GCGAGGTAA	CyrA- mCherry
<b>col19P_rev</b>	GTTGATGAACTGATGTCTTTCTAAATG	Klonierung
<b>cyrA_col19pO L_for</b>	TTTAGAAAGACATCAGTTCATCAACATGAACCCCAA TGTATACGAC	Col-19 Expression
<b>bcCherry_noA TG_for</b>	GTA AGC AAG GGC GAG GTA A	bgla-cherry Fusion
<b>bgla_olicOL_for</b>	CTCCATCACATCACAATCGATCCAATGGCTCCCAG CAAAGTCTT	bgla-cherry Fusion
<b>bglaP_trpctOL_for</b>	ATGCTCTTCCCTAAACTCCCCCATTTGTAATTGC GGTGTGATGTAT	bglaP own P Fusion



<b>cyra_pOL_for</b>	CTTCTTTTCACAAATACTGTCGAAAATGCAGCTCCT CAGCACTAT	cyraP- cyra_h2B_ch erry
<b>cyrA_H2BOL_r ev</b>	TCTTTTCGGCGGGCGGCTTTTGGTGGGTAGCACTTTT CGCACAAAGT	Klonierung
<b>dfIH2B_nostart _for</b>	CCACCAAAGCCGCCGCC	Klonierung
<b>CyrA_pro_rev</b>	TTTCGACAGTATTTGTGAAAAGAAGTA	Klonierung
<b>Exo_LBol_for</b>	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATTACCATTGGAT GATGACGTTGTT	<i>ExoA</i> Deletion
<b>Exo_Lbol_rev</b>	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTGGTCCGGTGCTT TTTATTGTCC	<i>ExoA</i> Deletion
<b>hph_exoOL_fo r</b>	GAGGGGACAATAAAAAGCACCGACCAAGTGTAAATG CTAGTGGAGGT	<i>exoA</i> Deletion
<b>hph_exoOL_re v</b>	AAGCAGAAGAGACAAAACCCCAAGATGGGGGGAGT TTAGGGAAA	<i>exoA</i> Deletion
<b>Exo_Rbol_for</b>	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATCTTGGGGTTT TGTCTCTTCT	<i>exoA</i> Deletion
<b>Exo_RBol_rev</b>	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATGGCTACGCATG CTATGAAG	<i>exoA</i> Deletion
<b>Exo_LB_for</b>	TAC CAT TGG ATG ATG ACG TTG	<i>exoA</i> Deletion
<b>Exo_RB_rev</b>	GGCTACGCATGCTATGAAG	<i>exoA</i> Deletion
<b>Exo_Genomic_ for</b>	CGT AGG GAA AAC ACA GGT TTA T	<i>exoA</i> Deletion check
<b>Exo_genomic_ rev</b>	GAACCTCATCCACACCCGA	<i>exoA</i> Deletion check
<b>Exo_mid_rev</b>	CTTTCGAATCGTATTCTCCTC	<i>exoA</i> Deletion
<b>Sec_Lbol_for</b>	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATAGAGCCAAGG AATGGGGATG	<i>Sec</i> Deletion
<b>Sec_Lbol_rev</b>	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTCGTTGCGGTCCG GTGAGCT	<i>secA</i> Deletion
<b>hph_secOL_fo r</b>	AGCTCCAAGCTCACCGACCGCAACGAAGTGTAAATG CTAGTGGAGGT	<i>secA</i> Deletion
<b>hph_secOL_re v</b>	TAACGCTCTCACCGCGAGGTTTTGTTGGGGGGAGT TTAGGGAAA	<i>secA</i> Deletion
<b>secA_Rbol_for</b>	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAACAAAACCTCG CGGTGAGA	<i>secA</i> Deletion
<b>secA_Rbol_rev</b>	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATAGGAAATGTTT TGTGTCTGGTG	<i>secA</i> Deletion
<b>secA_LB_for</b>	AGAGCCAAGGAATGGGGATG	<i>secA</i> Deletion
<b>secA_RB_rev</b>	AGGAAATGTTTTGTGTCTGGTGA	<i>secA</i> Deletion
<b>secA_genomic _for</b>	CAA CTA TGA CAA AGC TGC TCC	<i>secA</i> Deletion
<b>secA_genomic _rev</b>	TGAAGACAAGACAGATTCTATTATAAA	<i>secA</i> Deletion
<b>GlaA_SP_for</b>	CCATCACATCACAATCGATCCAATCTAGAATGCGCG TCTTTGGTTTGTTT	GlaA-SP

<b>GlaA_SP_rev</b>	TGAAAAGCTCCTCACCCCTTGGAACCGGAGTCGCC CAAGCAAG	GlaA-SP
<b>CyrASP_Eco_olicOL_for</b>	CCATCACATCACAATCGATCCAAGAATTCATGCAGC TCCTCAGCACTAT	CyrA-SP-Fusion
<b>CyrASP_cherryOL_rev</b>	GATTACTTACCTCGCCCTTGCTTACGGGGTTGGCC ATGGCGA	CyrA-SP-Fusion
<b>CyrA_cherryOL_rev</b>	GATTACTTACCTCGCCCTTGCTTACGTAGCACTTTT CGCACAAAGT	Klonierung
<b>bcCherry_nostart_for</b>	GTAAGCAAGGGCGAGGTAA	Klonierung
<b>bcGFP_nostart_for</b>	GTT TCC AAG GGT GAG GAG C	Klonierung
<b>ClaHp_tglucOL_for</b>	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATCTCGGTTCT CCCGCTT	ClaH-GFP
<b>ClaH_gfpOL_rev</b>	GATTACTTACCTCACCCCTTGGAACGAATCCACGAT AACCAGTAG	ClaH-GFP
<b>Exo70_for</b>	ATG GCG GTC CTC CCA GAG	Exo70 Deletion
<b>sec5_for</b>	ATG CAG GCC ATC AAA CTA CC	secA Deletion
<b>sec5_mid_rev</b>	TGGATATCGAGCTCTGTTGG	secA Deletion
<b>Scar_col19p_for</b>	TTTAGAAAGACATCAGTTCATCAACATGGTCAGCAA GGGAGAGG	col-19p- scarlet
<b>cyrA+SP_col19pOL_for</b>	TTTAGAAAGACATCAGTTCATCAACATGCAGCTCCT CAGCACTAT	col19p- cyrA+SPnoG FP
<b>emGFP_cyrAnostop_for</b>	TAAGACTTTGTGCGAAAAGTGCTACTCAGGTGGATC TGGAGGC	col19p- cyrA+SPnoG FP
<b>emGFP_UTROl_rev</b>	GATGACAGCGGCCGATGCGGAGCTCTCATTTGTAA AGTTCATCCATTCC	col19p- cyrA+SPnoG FP

## 4.2 Verwendete Geräte und Chemikalien

### Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien stammen, falls im Text nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Biozym (Hessisch Oldendorf), Zymo Research (Freiburg), Bio-Rad (München), Nippon Genetics (Düren) und Macherey-Nagel (Düren). Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten und die Synthese von Oligonukleotiden erfolgte durch Eurofins Genomics (Ebersberg). Restriktionsenzyme und DNA-Polymerasen wurden von New England Biolabs (Frankfurt) erworben.

## Kits

Tabelle 7: In dieser Tabelle sind alle im Laufe der Arbeit verwendeten Kits aufgeführt.

Name	Hersteller	Verwendung
Ambion Turbo DNA Free Kit	Invitrogen	DNase-Verdau von RNA
DIG Probe Synthesis Kit	Roche	Synthese von DIG-Sonden für Southern-Blot Analysen
Luna One-Step RT-qPCR Kit	New England Biolabs GmbH	qRT-PCR
Plasmid Easypure Kit	Macherey-Nagel	Plasmid-DNA-Isolation
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research US	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.

## Verwendete Geräte

Tabelle 8: In dieser Tabelle sind alle verwendeten Geräte mit Hersteller aufgelistet.

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	3870ELV	Tuttnauer, Breda
Gefrierschrank (-80 °C)	Innova U101	New Brunswick Scientific, Hamburg
Gel Doc	FAS-V	Nippon Genetics
Gelelektrophoresekammer	Mupid-exU	Advance, Tokyo
Hybridisierungssofen	HB-1000 Hybridizer	UVP, Cambridge
Inkubatoren	Mintron AL 72 Heraeus 6000 INCU-Line 250R IPP30	Infors HAT, Bottmingen-Basel Heraeus, Instruments Hanau VWR Memmert, Büchenbach
Kompressor	FemtoJet 4i	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Axio Imager Z1 LSM 900 Axio Observer Z1	Zeiss, Jena Zeiss, Jena Zeiss, Jena
PCR-Cycler	Labcycler iCycler IQ	SensoQuest, Göttingen Bio-Rad, Kalifornien, USA
Photospektrometer	Nanodrop Nd 1000	Peqlab, Erlangen
Stratalinker	BLX-E254	Peqlab Biotechnologie GmbH
Thermocycler	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

Vortexer	Vortex-Genie2	Scientific Industry, Inc., New York
Zentrifugen	Eppendorf 5415R AccuSpin Micro 17 Universal 320 R	Eppendorf, Hamburg Fisher Scientific, Schwerte Hettich, Tuttlingen

### Antibiotika

Ampicillin Stammlösung: 100 mg/ml

Hygromycin Stammlösung: 100 mg/ml

Geneticin Stammlösung: G480: 50 mg/ml

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

#### Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*: Alkalische Lyse

Für die Klonierung wurde Plasmid-DNA von *E. coli* Transformanden mittels alkalischer-Lyse isoliert. Dafür wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur für eine Minute bei 13000 rpm pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl Resuspensionspuffer gelöst. Es wurden 200 µl Lysis-Puffer hinzugegeben und durch invertieren gemischt. Proteine wurden mit 200 µl einer 1,5 M Kaliumacetatlösung (pH 4,8) gefällt und 10 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. Für die Fällung der DNA wurde der Überstand in Reaktionsgefäße mit 500 µl 100 % Isopropanol überführt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die DNA wurde danach für 15 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm pelletiert und mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei 55 °C getrocknet und in 20 µl dH<sub>2</sub>O für 10 Minuten gelöst.

Tabelle 9: Lösungen für die Präparation von Plasmid-DNA

Puffer	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCL pH 7,5 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA 100 µg/ml RNase A
Lysis-Puffer	0,2 M NaOH
Kaliumacetat	1 % SDS 1,5 M Kaliumacetat pH 4,8

### Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*: Analytischer Maßstab

Für die Plasmid-DNA Extraktion bereits verifizierter Stämme für die Transformation von *D. flagrans* und *C. elegans* wurde das Macherey Nagel NucleoSpin Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde in 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

### Präparation von genomischer DNA aus *D. flagrans*

Für die Isolation genomischer DNA aus *D. flagrans* wurden mit einer Impföse Sporen von einer 7-Tage alten PDA-Petrischale in flüssiges PDM in einer 3,5 cm Petrischale überführt und für 48 Stunden bei 28 °C stehend inkubiert. Für den Zellaufschluss wurde die Kahmhaut in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit 700 µl Lysispuffer versetzt. Die Proben wurden für 60 Minuten schüttelnd bei 68 °C auf einem Thermomixer inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl 3 M Kaliumacetat-Puffer wurden Proteine auf Eis gefällt, wobei das Reaktionsgefäß alle 5 Minuten invertiert wurde. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C für 15 Minuten und 13000 rpm wurde 500 µl des Überstands in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol für 20 Minuten bei – 20 °C gefällt. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (15 Minuten 13000 rpm 4 °C) wurde das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 55 °C getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A bei 68 °C schüttelnd gelöst.

**Tabelle 10: Puffer für die Isolation genomischer DNA aus *D. flagrans* Flüssigkulturen**

Puffer	Zusammensetzung
Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCL, pH 7,5 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8,0 50:50 mit 1xTE-Puffer mischen
Kaliumacetat-Puffer	1 % SDS 1,5 M Kaliumacetat pH 4,8
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCL, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA

### Isolation von gDNA aus *D. flagrans* Kolonien

Für die Isolation von gDNA von Transformanden direkt von der Agar-Platte wurde ein Stück Agar (etwa 0,25 cm<sup>2</sup>) vom äußeren Wachstumsbereich der Hyphen ausgeschnitten und in 700 µl Lysis-Puffer überführt. Der Agar-Block wurde mit Hilfe eines Mikropistills zerstoßen und die Proben anschließend für 60 Minuten bei 65 °C auf einem Thermoschüttler, schüttelnd inkubiert. Für die Fällung der Proteine wurde 300 µl KAc-Puffer zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und Agar wurden bei einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 4 °C) abzentrifugiert und der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml 100 % Ethanol überführt und invertiert. Die DNA wurde 15 Minuten auf Eis gefällt und anschließend pelletiert (13000 rpm 4 °C 10 Minuten). Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, 5 Minuten getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A schüttelnd bei 68 °C gelöst.

**Tabelle 11: Puffer für die Isolation von gDNA aus *D. flagrans* Kolonien**

Puffer	Zusammensetzung
Lysis-Puffer	0,2 % SDS 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8,0
Kaliumacetat Puffer	1,5 M KaC, pH 4,8

### Extraktion genomischer DNA aus *C. elegans*

Für die Extraktion genomischer DNA aus *C. elegans* wurden 2 Petrischalen mit der gewünschten Population in ein 2 ml Reaktionsgefäß abgespült und gewaschen. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurde 500 µl Wurm-Lysis-Puffer und 20 µl Protease K (20 mg/ml) zugegeben und 1 Minute lang auf einem Vortex geschüttelt. Nach Zugabe von 10 µl RNase (10 mg/ml) wurden die Proben 60 Minuten bei 65 °C schüttelnd inkubiert. Es wurde 500 µl Phenol:Chloroform zugegeben und 1 Minute gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 50 µl NaOAc-Puffer zugegeben. Es wurden 2.5 Volumen 70 % Ethanol für die Fällung der DNA zugegeben, invertiert und die DNA 5 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, 5 Minuten bei 55 °C getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer schüttelnd bei 68 °C eluiert.

Tabelle 12: Puffer für die Isolation von gDNA aus *C. elegans*

Puffer	Zusammensetzung
Wurm-Lysis-Puffer	0,1 M Tris-HCL, pH 8,5 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8,0 0,1 M NaCl 0,1 % SDS
Natriumacetat	3 M NaOAc
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCL, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA

### RNA Isolation aus *D. flagrans*

Für die RNA-Isolation aus induziertem Pilz-Myzel wurden 2 Millionen *D. flagrans* Sporen auf mit Cellophan-Folie belegten LNA-Platten ausplattiert und für 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Für die Induktion der Fallen wurde eine gemischte Population *C. elegans* N2 zugegeben, der Kontrolle wurden keine Würmer zugefügt. Nach weiteren 24 Stunden Ko-Inkubation bei 28 °C wurde das Myzel mit Hilfe eines Spatels von der Cellophan-Folie abgekratzt und das Material von jeweils 5 Platten zu einer Probe zusammengefügt. Die Myzel-Pellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mikropistill gemörsert.

Anschließend wurde 1 ml Trizol zugegeben und nach einem kurzen Vortexvorgang (15 Sekunden) wurden die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min, 4 °C bei 13000 rpm wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde nun mit 200 µl Chloroform gemischt und für weitere 15 Sekunden gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur erfolgt ein weiterer Zentrifugationsvorgang (15 min, 4°C, 13000 U/min). Die wässrige Phase wurde danach in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt und dieses invertiert. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die RNA für 15 Minuten bei 4 °C und 13000 U/min pelletiert und anschließend mit 500 µl 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 4 °C, 9000 rpm) wurde das restliche Ethanol entfernt, das RNA-Pellet getrocknet und anschließend in 30 µl DEPC H<sub>2</sub>O eluiert.

### **RNA Extraktion aus *C. elegans***

Für Die RNA Extraktion aus *C. elegans* wurde eine NGM-Platte mit der gewünschten Population *C. elegans* mit dH<sub>2</sub>O abgespült und gewaschen. Das Wurm-Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mikropistill gemörsert. Danach wurde 500 µl Trizol (Invitrogen) auf die Proben gegeben und diese auf einem Vortex geschüttelt. Die Proben wurden nun dreimal in flüssigem Stickstoff weggefroren, bei 37 °C wieder aufgetaut und gevortext. Danach wurden die Proben dreimal abwechselnd 30 Sekunden auf Eis inkubiert und 30 Sekunden gevortext. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurden die Proben invertiert und drei Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde bei 13000 rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 0.7 Volumen 100 % Isopropanol überführt, invertiert und nun 10 Minuten bei RT inkubiert. Die RNA wurde für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C pelletiert und anschließend mit 500 µl kaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Das Pellet wurde für 5 Minuten bei 60 °C getrocknet und daraufhin bei 60 °C schüttelnd in 50 µl DEPC H<sub>2</sub>O gelöst.



## Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR-Reaktion (K. Mullis et al. 1986; J. Bell 1989) wurde für die Amplifikation spezifischer, doppelsträngiger DNA-Fragmente verwendet. Eine thermostabile DNA-Polymerase amplifiziert hierbei mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden und dNTPs DNA-Fragmente. Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 50  $\mu$ l mit der Phusion-DNA-Polymerase oder der Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (*NEB*) wie folgt durchgeführt:

10  $\mu$ l 5x HF-Puffer  
 1  $\mu$ l dNTPs (10 mM)  
 2,5  $\mu$ l 5'Primer (10 mM)  
 2,5  $\mu$ l 3'Primer (10 mM)  
 100 ng Matrizen-DNA  
 2,5 U DNA-Polymerase  
 H<sub>2</sub>O ad 50  $\mu$ l

Es wurde das folgende Standard-PCR-Programm verwendet:

5 min 95 °C	(initiale Denaturierung)	} X 35 Zyklen
1 min 95 °C	(Denaturierung)	
1 min 40-65 °C	(Annealing, abhängig von den Primern)	
30 sek/kb 72 °C	(Elongation)	
10 min 72 °C	(Auffüll-Reaktion)	

## Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Um Plasmid-DNA nach einer Klonierung zu überprüfen oder um Vektoren zu linearisieren, wurden Enzyme der Firma New England Biolabs (*NEB*) nach Herstellerangaben angewendet.

## Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet (Sharp 1973). Für die Herstellung der Agarosegele wurde Agarose (0,8 % – 2 %) in 0,5 x TAE-Puffer aufgekocht und in einen Gelschlitten mit passendem Kamm gegossen. Für die Detektion der DNA wurde Midori Green Advance (Biozym) nach Herstellerangaben zugegeben. Das Gel wurde in eine mit 0,5 x TAE-Puffer befüllte Elektrophorese-Kammer gelegt und die DNA mit 1/10 Volumen 6 x Ladepuffer versetzt und in die Taschen geladen. Die 1 kb DNA-Leiter (New England Biolabs) wurde als Größenstandart verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 100 – 130 V für 20 – 30 Minuten. Die DNA-Banden wurden durch Blaulicht detektiert.

**Tabelle 13: Puffer für die Gel-Elektrophorese**

Puffer	Zusammensetzung
TAE-Laufpuffer	40 mM Tris/HCl pH8,3 20 mM Natriumacetat 2 mM EDTA
DNA-Ladepuffer (6 x)	0.25 gr Bromphenolblau 3 ml Glycerin 7 ml dH <sub>2</sub> O

## Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolation spezifischer DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) den Herstellerangaben entsprechend extrahiert und in dH<sub>2</sub>O gelöst.

## Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (1 U/ $\mu$ l) (New England Biolabs, Frankfurt) nach Herstellerangaben verwendet. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 16 °C über Nacht. Die Ligation von

*blunt end* PCR Produkten in den pJet1.2 Vektor erfolgte mit Hilfe des CloneJET PCR Cloning Kits (Fermentas) ebenfalls nach Herstellerangaben.

### Klonierung mittels Gibson-Assembly

Für die Klonierung mittels Gibson-Assembly wurden die DNA-Fragmente und Vektoren mit Primern amplifiziert, die überlappende (15-30 bp), komplementären Bereiche für die Ligation enthalten. Die Fragmente wurden aufgereinigt und in einem 1:2 Verhältnis in die Reaktion mit 15 µl Gibson-Assembly-Enzym-Mix eingesetzt, wobei das Gesamtvolumen auf 20 µl gebracht wurde. Die Reaktion wurde für 30 – 60 Minuten bei 50 °C inkubiert und anschließend 10 µl in *E. coli* transformiert.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Gibson-Assembly-Enzym-Mix.

Reagenz	Konzentration
Iso-Buffer (5x)	26.6 % v/v
T5-Exonuclease (10 u/µl)	5.3 um/ml
Q5-Polymerase (2u/µl)	33.3 u/ml
Taq Ligase (40 u/µl)	5333.3 u/ml
H2O	58.3 % v/v

### DNA-Sequenzierung

Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurden von der Firma Eurofins MWG nach der Kettenabbruchmethode sequenziert.

### qRT RCR

Für Genexpressionsanalysen mittels quantitativer real time PCR wurde das Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (NEB) nach Herstellerangaben verwendet und die Reaktion im iCycler iQ (Bio-Rad) durchgeführt. Die RNA wurde zuvor mit dem DNase-Turbo DNA free kit (Thermo Fischer) behandelt.

Als Haushaltsgen für Expressionsanalysen in *D. flagrans* wurde das putative Aktin-Gen *dfl\_002353* verwendet. Die Expression wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet:

$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Behandlung} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$ ,  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Die Experimente wurden im biologischen- und technischen Triplikate durchgeführt. Für statistische Analysen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. (\* p-Wert < 0.05).

### **Synthese von cDNA aus RNA**

Für die Synthese von kodierender DNA (cDNA) wurde das SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

### **Southern Hybridisierung**

Zur Verifizierung der gentechnisch veränderten *D. flagrans*-Stämme wurden Southern-Analysen durchgeführt. Zunächst wurde die genomische DNA isoliert und die maximale Menge wurde über Nacht mit einem geeigneten Restriktionsenzym in einem 30 µl-Ansatz verdaut, wodurch sich ein Bandenmuster ergibt, in dem sich die Mutante vom Wildtyp unterscheidet. Nach der Restriktion wurde die DNA mittels Gelelektrophorese auf einem 0,8%igen Agarosegel bei 100 V für ca. 2 Stunden getrennt und die DNA wurde durch Färbung mit Midori Green Advance nachgewiesen. Die DNA-Leiter wurde durch Einstiche im Gel markiert.

Das Gel wurde dann für 30 min in 0,25 M HCl geschwenkt, um die DNA zu depurinieren und dann für 30 min in Denaturierungspuffer inkubiert, gefolgt von 30 min in Renaturierungspuffer. Der Transfer der DNA aus dem Gel auf die Nylonmembran (Roti-Nylon plus, Roth) erfolgte über Kapillarkräfte. Eine Glasplatte wurde auf eine Wanne mit 20x SSC-Puffer gelegt und eine Brücke aus Whatman-Papier in Kontakt mit dem Puffer gebracht. Das Gel wurde nun verkehrt herum auf die Brücke gelegt und die Nylon-Membran darauf. Um einen Sog zu erzeugen, wurden mehrere Lagen Whatman-Papier und Papiertücher aufgelegt. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt. Nach erfolgreichem Transfer wurden Größenmarkierungen und Taschen mit einem Bleistift auf der Membran markiert. Danach wurde die DNA mit UV-Licht in einem Stratalinker fixiert. Anschließend wurde die Vorhybridisierung der Membran in

Southern-Hybridisierungspuffer für 30 min bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen durchgeführt. Zur Detektion wurden mit Digoxigenin markierte DNA-Sonden verwendet. Diese wurden durch eine PCR-Reaktion unter Verwendung des DIG Probe Synthese-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) in einem Reaktionsvolumen von 25 µl gemäß den Anweisungen des Herstellers hergestellt. Die Sonde wurde dann über eine Gelelektrophorese aufgereinigt und mittels „freeze and squeeze“ isoliert. Dazu wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, für 20 Minuten bei – 80 °C eingefroren und anschließend die DNA aus dem Gel in ein Reaktionsgefäß ausgedrückt. Die Sonde wurde für 10 Minuten bei 98 °C aufgeköcht, in 15 ml Southern Hybridisierungspuffer gelöst und auf die Membran gegeben.

Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit SSPE-Puffer gewaschen. Für jeweils 15 Minuten mit 2x SSPE + 0,1% SDS, 1x SSPE + 0,1% SDS und 0,1x SSPE + 0,1% SDS bei 65 °C. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde 5 min mit DIG Wash gewaschen und anschließend wurden freie Stellen der Membran durch Inkubation mit 25 ml DIG2 für 30 min blockiert. Die Antikörperlösung wurde in DIG2-Puffer (1:10000 Verdünnung des Anti-DIG-Antikörpers) angesetzt und die Membran für 30 min damit inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 15 min mit 40 ml DIG-Wash gewaschen und mit 40 ml DIG3 für 5 min äquilibriert. Für die Entwicklung wurde die Membran mit 2 ml CDP-Star-Lösung inkubiert und mit dem Chemi-Smart Chemilumineszenz-System (PeqLab) entwickelt. Falls erforderlich wurde die Sonde durch Zugabe von Stripping-Puffer und Inkubation bei 37 °C für 15 min wieder entfernt, sodass die Membran erneut prähybridisiert und mit einer anderen Sonde hybridisiert werden konnte.

**Tabelle 15: Puffer für die Southern-Blot Analyse.**

Puffer	Zusammensetzung
0,25 M HCL	20,7 ml HCl (37 %) in dH <sub>2</sub> O
Denaturierung	87,6 g/l NaCl (1,5 M) 16 g/l NaOH (0,4 M)
Renaturierung	87,6 g/l NaCl (1,5 M) 44,4 g/l Tris-HCl (282 mM) 26,5 g/l Tris-Base (218 mM)
Southern Hybridisierungspuffer	500 ml 1 M Na-Phosphat Puffer (0,5 M); pH 7,0

	70 g SDS (7 %) (autoklaviert) 1 M Natriumphosphatpuffer
1 M Natriumphosphatpuffer	Lösung 1: 177,99 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (1 M) Lösung 2: 156,01 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (1 M) Lösung 1 in ein Becherglas füllen und mit Lösung 2 auffüllen bis ein pH von 7,0 erreicht ist
20 x SSPE:	175,3 g/l NaCl
DIG1	26,6 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 7,4 g/l Na <sub>2</sub> -EDTA x 2H <sub>2</sub> O; pH 7,4 mit NaOH einstellen
DIG Wash	0,3 % Tween-20 in DIG1
DIG2	5 % Milchpulver in DIG1
DIG3	5,84 g/l NaCl 10,17 g/l MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O pH 9,5 mit Tris-HCl einstellen, autoklavieren
CDP-Star Lösung	4 µl CDP-Star (Roche, Mannheim) in 2 ml DIG3
Stripping Puffer	0,2 M NaOH; 0,1 % SDS

### Gezielte Deletion von Genen mittels homologer Rekombination

Für die gezielte Deletion von Genen durch homologe Rekombination wurde eine Deletionskassette erstellt. Auf dieser befand sich die Hygromycin-Resistenzkassette (hph) flankiert von ca. 1 kb großen Regionen, die *downstream* und *upstream* von der zu verändernden Region im *D. flagrans*-Genom lagen. Die Fragmente wurden mittels Gibson-Assembly in den pJET1.2-Vektor kloniert. *E. coli* wurde mit den Vektoren transformiert, die Plasmid-DNA wurde isoliert und mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigt. 7,5 µg der Plasmid-DNA wurde für die Transformation von *D. flagrans* eingesetzt.

## 4.4 Mikrobiologische Methoden

### Kultivierung von Mikroorganismen

Alle Puffer und Medien für die Kultivierung von Mikroorganismen wurden, soweit notwendig, vor der Verwendung für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Filteraufsatzes (Porengröße 0,2 µm; Merck, Darmstadt) steril filtriert.

### Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* wurde für die Flüssigkultur in autoklaviertem Luria-Bertani (LB)-Medium schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Für die Anzucht auf Festmedium in Petrischalen wurde LB mit 1,5 % Agar versetzt. Zur Selektion wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugefügt. Glycerinstocks für die Langzeitlagerung wurden aus einer Mischung der Flüssigkultur mit Glycerin bis zu einer Konzentration von 15 % (v/v) hergestellt und bei – 80 °C gelagert.

Tabelle 16: Medien für die Kultivierung von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung für 1 L
Luria Bertani Medium (LB)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH-Wert 7,0

### Kultivierung von *D. flagrans*

Für Flüssigkulturen wurde *D. flagrans* in autoklaviertem Kartoffel-Dextrose-Medium (*potato dextrose medium*, PDM) bei 28 °C und 180 rpm angezogen. Für die Selektion wurde das Medium mit 100 µg/ml Hygromycin oder 150 µg/ml Geneticin versetzt. Für die Kultivierung auf Festmedium wurde dem Medium 1,5 % Agar zugegeben und zur Selektion positiver Transformanden mit der oben genannten Konzentration Hygromycin versetzt.

Tabelle 17: Medien für die Kultivierung von *D. flagrans*

Medium	Zusammensetzung für 1 L
Kartoffel-Dextrose-Medium	24 g Kartoffel-Dextrose-Bouillon pH-Wert 6,6
PDASS-Top-Agar	24 g Kartoffel-Dextrose-Bouillon 205 g Saccharose 0,3 g Hefeextrakt 0,3 g Pepton pH-Wert 6,6
<i>Low nutrient agar</i> (LNA)	1 g KCL 0,2 g MgSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O 0,4 mg MnSO <sub>4</sub> - 4 H <sub>2</sub> O 0,88 mg ZnSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O 3 mg FeCl <sub>3</sub> - 6 H <sub>2</sub> O 10 g Agar pH-Wert 5,5

### Kultivierung von *C. elegans*

*C. elegans* wurde wie auf Wormbook beschrieben kultiviert (Stiernagle und Theresa February 11, 2006). Für die Anzucht in Petrischalen wurden die Nematoden auf NGM-Agar (nematode growth medium) mit *E. coli* OP50 als Futterquelle bei 20 °C inkubiert. Dazu wurden 800 µl einer *E. coli* OP50 Übernachtskultur auf die NGM-Platten gegeben und über Nacht getrocknet. Für die Subkultivierung wurde ein Stück Agar steril von einer älteren Platte mit *C. elegans* ausgeschnitten und auf eine neue Platte überführt (Evans und Thomas C. April 6, 2006). Alternativ wurden einzelne Nematoden mit einem Platin-Draht auf frische Platten überführt. Für die Verwendung in Experimenten wurden die Nematoden mit dH<sub>2</sub>O oder M9-Puffer von den Platten gespült und durch Zentrifugation bei 2500 rpm für 3 Minuten gewaschen.

Tabelle 18: Medien für die Kultivierung von *C. elegans*.

Medium	Zusammensetzung für 1 L
<i>Nematode growth medium</i> (NGM)	3 g NaCl 2,5 g Pepton 1 ml Cholesterol (5 mg/ml in Ethanol) 17 g Agar Nach dem Autoklavieren steril hinzugeben:



	1 ml CaCl <sub>2</sub> (1 M)
	1 ml MgSO <sub>4</sub> (1 M)
	25 ml KPO <sub>4</sub> Puffer (1 M)
M9-Puffer	3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	5 g NaCl
	1 ml MgSO <sub>4</sub> (1 M)

### Synchronisation von *C. elegans*

Die Behandlung mit alkalischer-Hypochlorit-Lösung wird zur Synchronisation von *C. elegans*-Kulturen im ersten Larvenstadium (L1) eingesetzt. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass die Kutikula der Würmer empfindlich auf Hypochlorid reagiert, während die Eihülle die Embryonen davor schützt. Nach der Behandlung mit der alkalischen Hypochlorit-Lösung werden die Embryonen in M-9 Puffer ohne Nahrung inkubiert, was das Schlüpfen ermöglicht, aber die weitere Entwicklung verhindert und die Population so im L1-Larvenstadium synchronisiert.

Für die Synchronisation wurde eine Petrischale mit adulten Nematoden mit dH<sub>2</sub>O gespült, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und abzentrifugiert (2500 rpm, 1 Minute, RT). Die Würmer wurden mindestens einmal mit Wasser gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und eine Lösung aus 2,5 ml 5 M NaOH, 0,5 ml dH<sub>2</sub>O und 1 ml Chlorix auf das Wurm-Pellet gegeben und für 6 Minuten geschüttelt. Das Zentrifugenröhrchen wurde sofort mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei 2500 rpm für 1 Minute zentrifugiert, um die Reaktion zu stoppen. Die Eier wurden zweimal mit dH<sub>2</sub>O und einmal mit M9-Puffer gewaschen und am Ende in 2 ml M9-Puffer resuspendiert und in 35 mm Petrischalen überführt. Diese wurden für 24 Stunden bei 20 °C inkubiert und anschließend auf eine NGM-Platte mit OP50 überführt.

### Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Plasmid-DNA oder 10 µl eines Gibson-Assembly-Ansatzes mit 50 µl chemokompetenten Zellen gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 1,5 min bei 42 °C. Anschließend

wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert und dann auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### Protoplastierung von *D. flagrans*

In Erlenmeyerkolben wurden 150 ml PDM mit Sporen einer dicht bewachsenen *D. flagrans*-PDA-Platte angeimpft und 24 Stunden bei 28 °C und 180 U/min inkubiert. Das Myzel wurde durch eine Schicht steriles Miracloth in ein Zentrifugenröhrchen filtriert und mit 50 ml MN-Puffer gewaschen. 5 mg/ml Kitalase und 20 mg/ml GlucanX (Novozyme) wurden in 6 ml MN-Puffer gelöst und steril filtriert. Ca. 0,5 g des Myzels wurden in der Enzymlösung bei 28 °C und 70 U/min für 2 Stunden inkubiert. Die Protoplastenbildung wurde mikroskopisch überwacht und anschließend wurden die Protoplasten durch zwei Lagen Miracloth filtriert, um unverdautes Myzel zu entfernen. Das Filtrat wurde mit MN-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und für 20 min bei 5.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die Protoplasten wurden dann zweimal mit 50 ml KTC-Puffer gewaschen und das Protoplastenpellet wurde in 1 ml KTC-Puffer resuspendiert. Die Anzahl der Protoplasten wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt.

### Transformation von *D. flagrans* Protoplasten

Für die Transformation wurden  $8 \times 10^6$  *D. flagrans* Protoplasten in einem Volumen von 100 µl mit 6 - 8 µg der zu transformierenden DNA versetzt. Die Mischung wurde 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml einer PTC6000-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde mit 10 ml handwarmem PDASS gemischt, invertiert und in Petrischalen mit PDA und 100 µg/ml Hygromycin bzw. 150 µg/ml Geneticin gegossen. Die Platten wurden bei 28 °C für 7 Tage inkubiert.

Tabelle 19: Puffer für die Transformation von *D. flagrans*

Puffer	Zusammensetzung
MN Puffer	0,3 mol/l MgSO <sub>4</sub> 0,3 mol/l NaCl
KTC Puffer	1,2 mol/l KCl 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5 50 mmol/l CaCl <sub>2</sub>

PTC6000	10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5 50 mmol/l CaCl <sub>2</sub> 60 % (w/v) Polyethylenglykol-6000
---------	--

### Transformation von *C. elegans* mittels Injektion

Die Transformation von *C. elegans* erfolgte durch Mikroinjektion. Die DNA wurde in den distalen Arm der Gonade injiziert, was zur Integration eines extrachromosomalen Arrays führt, das an die Nachkommen weitergegeben werden kann. Die für die Injektion verwendeten Vektoren wurden zuvor mittels Restriktionsverdau linearisiert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit aufgereinigt. Es wurde ein Injektionsmix aus der jeweiligen Plasmid-DNA (5 ng/μl) und dem Ko-Marker (5 ng/μl) angesetzt und mit 150 ng /μl der 1 kb DNA-Leiter als Füll-DNA aufgefüllt. Vor dem Einsatz der Injektionsmischung wurde das Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert, um Fragmente abzuzentrifugieren, die möglicherweise die Injektionsnadel verstopfen könnten.

Für die Injektion wurden junge, adulte, trächtige Würmer, die nur wenige Eier enthalten, einzeln auf einen Glasobjektträger übertragen, der mit einem dünnen Gelkissen (3 g/l Agarose gelöst in Wasser) bedeckt war. Während der Injektionsprozedur wurden die Würmer in einem kleinen Volumen Halocarbon-Öl 700 (Sigma-Aldrich) gehalten, um Austrocknung zu verhindern. Die Injektionsmischung wurde in eine Glasnadel überführt, die an einen Mikroinjektions-Kompressor (FemtoJet 4i, Eppendorf) angeschlossen wurde. Das Volumen der injizierten Mischung variierte zwischen den einzelnen Injektionssitzungen, was auf die unterschiedlichen Öffnungsflächen der Nadelspitzen zurückzuführen ist. Einzelne injizierte Nematoden wurden auf eine frische NGM-OP50-Platte übertragen. 2 μl M9-Puffer wurde für die Regeneration auf die Würmer gegeben und die Platten wurden bei 20 °C inkubiert. Nach drei Tagen werden die Platten auf positive Transformanten der F1-Generation überprüft, die anhand der Fluoreszenz des Pharynx erkennbar waren. Diese Nematoden wurden nochmals vereinzelt, um die transgenen Linien voneinander zu trennen.

## **Überlebensanalysen von *C. elegans***

Für die Überlebensanalysen von *C. elegans* wurden zunächst NGM-Platten mit 150  $\mu\text{M}$  Floxuridin (FudR, Sigma Aldrich) vorbereitet und ein Rasen einer zweifach-konzentrierten Übernachtskultur *E. coli* OP50 auf diese ausgebracht. Jeweils 30 L4-Larven des jeweiligen Stammes wurden mit einem Platin-Draht auf eine Platte überführt und die Würmer täglich auf ihr Überleben hin überprüft. Nematoden, die nichtmehr auf Berührung reagierten wurden als tot gewertet. Geplatzte Würmer, oder am Rand eingetrocknete Würmer wurden zensiert. Das Experiment wurde zweimal im biologischen Triplikate durchgeführt.

## **Herstellung von *D. flagrans* Sporensuspensionen**

Die Sporen einer 7-Tage alten *D. flagrans*-Platte wurden zusammen mit dem Myzel mit Hilfe einer Impföse abgeschabt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 50 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgefüllt. Nach kurzem Vortexen wurde die Suspension durch eine Lage Miracloth in ein frisches Zentrifugenröhrchen filtriert. Die Sporen wurden durch eine Zentrifugation bei 5000 rpm bei Raumtemperatur für 15 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 45 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Sporen in 3-5 ml sterilem  $\text{dH}_2\text{O}$  gelöst. Die Sporenkonzentration wurde mit einer Zählkammer bestimmt.

## **Induktion der Fallenbildung**

Um die Fallenbildung von *D. flagrans* auf festem Medium zu induzieren, wurden ca. 1 Millionen Sporen auf 60 mm LNA-Platten ausplattiert und mit einer gemischten Population *C. elegans* N2 für 24 Stunden Ko-inkubiert.

Für mikroskopische Analysen wurde LNA zwischen zwei sterile, quer liegende Objektträger pipettiert und entweder eine Sporensuspension (10.000-50.000 Sporen) auf die Objektträger gegeben, oder Sporen mit einem Zahnstocher auf das LNA überführt. Die Objektträger wurden für 24 h in einer Feuchtekammer aus sterilen, mit Wasser gefüllten Petrischalen auf jeweils zwei 1 ml Pipettenspitzen bei 28 °C im Dunkeln inkubiert.

## Mikroskopie

Für Epi-Fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen, sowie für Bilder mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC) wurde ein Zeiss AxioImager Z.1 mit den Objektiven: Plan-Apochromat 63x/1.4 Ölimmersion, EC Plan-Neofluor 40x/0.75, 20x/0.50, EC Plan-Neofluor 10x/0.30 verwendet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer MRm-Kamera unter Verwendung der ZEN Blue Software (2012).

Für die hochauflösende konfokale Mikroskopie wurde ein Zeiss LSM 900 mit Airyscan 2 Detektor verwendet. Für Arbeiten mit *C. elegans* wurde ein Zeiss SteREO Discovery.V12 und ein Zeiss SteREO Lumar.V1 mit Fluoreszenzfiltern verwendet. Für Langzeitaufnahmen wurde ein Zeiss AxioObserver.Z1 mit einem, Zeiss Multi Laser Modul (488 Dioden Laser und 561 nm OPSL Laser) und einem Spinning Disk Modul CSU-X1M 5000 und Evolve 512 Kamera (Photometrics) verwendet.

Zur Färbung der Zellwand wurde der Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor white (CFW, F-3543, Sigma), mit einem Anregungsmaximum von 350 nm und einem Emissionsmaximum von 440 nm verwendet. Eine 1:1000-Verdünnung einer 1 % (w/v) Stammlösung in dH<sub>2</sub>O wurde als Arbeitskonzentration verwendet und vor der Mikroskopie auf die Proben gegeben.

## Datenanalyse und Bildbearbeitung

Für die Bildbearbeitung wurde das Programm Fiji/ImageJ (Version 2.0) verwendet. Daten-Diagramme und statistische Analysen wurden mit der GraphPad Prism Software angefertigt. SecretomeP wurde über Secretool verwendet (Cortázar et al. 2014). Netzwerke wurden mit Cytoscape dargestellt (Shannon et al. 2003). Schematische Darstellungen von Proteinen und Genen wurden mit dem *Illustrator for Biological Sequences* (IBS) erstellt. DNA-Sequenzen wurden mit dem ApE Plasmid-Editor visualisiert. Überlebensanalysen und die entsprechenden statistischen Analysen wurden mit der Online-Applikation OASIS ausgewertet (Yang et al. 2011b).

## Literaturverzeichnis

- A. Swe, J. Li, K. Q. Zhang, S. Pointing, R. Jeewon und K. Hyde** (2011). Nematode-trapping fungi. *Curr Res Environ Appl Mycol J Fungal Biol* **1**, 1–26.
- Aalto, M. K., Ruohonen, L., Hosono, K. und Keränen, S.** (1991). Cloning and sequencing of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* SEC1 gene localized on chromosome IV. *Yeast* **7**, 643–650.
- Ahrén, D., Tholander, M., Fekete, C., Rajashekar, B., Friman, E., Johansson, T. und Tunlid, A.** (2005). Comparison of gene expression in trap cells and vegetative hyphae of the nematophagous fungus *Monacrosporium haptotylum*. *Microbiology* **151**, 789–803.
- Alper, S., McBride, S. J., Lackford, B., Freedman, J. H. und Schwartz, D. A.** (2007). Specificity and complexity of the *Caenorhabditis elegans* innate immune response. *Cell Mol Biol* **27**, 5544–5553.
- Altun, Z.F., Herndon, L.A., Wolkow, C.A., Crocker, C., Lints, R. und Hall** (2002-2021). Worm Atlas. <http://www.wormatlas.org>.
- Anders Tunlid, Hans Boerje Jansson und Birgit Nordbring-Hertz** (1992). Fungal attachment to nematodes. *Mycol Res* **96**, 401–412.
- Anderson, R. G., Deb, D., Fedkenheuer, K. und McDowell, J. M.** (2015). Recent Progress in RXLR Effector Research. *MPMI* **28**, 1063–1072.
- Andersson, K.-M., Kumar, D., Bentzer, J., Friman, E., Ahrén, D. und Tunlid, A.** (2014). Interspecific and host-related gene expression patterns in nematode-trapping fungi. *Bmc Genom* **15**, 968.
- Arioka, M., Hirata, A., Takatsuki, A. und Yamasaki, M.** (1991). Brefeldin A blocks an early stage of protein transport in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **137**, 1253–1262.
- Balla, K. M. und Troemel, E. R.** (2013). *Caenorhabditis elegans* as a model for intracellular pathogen infection. *Cell Microbiol* **15**, 1313–1322.
- Barron, G. L.** (2003). Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. *Biodiversity* **4**, 3–9.
- Bendtsen, J. D., Kiemer, L., Fausbøll, A. und Brunak, S.** (2005). Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol* **5**, 58.
- Birgit Nordbring-Hertz, Hans Börje Jansson und Anders Tunlid** (2011). Nematophagous Fungi. In *eLS*: ACS.
- Birgit Nordbring-Hertz und Margaretha Stalhammar-Carlemalm** (1978). Capture of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*, an electron microscope study. *Can J Bot* **56**, 1297–1307.
- Blaxter, M.** (2003). Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism. *Adv Parasitol* **54**, 101–195.
- Bolton, M. D., van Esse, H. P., Vossen, J. H., Jonge, R. de, Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I. J. E., van den Berg, G., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H. L., Koster, C. G. de et al.** (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol Microbiol* **69**, 119–136.
- Bork, P. und Beckmann, G.** (1993). The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* **231**, 539–545.
- Braga, F. R., Soares, F. E. F., Giuberti, T. Z., Lopes, Aline Del Carmen Garcias, Lacerda, T., Hollanda Ayupe, T. de, Queiroz, P. V., Souza Gouveia, A. de, Pinheiro, L., Araújo, A. L. et al.** (2015). Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Vet Parasitol* **212**, 214–218.
- Brefort, T., Tanaka, S., Neidig, N., Doehlemann, G., Vincon, V. und Kahmann, R.** (2014). Characterization of the largest effector gene cluster of *Ustilago maydis*. *PLoS pathog* **10**, e1003866.
- Butcher, R. A., Fujita, M., Schroeder, F. C. und Clardy, J.** (2007). Small-molecule pheromones that control dauer development in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Chem Biol* **3**, 420–422.
- Chen, S.-A., Lin, H.-C., Schroeder, F. C. und Hsueh, Y.-P.** (2021). Prey sensing and response in a nematode-trapping fungus is governed by the MAPK pheromone response pathway. *Genetics* **217**.
- Chen, T. H., Hsu, C. S., Tsai, P. J., Ho, Y. F. und Lin, N. S.** (2001). Heterotrimeric G-protein and signal transduction in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. *Planta* **212**, 858–863.

- Chen, X., Ebbole, D. J. und Wang, Z.** (2015). The exocyst complex: delivery hub for morphogenesis and pathogenesis in filamentous fungi. *Curr Opin Plant Biol* **28**, 48–54.
- Choe, A., Chuman, T., Reuss, S. H. von, Dossey, A. T., Yim, J. J., Ajredini, R., Kolawa, A. A., Kaplan, F., Alborn, H. T., Teal, P. E. A. et al.** (2012a). Sex-specific mating pheromones in the nematode *Panagrellus redivivus*. *Proc Natl Acad Sci* **109**, 20949–20954.
- Choe, A., Reuss, S. H. von, Kogan, D., Gasser, R. B., Platzer, E. G., Schroeder, F. C. und Sternberg, P. W.** (2012b). Ascaroside signaling is widely conserved among nematodes. *Curr Biol* **22**, 772–780.
- Clara Taffoni und Nathalie Pujol** (2015). Mechanisms of innate immunity in *C. elegans* epidermis. *Tissue Barriers* **3**, e1078432.
- Clay, K. und Kover, P. X.** (1996). The Red Queen Hypothesis and plant/pathogen interactions. *Ann Rev Phytopathol* **34**, 29–50.
- Cortázar, A. R., Aransay, A. M., Alfaro, M., Oguiza, J. A. und Lavín, J. L.** (2014). SECRETOOL: integrated secretome analysis tool for fungi. *Amino acids* **46**, 471–473.
- Couillault, C., Pujol, N., Reboul, J., Sabatier, L., Guichou, J.-F., Kohara, Y. und Ewbank, J. J.** (2004). TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nature Immunol* **5**, 488–494.
- Culetto, E. und Sattelle, D. B.** (2000). A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum* **9**, 869–877.
- Darby, C. und Falkow, S.** (2001). Mimicry of a G protein mutation by pertussis toxin expression in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Infect and Immun* **69**, 6271–6275.
- Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., Harder, W. und Nordbring-Hertz, B.** (1994). Nematophagous fungi: physiological aspects and structure-function relationships. *Adv Microb Physio*, pp. 111–143: Elsevier.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A. R., Feussner, I. et al.** (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwambach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D. und Kahmann, R.** (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- Doyle, L. M. und Wang, M. Z.** (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells* **8**.
- Dunbar, T. L., Yan, Z., Balla, K. M., Smelkinson, M. G. und Troemel, E. R.** (2012). *C. elegans* detects pathogen-induced translational inhibition to activate immune signaling. *Cell host microbe* **11**, 375–386.
- Engelmann, I. und Pujol, N.** (2010). Innate immunity in *C. elegans*. *Adv exp med biol* **708**, 105–121.
- Erickson, B.** (2010). Pesticides Bayer CropScience, EPA agree to phase out use of aldicarb: ACS Publications.
- Ermolaeva, M. A. und Schumacher, B.** (2014a). Insights from the worm: the *C. elegans* model for innate immunity. *Semin Immunol* **26**, 303–309.
- Evans und Thomas C.** (2006). Transformation and microinjection. 1551-8507: WormBook. <http://www.wormbook.org>.
- Ewbank, J. J. und Pujol, N.** (2016). Local and long-range activation of innate immunity by infection and damage in *C. elegans*. *Curr Opin in Immunol* **38**, 1–7.
- Ewbank, J. J. und Zugasti, O.** (2011). *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Dis model mech* **4**, 300–304.
- Fares, H. und Greenwald, I.** (2001). Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics* **159**, 133–145.
- Fekete, C., Tholander, M., Rajashekar, B., Ahrén, D., Friman, E., Johansson, T. und Tunlid, A.** (2008). Paralysis of nematodes: shifts in the transcriptome of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium haptotylum* during infection of *Caenorhabditis elegans*. *Environ Microbiol* **10**, 364–375.
- Finger, F. P., Hughes, T. E. und Novick, P.** (1998). Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* **92**, 559–571.

- Gallotta, I., Sandhu, A., Peters, M., Haslbeck, M., Jung, R., Agilkaya, S., Bliersch, J. L., Rödelsperger, C., Röseler, W., Huang, C. et al. (2020). Extracellular proteostasis prevents aggregation during pathogenic attack. *Nature* **584**, 410–414.
- Gierasch, L. M. (1989). Signal sequences. *Biochem* **28**, 923–930.
- Giraldo, M. C., Dagdas, Y. F., Gupta, Y. K., Mentlak, T. A., Yi, M., Martinez-Rocha, A. L., Saitoh, H., Terauchi, R., Talbot, N. J. und Valent, B. (2013). Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nat Commun* **4**, 1996.
- Giraldo, M. C. und Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat rev. Microbiol* **11**, 800–814.
- Gupta, Y. K., Dagdas, Y. F., Martinez-Rocha, A.-L., Kershaw, M. J., Littlejohn, G. R., Ryder, L. S., Sklenar, J., Menke, F. und Talbot, N. J. (2015). Septin-dependent assembly of the exocyst is essential for plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* **27**, 3277–3289.
- Hahn, M. und Scalliet, G. (2021). One cut to change them all: CRISPR/Cas, a groundbreaking tool for genome editing in *Botrytis cinerea* and other fungal plant pathogens. *Phytopathology* **111**, 474–477.
- Hazuka, C. D., Hsu, S. C. und Scheller, R. H. (1997). Characterization of a cDNA encoding a subunit of the rat brain rsec6/8 complex. *Gene* **187**, 67–73.
- Heijne, G. von (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Euro J Biochem* **133**, 17–21.
- Heijne, G. von (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* **184**, 99–105.
- Heijne, G. von (1990). The signal peptide. *Journal Membr Biol* **115**, 195–201.
- Herman, Robert K./Yochem und John (2005). Genetic mosaics. 1551-8507: WormBook. <http://www.wormbook.org>.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. und Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* **35**, W585-W587.
- Hsu, S. C., Ting, A. E., Hazuka, C. D., Davanger, S., Kenny, J. W., Kee, Y. und Scheller, R. H. (1996). The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron* **17**, 1209–1219.
- Hsueh, Y. P., Gronquist, M. R., Schwarz, E. M., Nath, R. D., Lee, C. H., Gharib, S., Schroeder, F. C. und Sternberg, P. W. (2017). Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. *eLife* **6**.
- Hsueh, Y. P., Mahanti, P., Schroeder, F. C. und Sternberg, P. W. (2013). Nematode-trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones. *Curr Biol* **23**, 83–86.
- Huang, T.-Y., Lee, Y.-Y., Ulzurrun, G. V.-D. und Hsueh, Y.-P. (2020). Forward genetic screens identified mutants with defects in trap morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *G3* **11**, 2
- Ioannis Stergiopoulos und Pierre de Wit (2009). Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 233–263.
- J. Bell (1989). The polymerase chain reaction. *Immunol Today* **10**, 351–355.
- J. Bridge (1996). Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 201–225.
- Jansson, H. und Poinar JR, G. O. (1986). Some possible fossil nematophagous fungi. *Trans Br Mycol Soc* **87**, 471–474.
- JebaMercy, G. und Balamurugan, K. (2012). Effects of sequential infections of *Caenorhabditis elegans* with *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*. *Microbiol and Immunol* **56**, 825–835.
- Jennifer Menzner (2020). Etablierung eines optogenetischen Systems in *C. elegans* und Untersuchung eines Virulenzfaktors in *D. flagrans*. Masterarbeit, KIT. Karlsruhe.
- Jeong, P.-Y., Jung, M., Yim, Y.-H., Kim, H., Park, M., Hong, E., Lee, W., Kim, Y. H., Kim, K. und Paik, Y.-K. (2005). Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. *Nature* **433**, 541–545.
- Joop, G. und Vilcinskis, A. (2016). Coevolution of parasitic fungi and insect hosts. *Zoology (Jena, Germany)* **119**, 350–358.
- José Ángel Hernández, Fabián Leonardo Arroyo, José Suárez, Cristiana Filipa Cazapal-Monteiro, Ángel Romasanta, María Eugenia López-Arellano, José Pedreira, Luis Manuel Madeira de Carvalho, Rita Sánchez-Andrade, María Sol Arias et al. (2016). Feeding horses with industrially



- manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. *Vet Parasitol* **229**, 37–44.
- K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263–273.
- Kaplan, F., Srinivasan, J., Mahanti, P., Ajredini, R., Durak, O., Nimalendran, R., Sternberg, P. W., Teal, P. E. A., Schroeder, F. C., Edison, A. S. et al.** (2011). Ascarioside expression in *Caenorhabditis elegans* is strongly dependent on diet and developmental stage. *PLoS One* **6**, 1–7.
- Karin Kiontke und David H.A. Fitch** (2013). Nematodes. *Curr Biol* **23**, R862 - R864.
- Ke Qin Zhang und Kevin D. Hyde** (2014). *Nematode-trapping fungi*: Springer Netherlands.
- Kee, Y., Yoo, J. S., Hazuka, C. D., Peterson, K. E., Hsu, S. C. und Scheller, R. H.** (1997). Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 14438–14443.
- Kenneth R. Barker und Stephen R. Koenning** (1998). Developing sustainable systems for nematode management. *Annu Rev Phytopathol* **36**, 165–205.
- Kim, D.** (2008). Studying host-pathogen interactions and innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Dis Model Mech* **1**, 205–208.
- Kim, D. H., Feinbaum, R., Alloing, G., Emerson, F. E., Garsin, D. A., Inoue, H., Tanaka-Hino, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., Tan, M.-W. et al.** (2002). A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* **297**, 623–626.
- Kim, K.-T., Jeon, J., Choi, J., Cheong, K., Song, H., Choi, G., Kang, S. und Lee, Y.-H.** (2016). Kingdom-wide analysis of fungal small secreted proteins (SSPs) reveals their potential role in host association. *Front Plant Sci* **7**, 186.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L. J., Takahara, H., Neumann, U., Ver Loren Themaat, E., Ver Themaat, E. L., van der Does, H. C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I. et al.** (2012). Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS pathog* **8**, e1002643.
- Koepke, J., Kaffarnik, F., Haag, C., Zarnack, K., Luscombe, N. M., König, J., Ule, J., Kellner, R., Begerow, D. und Feldbrügge, M.** (2011). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *MCP* **10**, M111.011213.
- Kojima, E. und Saikawa, M.** (2002). Time-lapse photomicrography and electron microscopy on initiation of infection of nematodes by *Dactylella ellipsospora*. *Mycoscience* **43**, 299–305.
- Kuo, C.-Y., Chen, S.-A. und Hsueh, Y.-P.** (2020). The High Osmolarity Glycerol (HOG) Pathway Functions in Osmosensing, Trap Morphogenesis and Conidiation of the Nematode-Trapping Fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J Fungi (Basel, Switzerland)* **6**.
- Kurz, C. L., Chauvet, S., Andrès, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G. P. F., Uh, M., Celli, J., Filloux, A., Bentzmann, S. de et al.** (2003). Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *EMBO* **22**, 1451–1460.
- Kurz, C. L. und Tan, M.-W.** (2004). Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* **3**, 185–193.
- Kwon, M. J., Arentshorst, M., Fiedler, M., Groen, F. L. M. de, Punt, P. J., Meyer, V. und Ram, A. F. J.** (2014). Molecular genetic analysis of vesicular transport in *Aspergillus niger* reveals partial conservation of the molecular mechanism of exocytosis in fungi. *Microbiology (Reading, England)* **160**, 316–329.
- Kaempfe, L.** (1997). The nematode-destroying fungi. *Z Allg Mikrobiol* **19**, 309.
- Labrousse, A., Chauvet, S., Couillault, C., Kurz, C. L. und Ewbank, J. J.** (2000). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr Biol* **10**, 1543–1545.
- Lanver, D., Tollot, M., Schweizer, G., Lo Presti, L., Reissmann, S., Ma, L.-S., Schuster, M., Tanaka, S., Liang, L., Ludwig, N. et al.** (2017). *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nat Rev Microbiol* **15**, 409–421.
- Lawton, J. R.** (1957). The formation of constricting rings in nematode-catching hyphomycetes grown in pure culture. *J Exp Bot* **8**, 50–54.
- Lawton, J. R.** (1967). The formation and closure of the constricting rings in two nematode-catching hyphomycetes. *Trans Brit* **50**, 195-IN2.

- Lee, C.-H., Chang, H.-W., Yang, C.-T., Wali, N., Shie, J.-J. und Hsueh, Y.-P.** (2020). Sensory cilia as the Achilles heel of nematodes when attacked by carnivorous mushrooms. *Proc Natl Acad Sci* **117**, 6014–6022.
- Lee, S.-H., Omi, S., Thakur, N., Taffoni, C., Belougne, J., Engelmann, I., Ewbank, J. J. und Pujol, N.** (2018). Modulatory upregulation of an insulin peptide gene by different pathogens in *C. elegans*. *Virulence* **9**, 648–658.
- Li, J., Xu, H., Bentley, W. E. und Rao, G.** (2002). Impediments to secretion of green fluorescent protein and its fusion from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog* **18**, 831–838.
- Li, J., Zou, C., Xu, J., Ji, X., Niu, X., Yang, J., Huang, X. und Zhang, K.-Q.** (2015). Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann Rev Phytopathol* **53**, 67–95.
- Li, X., Kang, Y. Q., Luo, Y. L., Zhang, K. Q., Zou, C. G. und Liang, L. M.** (2017). The NADPH oxidase AoNoxA in *Arthrobotrys oligospora* functions as an initial factor in the infection of *Caenorhabditis elegans*. *J Microbiol* **55**, 885–891.
- Lin, K., Limpens, E., Zhang, Z., Ivanov, S., Saunders, D. G. O., Mu, D., Pang, E., Cao, H., Cha, H., Lin, T. et al.** (2014). Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLoS Genet* **10**, 1–13.
- Liu, L., Le Xu, Jia, Q., Pan, R., Oelmüller, R., Zhang, W. und Wu, C.** (2019). Arms race: diverse effector proteins with conserved motifs. *Plant Signal Behav* **14**, 1557008.
- Liu, X., Xiang, M. und Che, Y.** (2009). The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience* **50**, 20–25.
- Lo Presti, L., Zechmann, B., Kumlehn, J., Liang, L., Lanver, D., Tanaka, S., Bock, R. und Kahmann, R.** (2017). An assay for entry of secreted fungal effectors into plant cells. *New Phytol* **213**, 956–964.
- Loh, Y. P., Kim, T., Rodriguez, Y. M. und Cawley, N. X.** (2004). Secretory granule biogenesis and neuropeptide sorting to the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells. *J Mol Neurosci: MN* **22**, 63–71.
- Lonsdale, A., Davis, M. J., Doblin, M. S. und Bacic, A.** (2016). Better Than Nothing? Limitations of the Prediction Tool SecretomeP in the Search for Leaderless Secretory Proteins (LSPs) in Plants. *Front Plant Sci* **7**, 1451.
- Lu, S. und Edwards, M.** (2016). Genome-wide analysis of small secreted cysteine-rich proteins identifies candidate effector proteins potentially involved in *Fusarium graminearum*-wheat interactions. *Phytopathol* **106**, 166–176.
- Ludwig, N., Reissmann, S., Schipper, K., Gonzalez, C., Assmann, D., Glatter, T., Moretti, M., Ma, L.-S., Rexer, K.-H., Snetselaar, K. et al.** (2021). A cell surface-exposed protein complex with an essential virulence function in *Ustilago maydis*. *Nat microbiol*.
- M. Eysker, N. Bakker, F.N.J. Kooyman, S. Olde Olthuis und H.W. Ploeger** (2006). Effect of biological control through the daily application of spores of *Duddingtonia flagrans* in lambs kept under an evasive grazing system in the Netherlands. *Vet Parasitol* **140**, 312–320.
- Ma, Y., Yang, X., Xie, M., Zhang, G., Le Yang, Bai, N., Zhao, Y., Li, D., Zhang, K.-Q. and Yang, J.** (2020). The Arf-GAP AoGlo3 regulates conidiation, endocytosis, and pathogenicity in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Fungal Genet Biol* **138**, 103352.
- Mankau, R.** (1980). Biocontrol: fungi as nematode control agents. *J Nematol* **12**, 244–252.
- McGowan, J. and Fitzpatrick, D. A.** (2017). Genomic, Network, and Phylogenetic Analysis of the Oomycete Effector Arsenal. *mSphere* **2**.
- Meerupati, T., Andersson, K.-M., Friman, E., Kumar, D., Tunlid, A. und Ahrén, D.** (2013). Genomic mechanisms accounting for the adaptation to parasitism in nematode-trapping fungi. *PLoS Genet* **9**, 1–20.
- Meerupati Tejashwari, Andersson Karl Magnus, Friman Eva, Kumar Dharmendra, Tunlid Anders und Ahrén Dag** (2013). Genomic mechanisms accounting for the adaptation to parasitism in nematode-trapping fungi. *PLoS Genet* **9**, e1003909.
- Molento, M., Buzatti, A. und Kan Sprenger, L.** (2016). Pasture larval count as a supporting method for parasite epidemiology, population dynamic and control in ruminants. *Livest Sci* **192**, 48–54.
- Morgan, W. und Kamoun, S.** (2007). RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Curr Opin Microbiol* **10**, 332–338.

- Mueller, A. N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D. und Doehlemann, G.** (2013). Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS pathog* **9**, e1003177.
- Mukhi, N., Gorenkin, D. und Banfield, M. J.** (2020). Exploring folds, evolution and host interactions: understanding effector structure/function in disease and immunity. *New Phytol* **227**, 326–333.
- Muller, H. G.** (1958). The constricting ring mechanism of two predacious hyphomycetes. *Trans Br Mycol Soc* **41**, 341–364.
- Nakai, J., Ohkura, M. und Imoto, K.** (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **19**, 137–141.
- Nielsen, H.** (2017). Predicting secretory proteins with SignalP. In *Protein Function Prediction: Methods and Protocols*, pp. 59–73. New York, NY: Springer New York.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und Heijne, G. von** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering* **10**, 1–6.
- Niu, X.-M. und Zhang, K.-Q.** (2011). *Arthrobotrys oligospora* : a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology* **2**, 59–78.
- Nordbring-Hertz, B.** (1973). Peptide-induced morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Physiol Plant* **29**, 223–233.
- Oliveira, D. L., Rizzo, J., Joffe, L. S., Godinho, R. M. C. und Rodrigues, M. L.** (2013). Where do they come from and where do they go: candidates for regulating extracellular vesicle formation in fungi. *Int J Mol Sci* **14**, 9581–9603.
- O'Rourke, D., Baban, D., Demidova, M., Mott, R. und Hodgkin, J.** (2006). Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. *Genome Res* **16**, 1005–1016.
- P Jatala** (1986). Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu Rev Phytopathol* **24**, 453–489.
- Panstruga, R. und Dodds, P. N.** (2009). Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* **324**, 748–750.
- Pantazopoulou, A.** (2016). The Golgi apparatus: insights from filamentous fungi. *Mycologia* **108**, 603–622.
- Park, J. J. und Loh, Y. P.** (2008). How peptide hormone vesicles are transported to the secretion site for exocytosis. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **22**, 2583–2595.
- Park, J.-K. und Park, S.-K.** (2017). Coelomocytes are required for lifespan extension via different methods of dietary restriction in *C. elegans*. *Toxicol Environ Health Sci* **9**, 59–63.
- Park, S.-K., Link, C. D. und Johnson, T. E.** (2010). Life-span extension by dietary restriction is mediated by NLP-7 signaling and coelomocyte endocytosis in *C. elegans*. *FASEB J* **24**, 383–392.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. und Jackson, C. L.** (1999). Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF–GDP–Sec7 domain protein complex. *Mol Cell* **3**, 275–285.
- Pramer, D.** (1964). Nematode-trapping fungi. *Science* **144**, 382–388.
- Pramer, D. und Stoll, N. R.** (1959). Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. *Science* **129**, 966–967.
- Pujol, N., Davis, P. A. und Ewbank, J. J.** (2012). The origin and function of anti-fungal peptides in *C. elegans*: open questions. *Front Immunol* **3**, 237.
- Pujol, N., Link, E. M., Liu, L. X., Kurz, C. L., Alloing, G., Tan, M. W., Ray, K. P., Solari, R., Johnson, C. D. und Ewbank, J. J.** (2001). A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **11**, 809–821.
- Rajamuthiah, R. und Mylonakis, E.** (2014). Effector triggered immunity. *Virulence* **5**, 697–702.
- Rapoport, T. A.** (1992). Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* **258**, 931–936.
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J. M., Sánchez-León, E., Verdín-Ramos, J. A., Beltrán-Aguilar, A. und Freitag, M.** (2007). Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **6**, 1853–1864.
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C. und Casadevall, A.** (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* **7**, 58–67.

- Rodrigues, M. L., Nosanchuk, J. D., Schrank, A., Vainstein, M. H., Casadevall, A. und Nimrichter, L.** (2011). Vesicular transport systems in fungi. *Future Microbiol* **6**, 1371–1381.
- Rothman, J. E.** (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55–63.
- Rothman, J. E. und Wieland, F. T.** (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227–234.
- Sato, Ken//Norris, Anne//Sato, Miyuki//Grant und Barth D.** (2014). *C. elegans* as a model for membrane traffic. 1551-8507: WormBook. <http://www.wormbook.org>.
- Schmidt, A. R., Dörfelt, H. und Perrichot, V.** (2007). Carnivorous fungi from Cretaceous amber. *Science* **318**, 1743.
- Schneiter, R. und Di Pietro, A.** (2013). The CAP protein superfamily: function in sterol export and fungal virulence. *Biomol Concepts* **4**, 519–525.
- Schulenburg, H. und Ewbank, J. J.** (2007). The genetics of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Mol microbiol* **66**, 563–570.
- Schulte, R. D., Makus, C., Hasert, B., Michiels, N. K. und Schulenburg, H.** (2010). Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. *Proc Natl Acad Sci* **107**, 7359–7364.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. und Ideker, T.** (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* **13**, 2498–2504.
- Shapira, M., Hamlin, B. J., Rong, J., Chen, K., Ronen, M. und Tan, M.-W.** (2006). A conserved role for a GATA transcription factor in regulating epithelial innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 14086–14091.
- Shaye, D. D. und Greenwald, I.** (2011). OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One* **6**, e20085.
- Shivers, R. P., Youngman, M. J. und Kim, D. H.** (2008). Transcriptional responses to pathogens in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Microbiol* **11**, 251–256.
- Shoji, J., Kikuma, T. und Kitamoto, K.** (2014). Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. *Curr Opin Microbiol* **20**, 1–9.
- Siddiqui, Z. und Mahmood, I.** (1996). Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. *Bioresour Technol* **58**, 229–239.
- Singh, V. und Aballay, A.** (2009). Regulation of DAF-16-mediated innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *JBC* **284**, 35580–35587.
- Soder, K. J. und La Holden** (2005). Use of nematode-trapping fungi as a biological control in grazing livestock. *PAS* **21**, 30–37.
- Sonah, H., Deshmukh, R. K. und Bélanger, R. R.** (2016). Computational prediction of effector proteins in fungi: opportunities and challenges. *Front Plant Sci* **7**, 126.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Singh, K. B. und Taylor, J. M.** (2015). Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLOS Pathog* **11**, e1004806.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B. und Taylor, J. M.** (2018). Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Mol Plant Pathol* **19**, 2094–2110.
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Dodds, P. N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K. B., Manners, J. M. und Taylor, J. M.** (2016). EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol* **210**, 743–761.
- Stam, R., Jupe, J., Howden, A. J. M., Morris, J. A., Boevink, P. C., Hedley, P. E. und Huitema, E.** (2013). Identification and characterisation CRN effectors in *Phytophthora capsici* shows modularity and functional diversity. *PLoS One* **8**, 1–13.
- Stiernagle und Theresa** (2006). Maintenance of *C. elegans*. 1551-8507: WormBook. <http://www.wormbook.org>.
- Stuart, L. M., Paquette, N. und Boyer, L.** (2013). Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens. *Nat Rev Immunol* **13**, 199–206.
- Tanaka, S., Gollin, I., Rössel, N. und Kahmann, R.** (2020). The functionally conserved effector Sta1 is a fungal cell wall protein required for virulence in *Ustilago maydis*. *New Phytol* **227**, 185–199.

- TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D. und Novick, P.** (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO* **15**, 6483–6494.
- Thrupp, L. A.** (1991). Sterilization of workers from pesticide exposure: the causes and consequences of DBCP-induced damage in Costa Rica and beyond. *Int J Health Serv* **21**, 731–757.
- Tunlid, A. und Jansson, S.** (1991). Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2868–2872.
- Tunlid, A., Johansson, T. und Nordbring-Hertz, B.** (1991). Surface polymers of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology* **137**, 1231–1240.
- Twumasi-Boateng, K. und Shapira, M.** (2012). Dissociation of immune responses from pathogen colonization supports pattern recognition in *C. elegans*. *PLoS One* **7**.
- van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H. A. J., Vervoort, J. und Wit, P. J. G. M. de** (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *MPMI* **19**, 1420–1430.
- van Megen, H., van den Elsen, S., Holterman, M., Karszen, G., Mooyman, P., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J. und Helder, J.** (2009). A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* **11**, 927–950.
- Van Valen** (1973). *A new evolutionary law*.
- Veenhuis, M., Harder, W. und Nordbring-Hertz, B.** (1989). Occurrence and metabolic significance of microbodies in trophic hyphae of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Antonie van Leeuwenhoek* **56**, 241–249.
- Veenhuis, M., Nordbring-Hertz, B. und Harder, W.** (1985a). An electron-microscopical analysis of capture and initial stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. *Antonie van Leeuwenhoek* **51**, 385–398.
- Veenhuis, M., Nordbring-Hertz, B. und Harder, W.** (1985b). Development of fate of electron-dense microbodies in trap cells of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Antonie van Leeuwenhoek* **51**, 399–407.
- Wagner, S., Grin, I., Malmshaimer, S., Singh, N., Torres-Vargas, C. E. und Westerhausen, S.** (2018). Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiol Lett* **365**.
- Wang, D., Tian, L., Zhang, D.-D., Song, J., Song, S.-S., Yin, C.-M., Zhou, L., Liu, Y., Wang, B.-L., Kong, Z.-Q. et al.** (2020). Functional analyses of small secreted cysteine-rich proteins identified candidate effectors in *Verticillium dahliae*. *Mol Plant Pathol* **21**, 667–685.
- Wang, R., Wang, J. und Yang, X.** (2015). The extracellular bioactive substances of *Arthrobotrys oligospora* during the nematode-trapping process. *Biol Control* **86**, 60–65.
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S. et al.** (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**, 115–118.
- William C. Sharpee und Ralph A. Dean** (2016). Form and function of fungal and oomycete effectors. *Fungal Biol Rev* **30**, 62–73.
- Xie, M., Bai, N., Yang, J., Jiang, K., Zhou, D., Zhao, Y., Li, D., Niu, X., Zhang, K.-Q. und Yang, J.** (2019). Protein kinase Ime2 is required for mycelial growth, conidiation, osmoregulation, and pathogenicity in nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Front Microbiol* **10**, 3065.
- Yang, C.-T., Vidal-Diez de Ulzurrun, G., Gonçalves, A. P., Lin, H.-C., Chang, C.-W., Huang, T.-Y., Chen, S.-A., Lai, C.-K., Tsai, I. J., Schroeder, F. C. et al.** (2020). Natural diversity in the predatory behavior facilitates the establishment of a robust model strain for nematode-trapping fungi. *Proc Natl Acad Sci* **117**, 6762–6770.
- Yang, J., Wang, L., Ji, X., Feng, Y., Li, X., Zou, C., Xu, J., Ren, Y., Mi, Q., Wu, J. et al.** (2011a). Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PLoS Pathog* **7**, 1–12.
- Yang, J.-S., Nam, H.-J., Seo, M., Han, S. K., Choi, Y., Nam, H. G., Lee, S.-J. und Kim, S.** (2011b). OASIS: online application for the survival analysis of lifespan assays performed in aging research. *PLoS One* **6**, e23525.

- Yang, Y., Yang, E., An, Z. und Liu, X.** (2007). Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the *Orbiliaceae* based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *Proc Natl Acad Sci* **104**, 8379–8384.
- Yi, M. und Valent, B.** (2013). Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. *Ann Rev Phytopathol* **51**, 587–611.
- Youssar, L., Wernet, V., Hensel, N., Yu, X., Hildebrand, H.-G., Schreckenberger, B., Kriegler, M., Hetzer, B., Frankino, P., Dillin, A. et al.** (2019). Intercellular communication is required for trap formation in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *PLoS Genetics* **15**, e1008029.
- Zeng, R., Gao, S., Xu, L., Liu, X. und Dai, F.** (2018). Prediction of pathogenesis-related secreted proteins from *Stemphylium lycopersici*. *BMC Microbiol* **18**, 191.
- Zhang, G., Zheng, Y., Ma, Y., Le Yang, Xie, M., Zhou, D., Niu, X., Zhang, K.-Q. und Yang, J.** (2019). The velvet proteins VosA and VelB play different roles in conidiation, trap formation, and pathogenicity in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Front Microbiol* **10**, 1917.
- Zhang, X., Harding, B., Aggad, D., Courtine, D., Chen, J.-X., Pujol, N. und Ewbank, J. J.** (2020). *Antagonistic fungal enterotoxins intersect at multiple levels with host innate immune defences*. bioRxiv.
- Zhang, Y., Lu, H. und Bargmann, C. I.** (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **438**, 179.
- Zugasti, O., Bose, N., Squiban, B., Belougne, J., Kurz, C. L., Schroeder, F. C., Pujol, N. und Ewbank, J. J.** (2014). Activation of a G protein-coupled receptor by its endogenous ligand triggers the innate immune response of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Immunol* **15**, 833–838.
- Zugasti, O., Thakur, N., Belougne, J., Squiban, B., Kurz, C. L., Soulé, J., Omi, S., Tichit, L., Pujol, N. und Ewbank, J. J.** (2016). A quantitative genome-wide RNAi screen in *C. elegans* for antifungal innate immunity genes. *BMC Biol* **14**, 35.

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Professor Reinhard Fischer bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem Thema zu arbeiten. Er war immer für Ideen offen und hat mich bei vielem unterstützt.

Außerdem möchte ich mich bei Professor Dr. Jörg Kämper für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Danke an das Kämper und Requena Labor für den Austausch und die Unterstützung.

Ein Dankeschön geht auch an das Tursun-Labor in Berlin und das Dillin-Lab in Kalifornien, die uns bei so vielen Fragen rund um die Würmer geholfen haben.

Vielen, vielen Dank an Elke, die nach unserer Exkursion nach Berlin zur Injektions-Expertin wurde und sicherlich 100000 Würmer für mich injiziert hat. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft!

Auch ein gigantisches Dankeschön an Süheyla, Michel und Linda und Luis die mich super unterstützt haben. Vor allem Süheyla, für die Hilfe im letzten Jahr.

10000 Dank an die ganze Wurm-Gruppe! Ich bin unglaublich dankbar, Teil eines so tollen Teams zu sein. Der Austausch und die Diskussionen mit euch über Ergebnisse und Ideen waren immer sehr hilfreich. Besonderen Dank an Jenni, Valentin, Maria, Theresa und Marius! Mit euch waren nicht nur wissenschaftliche Diskussionen immer interessant und lehrreich. Jenni, schön mit dir im Wurmlab gelandet zu sein, zusammen bleiben wir fit und wohl hydriert.

Danke schön an das ganze Fischer-Labor für eine tolle Arbeitsatmosphäre und den Austausch.

Ein riesiges Dankeschön an Dr. Jenny, von der ich am Anfang super viel gelernt habe und die immer ein offenes Ohr für alle Fragen hatte.

Danke an alle Studenten, die ich im Laufe dieser Arbeit betreut habe. Es hat Spaß gemacht und war auch für mich lehrreich Projekte mit euch umzusetzen.

Nochmal ein Extra-Danke an Jenni, Theresa, Katrin und Dr. Jenny für die Korrekturen.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Danke an meine Eltern, die mir das hier überhaupt ermöglicht haben und mich immer bei allem unterstützt haben. Danke an meine Oma, die immer ein weises Sprichwort auf Lager hatte. Danke an meinen Bruder, Charly, Clara und Max, ihr seid die Beste Ablenkung und bringt mich immer zum Lachen.

Das aller, aller größte Dankeschön an Valentin. Wir sind einfach das Beste Team. Ich bin gespannt wo die Reise als nächstes hingeht.