



Untersuchung des putativen Virulenzfaktors NipA des
Nematoden-fangenden Pilzes *Arthrobotrys flagrans* im Wirt
Caenorhabditis elegans

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

M.Sc. Jennifer Emser

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

2. Referentin: Prof. Dr. Sylvia Erhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2023

Je mehr ich weiß, desto mehr weiß ich, dass ich nichts weiß.
-Albert Einstein

Eidesstattliche Erklärung

Die Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation wurden von 2020 bis 2023 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 selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entstammten, 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 Angabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. 1 § 3 der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie beim Institut gesichert.

Karlsruhe, den

Jennifer Emser

Publikationsliste

Emser, J., Kriegler, M., Klemke, A.-L. und Fischer, R., 2022 Räuberische Pilze mit Potenzial zur Schädlingsbekämpfung: Nicht ganz so friedlich. *Biologie in unserer Zeit* 53: 32-39.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
1 Einleitung	1
1.1 Nematoden.....	1
1.2 <i>C. elegans</i> als Modellorganismus	2
1.3 Die Epidermis und ihre Rolle in der angeborenen Immunabwehr von <i>C. elegans</i>	4
1.4 Die Kutikula von <i>C. elegans</i>	7
1.5 Nematoden-fangende Pilze (NFP)	11
1.6 Lebenszyklus und Fallenbildung	13
1.7 Interspezieskommunikation	14
1.8 Virulenzfaktoren	15
1.9 Das Nematoden-induzierte Protein A (NipA)	18
2 Ergebnisse	21
2.1 Erweiterte bioinformatische Analyse von NipA	21
2.2 NipA wird sekretiert und während der Infektion hochreguliert	22
2.3 NipA lokalisiert an der Infektionsstelle	26
2.4 Deletion von <i>nipA</i> führt zu einer verzögerten Penetration.....	29
2.5 Heterolog exprimiertes <i>nipA</i> in <i>C. elegans</i> führt zur Akkumulation in den Coelomocyten ..	31
2.6 Epidermal exprimiertes NipA führt zu Blasenbildung in adulten Nematoden.....	35
2.7 NipA stört die Integrität der Kutikula	39
2.8 Cystein 1 wird für die NipA induzierte Blasenbildung in Nematoden benötigt	42
2.9 RNAseq Analysen NipA exprimierender Nematoden zeigen regulatorische Veränderungen in ECM- und Stressreaktionsgenen	43
2.10 Untersuchung des genetischen Kontextes von <i>nipA</i>	49
2.10.1 Bioinformatische Analyse der <i>nipA</i> umgebenden Gene.....	49
2.10.2 Bioinformatische Analyse und Untersuchung der Expression von <i>dfj_005408</i>	51
2.10.3 TrsA lokalisiert in Infektionsstrukturen	52
2.10.4 Deletion von <i>trsA</i> und Doppeldeletion mit <i>nipA</i>	54
3 Diskussion	59
3.1 Sekretionsmechanismen verschiedener Virulenzfaktoren in <i>A. flagrans</i>	60
3.2 Die heterologe Expression von <i>nipA</i> in <i>C. elegans</i> gibt Hinweise auf dessen Funktion während der Infektion.....	63
3.3 NipA besitzt Ähnlichkeiten zu EGF-Domänen enthaltenden Proteinen.....	65
3.4 TrsA ist ein neuer putativer Virulenzfaktor	68
3.5 Fazit und Modell.....	69
4 Material und Methoden	72

4.1	Verwendete Organismen, Vektoren und Materialien.....	72
4.2	Verwendete Geräte und Chemikalien	78
4.3	Molekularbiologische Methoden	79
4.4	Mikrobiologische Methoden	88
	Literatur	96

Zusammenfassung

Die Untersuchung von Wirt-Pathogen Interaktionen hilft dabei evolutionäre Entwicklungsschritte zu verstehen und die Mechanismen hinter Krankheitsbildern zu entschlüsseln, um so neue Behandlungsansätze zu schaffen. Der Nematode *Caenorhabditis elegans* ist dafür ein ausgezeichneter Modellorganismus. An ihm wurden schon viele Studien zur Interaktion mit pathogenen Bakterien ausgeführt, die zu neuen Erkenntnissen im Menschen geführt haben. Während bereits viel über die Bakterien-Nematoden Beziehung bekannt ist, ist die Interaktion mit Nematoden-fangenden Pilzen (NFP) noch weitestgehend unerforscht. Nematoden-fangende Pilze und ihre Beute haben eine seit Millionen von Jahren andauernde gemeinsame Evolutionsgeschichte, welche geprägt ist von gegenseitigen Adaptionen der jeweiligen Angriffs- und Verteidigungsmechanismen. Während *C. elegans* ausschließlich auf sein angeborenes Immunsystem und erlerntes Vermeidungsverhalten zurückgreifen kann, haben NFP, neben einer Vielzahl an verschiedenen Fangstrategien, auch ein großes Arsenal verschiedener virulenter Proteine wie *small secreted protein* (SSPs) oder anderen Effektoren, auf das sie zurückgreifen können, um die Abwehrmechanismen des Nematoden zu neutralisieren und zu überwinden.

In dieser Arbeit wurde das kleine sekretierte Protein NipA (*nematode induced protein A*) aus dem NFP *Arthrobotrys flagrans* weiter analysiert und sein Einfluss als Effektorprotein auf den Nematoden *C. elegans* untersucht. Bioinformatische Analysen ergaben eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von NipA zu EGF-Domänen enthaltenden Proteinen. Die Überprüfung der fallenspezifischen Expression wurde mittels eines Promotor-Reporter-Assays in einem Stamm mit interner Kontrolle durchgeführt und bestätigt. Um den Sekretionsmechanismus von *A. flagrans* Virulenzfaktoren genauer zu untersuchen, wurde die Notwendigkeit des Signalpeptids für die Sekretion von NipA anhand eines Laccase-Reporter-Assays untersucht und konnte ebenfalls bestätigt werden. Weitere Untersuchungen des Signalpeptids zeigten, dass dieses für die spezifische Lokalisation in den Fallen notwendig ist. Die Lokalisation des NipA-Proteins während der Infektion zeigte eine spezifische Translokation von den Innenseiten leerer Fallen zu der später entstehenden Infektionsstelle. Die Ko-Lokalisationsstudie mit dem t-SNARE SsoA zeigte keine spezifische Beteiligung dessen an der Sekretion von NipA. In einem Penetrationsassay wurde gezeigt, dass die *nipA*-Deletionsmutante länger zum

Einwachsen in den Nematoden benötigt als der Wildtyp, was auf eine Rolle in den frühen Stadien der Interaktion schließen lässt. Um Rückschlüsse auf die Funktion von NipA in *C. elegans* ziehen zu können, wurde das Gen heterolog in den Nematoden exprimiert. Die heterologe Expression von *nipA* in der Epidermis der Nematoden führte zu einem Blasenphänotyp, während die konstitutive Expression in Larven zu Körperdeformationen führte. Transkriptionelle Untersuchungen der *nipA* exprimierenden Nematoden zeigten eine negative Regulation von Kollagenen und C-typ Lektinen, während Gene für die Entgiftung und für die Pathogenabwehr hochreguliert wurden. Die Überprüfung des genomischen Kontextes von *nipA* enthüllte den potenziellen Virulenzfaktor-Kandidaten TrsA. Die Expression von *trsA* ist während der Infektion hochreguliert. Die Aminosäuresequenz von TrsA beinhaltet eine Egh-16 Virulenzfaktor ähnliche Domäne und das Protein lokalisiert während der Infektion in der Nähe der Infektionsstelle. Die Ko-Lokalisation mit NipA zeigte jedoch eine andere Verteilung an der Penetrationsstelle.

Im Laufe dieser Arbeit wurde der Virulenzfaktor NipA genauer charakterisiert, welcher für die vollständige Virulenz des Pilzes benötigt wird. Es wurde die Hypothese gefestigt, dass NipA eine Rolle während der Penetration von Nematoden durch *A. flagrans* spielt. Durch heterologe Expressionen im Wirt konnte das Zielgewebe auf die Kutikula begrenzt werden. Außerdem konnten neue immunologische Aspekte spezifisch auf die Reaktion auf NipA aus Transkriptionsanalysen erlangt werden. Die Entdeckung eines weiteren Virulenzfaktors mit ähnlicher räumlicher und zeitlicher Expression sowie Lokalisation zeigt, dass ein feines Zusammenspiel mehrerer Effektoren zur Pathogenität von *A. flagrans* beiträgt. Diese Arbeit gibt einen ersten Hinweis auf die Funktionsweise eines Virulenzfaktors im bisher noch kaum erforschten Gebiet der Interaktion von Nematoden-fangenden Pilzen und Nematoden.

Abstract

The investigation of host-pathogen interactions helps to understand evolutionary steps and decipher the mechanisms behind diseases, thus creating new treatment approaches. The nematode *Caenorhabditis elegans* is an excellent model organism for this purpose. Many studies on the interaction with pathogenic bacteria have already been conducted in *C. elegans*, leading to new insights in humans. While much is known about the bacteria-nematode relationship, the interaction with nematode-trapping fungi (NFP) remains largely enigmatic. Nematode-trapping fungi and their prey share a common evolutionary history dating back millions of years, marked by mutual adaptations of their respective attack and defense mechanisms. While *C. elegans* relies solely on its innate immune system and learned avoidance behavior, nematode-trapping fungi have a vast arsenal of various virulence factors such as small secreted proteins (SSPs) or other effectors that they can use to neutralize and overcome the nematode's defense mechanisms.

In this study, the SSP NipA (nematode-induced protein A) from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys flagrans* was analyzed in detail, and its influence as an effector protein on the nematode *C. elegans* was investigated. Bioinformatic analyses revealed a similarity between the amino acid sequence of NipA and proteins containing EGF domains. The examination of trap-specific expression was carried out and confirmed using a promoter-reporter assay in a strain with an internal control. The secretion of NipA without a signal peptide was ruled out using a laccase reporter assay. Further investigations of the signal peptide showed that it is necessary for specific localization in the traps. The localization of the NipA protein during infection showed translocation from the inner rim of empty traps to the later infection site. Co-localization studies with the t-SNARE SsoA showed no specific involvement of SsoA in the secretion of NipA. In a penetration assay, it was shown that the *nipA* deletion mutant takes more time to penetrate the nematode compared to the wild type, suggesting a role in the early stages of infection. In order to draw conclusions about the function of NipA in *C. elegans*, the gene was heterologously expressed in the nematode. Heterologous expression of *nipA* in the nematode epidermis resulted in a blister phenotype, while constitutive expression in larvae led to body deformities. Transcriptional studies of the *nipA* expressing nematodes revealed the negative regulation of collagens and C-type lectins, while genes related to detoxification and

pathogen defense were upregulated. Examination of the genomic context of *nipA* revealed the potential virulence factor candidate TrsA. The expression of *trsA* is upregulated during infection. The amino acid sequence of TrsA includes an Egh-16 virulence factor-like domain and localizes near the infection site during infection. However, co-localization with NipA showed a different distribution at the penetration site.

Throughout this study, the virulence factor NipA was characterized in more detail, showing its necessity for the complete virulence of the fungus. The hypothesis that NipA plays a role during the penetration of nematodes by *A. flagrans* was strengthened. Through heterologous expression in the host, its target tissue was limited to the cuticle. Additionally, new immunological aspects specific to the response to NipA were obtained from transcriptional analyses. The discovery of another virulence factor with similar spatial-temporal expression and localization suggests that a fine interplay of multiple effectors likely contributes to the pathogenicity of *A. flagrans*. This work provides a first insight into the functioning of a virulence factor in the largely unexplored field of interaction between nematode-trapping fungi and nematodes.

1 Einleitung

1.1 Nematoden

Mit einer geschätzten Artenzahl von mehr als über einer Million, von welchen etwa 30.000 bekannt und beschrieben sind, sind Nematoden die am weitesten verbreiteten Tiere der Erde (Blaxter 2003; Hugot *et al.* 2001; van den Hoogen *et al.* 2019). Sie sind angepasst an verschiedenste Lebensräume, so findet man sie von xerischen Böden bis hin zu marinen und arktischen Gewässern (Bongers und Ferris 1999). Ihre Ernährungsweisen sind an die jeweiligen Lebensräume angepasst. Neben omnivoren Nematoden findet man bakteriovore, fungivore sowie tier- und pflanzenparasitäre Nematoden. Als Pflanzenparasiten richten sie jährlich einen weltweiten Schaden von 216 Milliarden US Dollar an (Schumacher *et al.* 2022). Pflanzenparasitäre Nematoden penetrieren ihren Wirt mittels eines Odonto- oder Ochiostylets. Dabei können die Nematoden als Vektoren zur Übertragung von Viren dienen, wie im Fall des von *Xiphinema index* übertragenen Reisig-Virus (*grapevine fanleaf virus*; GFLV) (Andret-Link *et al.* 2004; Singh *et al.* 2020). Zur Prävention werden vor allem biologische Methoden, wie eine wechselnde Fruchtfolge und Behandlung der Felder mit heißem Dampf, angewandt (Barker und Koenning 1998; Bridge 1996). Aufgrund potentieller Gesundheitsschäden und Umweltbelastungen wurde die Verwendung von chemischen Nematiziden, wie 1,2-dibrom-3-chlorpropan, eingestellt (Thrupp 1991). Die bekanntesten Vertreter tierpathogener Nematoden sind *Ascaris lumbricoides* und *Trichinella spiralis*. Sie parasitieren neben Nutztieren, wie Schweinen, auch den Menschen, wo sie schwere Krankheitsverläufe verursachen können. *T. spirales* ist der Erreger der sogenannten Trichinellose. Die Infektion mit *T. spirales* erfolgt über den Verzehr von rohem oder ungenügend erhitztem, infiziertem Fleisch. Dabei schlüpfen die Eier nach der Passage des Magens im Dünndarm, wo sie zu adulten Tieren heranwachsen und sich verpaaren. Ein Weibchen kann bis zu 1.500 Nachkommen produzieren. Die Larven durchdringen die Darmschleimhaut und gelangen in die Blutbahn, über welche sie in gut durchblutetes Muskelgewebe gelangen und sich dort festsetzen und Symptome wie Fieber oder makulopapulöse Exantheme auslösen. In schweren Fällen, oder zu später Diagnose, können Trichinellen zu Myokarditis, Enzephalitis und weiteren zum Tode führenden Symptomen führen. Zur Behandlung von Infektionen mit *A. lumbricoides* oder *T. spirales* im Menschen und in Tieren werden

Anthelmintica, wie Mebendazol (Janssen Pharmaceutica) und Albendazol verabreicht, wobei bei der Behandlung von Nutztieren eine zunehmende Resistenz der Nematoden beobachtet werden kann (Dold und Holland 2014).

1.2 *C. elegans* als Modellorganismus

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* gehört zur Ordnung *Rhabditida* und ist Teil einer Gruppe von Nematoden, zu der auch verschiedene tierpathogene Arten, wie *Ascaris spp.*, gehören (Jesudoss Chelladurai *et al.* 2018). Seit seiner erstmaligen Etablierung im Labor im Jahr 1974 durch Sydney Brenner dient *C. elegans* als Modellorganismus in der Neurobiologie und Entwicklungsbiologie, sowohl zur Erforschung menschlicher Erkrankungen als auch grundlegender Prozesse und Interaktionen zwischen eukaryotischen Zellen (Brenner 1974; Corsi *et al.* 2015). Im Jahr 2002 wurden Sydney Brenner, Robert Horvitz und John Sulston für ihre Arbeiten mit *C. elegans* mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.

Die kurze Lebensspanne von *C. elegans* (3 Tage bei 25 °C) und die Tatsache, dass die meisten Individuen selbstbefruchtende Hermaphroditen sind (99,8% der Population), machen den Nematoden zu einem ausgezeichneten Modellorganismus für genetische Studien an Eukaryoten (Abbildung 1). Darüber hinaus besitzt *C. elegans* eine konstante Anzahl somatischer Zellen, was es Forschern ermöglicht, jede Zelle von der Befruchtung bis zum ausgewachsenen Tier zu verfolgen (Kimble und Hirsh 1979; Sulston und Horvitz 1977; Sulston *et al.* 1983).

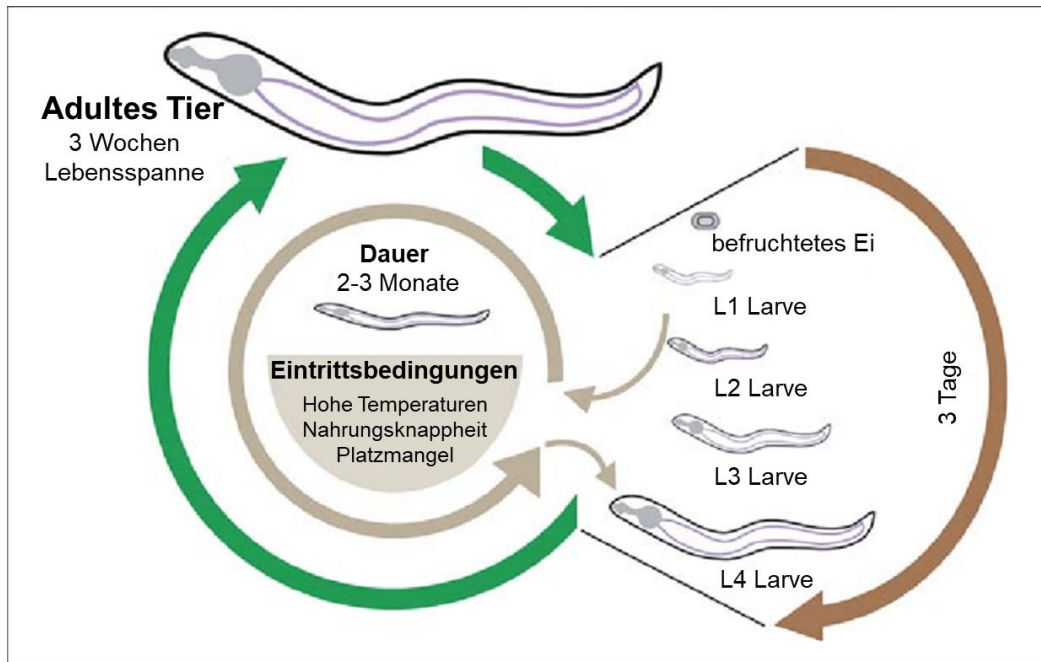


Abbildung 1: Lebenszyklus von *C. elegans*. Die Larvenentwicklung dieses Organismus erfolgt in vier aufeinanderfolgenden Larvenstadien, die als L1 bis L4 bezeichnet werden. Am Ende jedes Larvenstadiums erfolgt eine Häutung. Die L4-Larven häuten sich schließlich zu Adulten, die unter normalen Laborbedingungen etwa 3 Wochen überleben. Unter widrigen Umweltbedingungen wie Nahrungsmangel oder Platzmangel haben L1-Larven die Fähigkeit, ein Dauerstadium zu entwickeln. Diese Dauer-Larven sind auf langfristiges Überleben und die Ausbreitung in neue Umgebungen spezialisiert. Wenn sich die Umweltbedingungen verbessern, können die Dauer-Larven direkt in das L4-Stadium übergehen und den Rest ihres Lebenszyklus normal durchlaufen. Die gesamte Entwicklung von einem Ei bis zu einem erwachsenen Tier dauert bei einer Temperatur von 25 °C etwa 3 Tage (Schema verändert nach (Ewald *et al.* 2018)).

Die Beobachtung von *C. elegans* kann unter einem Stereomikroskop auf Petrischalen durchgeführt werden, da der Nematode aufgrund seiner Größe (0,25 mm direkt nach dem Schlüpfen, bis zu 1 mm als Adultus) gut sichtbar ist. Die Verwendung fluoreszierender Proteine und der transparente Körper von *C. elegans* ermöglichen die Beobachtung von Entwicklungsprozessen und Proteininteraktionen *in vivo* (Boulin *et al.* 2006; Chalfie *et al.* 1994).

Das Genom von *C. elegans* war das erste, das 1998 von einem mehrzelligen Organismus sequenziert wurde. Diese Sequenzierung und die anschließende Anwendung von *forward* und *reverse genetics* haben zur Identifizierung vieler Schlüsselgene in Entwicklungs- und Zellbiologieprozessen beigetragen (Berks 1995; Corsi *et al.* 2015). Es wurde festgestellt, dass 60-80% der menschlichen Gene Orthologe in *C. elegans* haben und etwa 40% der Gene, die an menschlichen

Erkrankungen beteiligt sind, auch im Wurmgenom vorhanden sind, wodurch die Bedeutung von *C. elegans* als Modellorganismus für die Erforschung menschlicher Krankheiten weiter unterstrichen wird (Culetto und Sattelle 2000; Kaletta und Hengartner 2006).

C. elegans wird auch zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Wirt und Pathogen verwendet, da der Wurm kein adaptives Immunsystem besitzt. Wenn *C. elegans* auf Pathogene trifft, können Veränderungen im Verhalten beobachtet werden, wie etwa Vermeidungsreaktionen (Couillault und Ewbank 2002). Die Abwehr von Pathogenen erfolgt je nach Erreger entweder im Darm oder in der Epidermis des Nematoden, wobei *C. elegans* auf seine angeborene Immunantwort zurückgreift. Diese Immunantwort umfasst unter anderem die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (Ewbank und Zugasti 2011; Pujol *et al.* 2008b).

1.3 Die Epidermis und ihre Rolle in der angeborenen Immunabwehr von *C. elegans*

Die Epidermis, oder auch in älterer Literatur Hypodermis genannt, ist eine dünne Zellschicht unter der Kutikula. Sie kann in vier Bereiche, welche durch innere Einstülpungen auch die Muskelquadranten trennen, in einen dorsalen, einen ventralen und zwei laterale Bereiche, eingeteilt werden (Bird und Bird 1991). Die Epidermis sekretiert die Kutikula und beinhaltet Proteine, die mit Nährstoffen und Eisentransport in Verbindung gebracht werden. Sie ist wichtig für die Regulation der Osmose und spielt eine funktionelle Rolle während der Embryogenese (Costa *et al.* 1997; Perry und Moens 2013). An der apikalen Seite sind die epidermalen Zellen durch die Kutikula geschützt. An der basalen Seite verbindet eine Basallamina die Epidermis mit den Muskeln. In den dorsalen und ventralen Bereichen wird die basale Seite mit der Basallamina und die apikale Seite mit der Kutikula über Komplexe, ähnlich Hemidesmosomen der Klasse I, den *fibrous organelles* (FOs), und Intermediärfilamenten verbunden. Neben der Verbindung mit den Muskeln übertragen sie auch Signale von der Kutikula an mechanosensorische Berührungneuronen (Francis und Waterston 1991; Hresko *et al.* 1994). Eine Hauptkomponente der FOs ist VAB-10. Die Isoform VAB-10A ist ähnlich zu Plectin und BPAG1e, welche in Hemidesmosomen Keratinfilamente mit Integrinen und BPAG2 Adhäsionsrezeptoren verbinden. Genetische Analysen zeigten, dass VAB-10A auch für die Verankerung von

Intermediärfilamenten benötigt wird (Bosher *et al.* 2003; Nievers *et al.* 1999). An der apikalen Seite der Epidermis wird VAB-10A durch die Transmembranadhäsionsmoleküle MUP-4 und MUA-3 mit den Intermediärfilamenten verbunden, während an der basalen Seite Myotactin/LET-805 diese Aufgabe erfüllen (Bercher *et al.* 2001; Hong *et al.* 2001; Hresko *et al.* 1999) (Abbildung 2A). Mutationen, welche die FOs inaktivieren, wie eine *vab-10A* Deletion, führen zu einem Phänotyp mit Blasenbildung, ähnlich zu dem beobachtet in Patienten mit beeinträchtigten Hemidesmosomkomponenten (Bosher *et al.* 2003; Hong *et al.* 2001; Hresko *et al.* 1999).

Als äußerste Zellschicht spielt die Epidermis neben der Formgebung auch eine wichtige Rolle als physische Barriere gegen mechanischen und strukturellen Schaden, sowie in der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen, wie *Microbacterium nematophilum* und *Drechmeria coniospora*, welche den Nematoden über die Kutikula infizieren. Studien zeigten, dass sterile mechanische Verletzungen der Epidermis, in Menschen, Fliegen und *C. elegans* eine Aktivierung der angeborenen Immunabwehr in Form von antimikrobiellen Peptiden (AMP) auslöst (De Gregorio *et al.* 2002; Patterson *et al.* 2013; Pujol *et al.* 2008a; Sørensen *et al.* 2006). Transkriptionelle Analysen haben gezeigt, dass viele Gene während der Infektion mit den Nematodenfangenden Pilzen *Monacrosporium haptotylum* und *D. coniospora* in Nematoden hochreguliert werden (Ahren *et al.* 2005; Engelmann *et al.* 2011; Pujol *et al.* 2008b). Unter den hochregulierten Genen befinden sich Neuropeptid-ähnliche Proteine (NLPs) (*nlp-27-31* und *nlp-34*) und Caenacine (CNCs) (*cnc-1/-2/-4/-5/-11*), welche zur Resistenz gegen die Infektion von *D. coniospora* beitragen (Lebrigand *et al.* 2016; Pujol *et al.* 2008b; Zugasti *et al.* 2014). Trotz der gemeinsamen Hochregulierung der beiden Genklassen während Infektionen und ihrer Wirkung in der Epidermis werden sie über verschiedene Signalwege reguliert (Pujol *et al.* 2008a). Die Expression von *nlp*-Genen wird nach Infektion mit *D. coniospora* oder Verletzung durch den G-Proteingekoppelten Rezeptor (GPCR) DCAR-1 Epidermis-spezifisch und zellautonom induziert. DCAR-1 lokalisiert an der apikalen Membran der epidermalen Zellen und wird durch HPLA (*4-hydroxyphenyllactic acid*) aktiviert. Die Menge an HPLA wird durch Infektion und Mutationen in Kutikula-Kollagenen wie DPY-10 erhöht, wodurch es als DAMP (*damage associated molecular pattern*) klassifiziert wird (Zugasti *et al.* 2014). Caenacin-Genexpression ist im Gegensatz zur *nlp*-Regulierung abhängig vom DBL-1/TGFβ-Signalweg, welcher durch Infektionen aktiviert wird. Findet eine

Verletzung statt, werden *cnc*-Gene über den p38-MAP-Kinase-Signalweg induziert (Zugasti und Ewbank 2009). Während der Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* bindet DBL-1 an den heterodimeren DAF-4/SMA-6 Rezeptor, welcher den intrazellulären SMA-2/SMA-3/SMA-4 Komplex aktiviert, welcher wiederum SMA-9, einen Zink-Finger Transkriptionsfaktor, in den Zellkern rekrutiert (Gumienny und Savage-Dunn 2013). Während der Infektion mit *D. coniospora* wird jedoch, statt dem SMA-2/SMA-3/SMA-4 Komplex, nur SMA-3 zur Induktion der *cnc*-Gene, durch einen bislang unbekanntem Transkriptionsfaktor, benötigt (Zugasti und Ewbank 2009). Interessanterweise wird DBL-1 im Nervensystem exprimiert, was darauf schließen lässt, dass er auf parakrine Weise in die epidermalen Zellen gelangt, um dort die *cnc*-Genexpression, zusätzlich zur Expression von Abwehrgenen im Darm, zu induzieren (Mallo *et al.* 2002; Zugasti und Ewbank 2009) (Abbildung 2B).

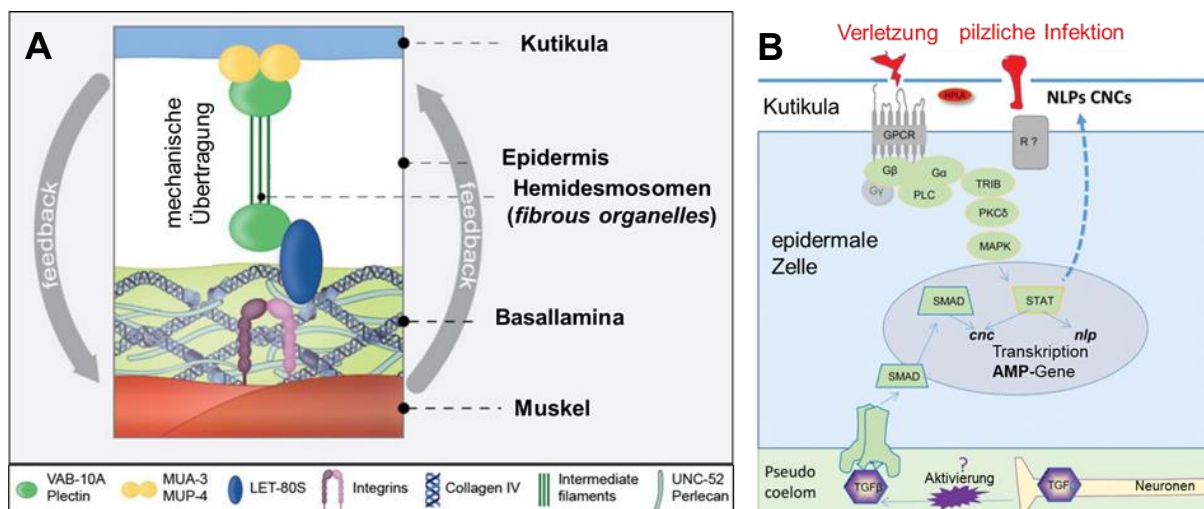


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Epidermis und Mechanismen der angeborenen Immunabwehr. (A) Die epidermalen Zellen werden durch Hemidesmosomen ähnliche *fibrous organelles* durchspannt. Sie verbinden, durch LET-80S an der basalen Seite und MUP-4/MUA-3 an der apikalen Seite, die Kutikula mit den Muskeln und übertragen mechanische Signale (verändert nach (Teuscher *et al.* 2022)). (B) Verletzung oder Infektion der Epidermis führt zu einer Hochregulierung von *cnc*- und *nlp*-Genen in der Epidermis. Während die Induktion von *nlp*-Genen abhängig von GPCR DCAR-1 und dessen Bindung an HPLA, ist die Induktion von *cnc*-Genen abhängig vom DBL-1 aktivierten TGFβ-Signalweg (verändert nach (Taffoni und Pujol 2015)).

Es ist noch nicht eindeutig, wie der p38 MAPK-Signalweg die Aktivierung und den Transport von STA-2 in der *C. elegans* Epidermis steuert, aber im Falle starker epidermaler Verletzung konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Hochregulierung von *nlp-29* und *cnc-2* in einer STA-2 abhängigen aber p38 MAPK-unabhängigen Weise erfolgt. STA-2 wird dabei sowohl im Zellkern als auch an den FOs lokalisiert (Dierking *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2015). Dabei konnte gezeigt werden, dass STA-2

mit MUP-4 an den apikalen Seiten der epidermalen Zellen lokalisiert. Es wird postuliert, dass starker Schaden der FOs zur Freisetzung von STA-2 führt, welches anschließend die AMP-Produktion induziert (Zhang *et al.* 2015).

Die wichtigsten molekularen Mechanismen, die an der epidermalen angeborenen Immunantwort von *C. elegans* beteiligt sind, wurden bereits identifiziert. Trotz der hoch konservierten und Nematoden-spezifischen Signalwege, welche die Hochregulierung der AMP-Expression und Wundheilung steuern, konnten Gemeinsamkeiten in der Schadenserkennung und der Induktion von Abwehrgenen im Menschen erkannt werden (Taffoni und Pujol 2015).

1.4 Die Kutikula von *C. elegans*

Aufbau und Struktur

Die Kutikula von *C. elegans* ist ein flexibles und robustes Exoskelett welches, durch Verbindung mit den Muskeln, die Fortbewegung der Nematoden ermöglicht. Als stark undurchlässige, physische Barriere steht die Kutikula an vorderster Front in der Abwehr von Pathogenen und anderen Umwelteinflüssen. Während der Entwicklung wird die Kutikula fünfmal synthetisiert, zum ersten Mal im Embryo und schließlich am Ende jedes Larvenstadiums. Abgesehen von der ersten Synthese entsteht die Kutikula immer unter der bestehenden, wobei diese zeitgleich oder darauffolgend durch Häutung abgestoßen wird (Singh und Sulston 1978). Die Synthese der Kutikula findet in einer unterliegenden, epidermalen Zellschicht, der Epidermis, statt. Während der Synthese werden die kutikulären Bestandteile an der apikalen Membran der epidermalen Zellen sekretiert und anschließend an der äußeren Oberfläche polymerisiert, wo sie mit den Zellen in engem Kontakt bleiben. Die Kutikula, welche den gesamten Nematoden bedeckt, besitzt in den dorsalen und ventralen Bereichen eine grobe vielschichtige Ultrastruktur, welche sich in verschiedenen Entwicklungsstadien unterscheidet (Cox *et al.* 1981b; Peixoto und De Souza 1995; Peixoto *et al.* 1997). Die vier Hauptschichten sind die Epikutikula, der Kortex, die mediale Schicht und die Basalschicht. In einem schmalen lateralen Bereich über den *seam cells* bilden sich im L1 und Dauerlarvenstadium, so wie in adulten Tieren, anterior zu posterior Vertiefungen, sogenannte Alae, aus, welche die dorsale von der ventralen Kutikula trennen (Cox *et al.* 1981a; Johnstone 2000) (Abbildung 3). Die äußerste

Schicht (Kortex) wird in allen Entwicklungsstadien von umrundenden Furchen, den Annuli, durchzogen. In Stadien mit Alae, werden die dorsalen und ventralen Annuli durch diese getrennt. In Larvenstadien ohne Alae treffen die dorsalen und ventralen Annuli deutlich versetzt über den *seam cells* aufeinander (Sapio *et al.* 2005). Die lipidreiche Epikutikula wird zusätzlich von einer Glykoprotein-reichen, negativ geladenen Oberflächenbeschichtung überzogen. Diese zusätzliche unbeständige Schicht wird von Drüsenzellen und dem Ausscheidungssystem synthetisiert. Diese Schicht wurde in einigen pathogenen Nematoden mit der Vermeidung einer Immunreaktion in Zusammenhang gebracht. Zusätzlich spielt die Glykoprotein-Schicht eine Rolle während der Fortbewegung und erschwert pathogenen Mikroben, wie Pilzen und Bakterien das Anheften, was sie zu einem Teil des Immunsystems macht (Blaxter *et al.* 1992; Davies *et al.* 2008; Hoflich *et al.* 2004; Page *et al.* 1992).

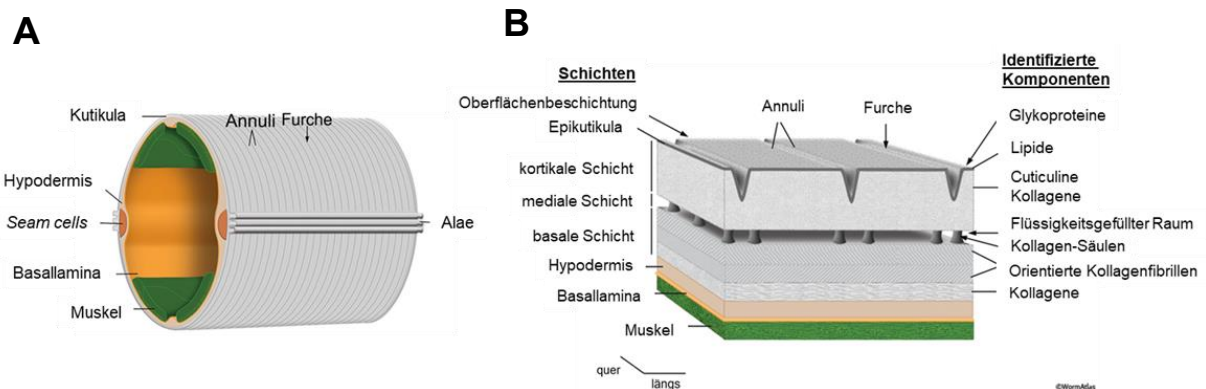


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kutikula von *C. elegans*. (A) Querschnitt eines adulten Nematoden ohne Darstellung der inneren Organe. Die Kutikula wird von Annuli durchzogen, welche durch Alae über den *seam cells* getrennt werden. Die Kutikula wird von der unterliegenden Epidermis sekretiert. Die Muskeln sind über eine Basallamina mit der Epidermis verbunden. (B) Darstellung der einzelnen Schichten der Kutikula und ihrer Bestandteile. Die Hauptschichten der Kutikula sind die Epikutikula, die kortikale, mediale und basale Schicht. Hauptbestandteil aller Schichten ist Kollagen, während in der Epikutikula Lipide und in der kortikalen Schicht Cuticuline zu finden sind (verändert nach WormAtlas.org).

Die Kollagenbiosynthese

Die Kutikula ist eine hoch strukturierte extrazelluläre Matrix (ECM), welche zu 80% aus vernetzten Kollagenen besteht. Die Kollagene bestehen aus charakteristischen Blöcken aus Glycin-Prolin und Hydroxyprolin Sequenzen, welche von konservierten Cysteinen flankiert werden (Johnstone 2000). Im Vergleich zu Vertebraten sind die Nematoden Kollagene am ähnlichsten zu Fibrillen-assoziierten Kollagenen mit unterbrochenen dreifach Helices (FACIT). Die Kollagenproteine werden dabei von einer etwa 170 Gene umfassenden Familie exprimiert, welche strengen zeitlichen

Regulationsmustern unterliegt (Johnstone und Barry 1996). Die Kollagenbiosynthese der Kutikula beinhaltet mehrere ko- und posttranslationale Modifikations-, Verarbeitungs-, Sekretions- und Vernetzungsschritte, die wiederum durch spezifische Enzyme und Chaperone katalysiert werden. Die erste Modifikation des Prokollagens findet ko-translational im ER statt. Die Prolyl-4-hydroxylation führt zu einer thermostabilen Faltung des Kollagens durch PDI (Protein-Disulfid-Isomerase) und Prolyl-4-hydroxylasen, wie DPY-18 und PHY-2. Doppeldeletionen von DPY-18 und PHY-2 führen zu embryonaler Letalität (Friedman *et al.* 2000; Winter und Page 2000). Weitere Schritte der Kollagenbiosynthese in Vertebraten sind die Registrierung und Trimerisierung der Kollagenstränge. In *C. elegans* wird vermutet, dass die stark konservierten C-terminalen Cysteine eine wichtige Rolle während der Registrierung spielen. Die Trimerisierung kann sowohl vom N- als auch vom C-Terminus aus erfolgen und durch PDI vermittelte Disulfidbrücken katalysiert werden, was auf multiple unabhängige Funktionen von PDI während der Kollagenbiosynthese hindeutet. Aufgrund der iminreichen Kollagene von *C. elegans* wird die Trimerisierungsgeschwindigkeit durch Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase (PPIase)-Enzyme der Cyclophilin (CYN) und FK506 Klasse der Bindungsproteine (FKB) unterstützt (Bachinger 1987; Steinmann *et al.* 1991). Die Sekretion der Kollagene erfolgt SEC-23 abhängig über den COPII-Signalweg aus dem ER in den Golgi-Apparat (Roberts *et al.* 2003). Durch DPY-31 und BLI-4 wird das Prokollagen C- und N-terminal weiter prozessiert (Abbildung 4A). Die C-terminalen Enden nach den Gly-X-Y Domänen der Kollagene in *C. elegans* sind relativ kurz, daher wurde dem C-terminalen Prozessieren bis lange kaum Bedeutung zugewiesen. Die Mutation des knochenmorphogenetischen Proteins (BMP) DPY-31, eine Proteinklasse welche eine wichtige Rolle in der C-terminalen Prozessierung von Kollagenen in Vertebraten spielt, führte jedoch zu starken morphologischen Veränderungen. Mutanten zeigten Phänotypen wie temperatursensitive *dumpy* (kurz und dick; Dpy), abnormale Embryogenese (Emb) und Letalität (Let), was zeigt, dass *dpy-31* eine essenzielle Prokollagen C-Peptidase kodiert (Novelli *et al.* 2004). Alle *C. elegans* Kollagene besitzen eine hoch konservierte N-terminale Schnittstelle für BLI-4, welches für die korrekte Prozessierung zum Beispiel der Kollagene ROL-6 und SQT-1 benötigt wird. BLI-4 ist eine Kex2, Subtilisin-ähnliche Serinprotease, welche essenziell für die postembryonale Viabilität von *C. elegans* ist. RNAi Analysen gegen *bli-4* zeigten einen Effekt auf die Häutung der Nematoden, während Null-Mutanten embryonal-letal waren

und partieller Funktionsverlust von BLI-4 zu *Blister* (Bli, *BLIsterd*) und *Dumpy* Phänotypen führte (Peters *et al.* 1991; Thacker *et al.* 1995; Yang und Kramer 1994). Im Unterschied zu der Hydroxylysin Kollagenvernetzung in Vertebraten werden in *C. elegans* Di- und Tityrosin-Verbindungen zwischen Kollagenen und Cuticulinen erstellt, welche der Kutikula ihre charakteristische Festigkeit und Integrität verleiht (Myllyharju und Kivirikko 2001). Das Hauptenzym der Kutikula-Vernetzung ist eine von *bli-3* kodierte duale Oxidase. Das Enzym besitzt ein Signalpeptid, eine membrangebundene Peroxid-produzierende Domäne und eine funktionell aktive Peroxidasedomäne. Es wird angenommen, dass BLI-3 in gekoppelten Reaktionen mit der NADPH-Oxidase-Domäne Wasserstoffperoxid für die Vernetzungsreaktion erzeugt, welches anschließend durch die Peroxidase-Domäne katalysiert wird. Das entstehende Wasserstoffperoxid wird weiter von MLT-7 zur Tyrosin-Vernetzung verwendet, kann aber auch eine Rolle in der Immunabwehr von *C. elegans* spielen. Mutation von BLI-3 führt zu verringerten Tyrosin-Vernetzungen und zur Abwesenheit von Kollagen-Säulen in der medialen Schicht und damit zu *Blister* und *Dumpy* Phänotypen (Abbildung 4B) (Edens *et al.* 2001; Moribe *et al.* 2012; Simmer *et al.* 2003).

Die Kollagenbiosynthese und die Funktionalität der ECM spielen in allen Metazoen eine wichtige Rolle während der Organogenese. Mutationen in einzelnen Kollagenen oder Bestandteilen ihres Biosynthesewegs können im Menschen zu einer Reihe von Defekten, wie *epidermolysis bullosa*, Ehlers-Danlos Syndrom und *osteogenesis imperfecta* führen. Trotz der stark spezialisierten ECM von *C. elegans* sind in Nematoden viele Moleküle, Mechanismen und Signalwege konserviert und auch in Vertebraten zu finden, sodass sie, dank ihrer guten genetischen Zugänglichkeit, als Modell für die Haut und ECM-Untersuchung verwendet werden (Chisholm und Hsiao 2012).

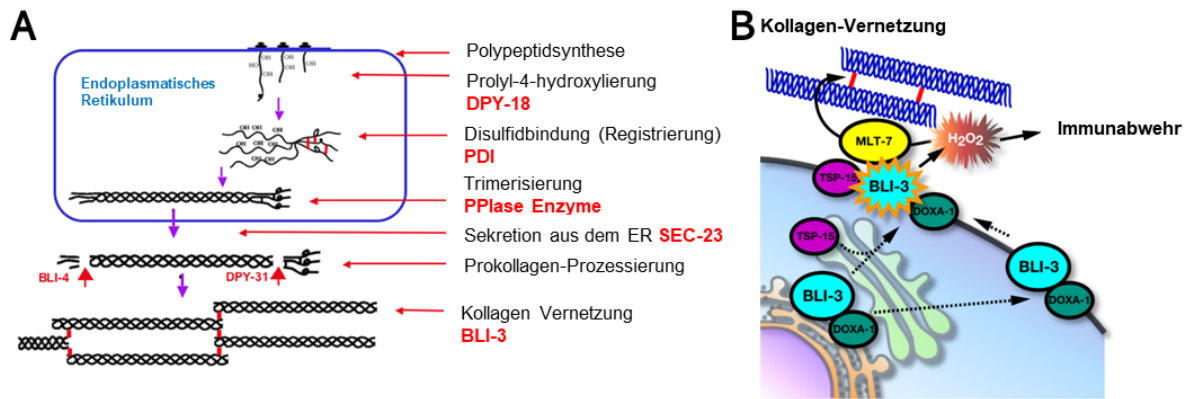


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kollagenbiosynthese. (A) Nach der Polypeptidsynthese in das ER werden die Kollagene durch DPY-18 und PDI hydroxyliert. Die Bildung von Disulfidbrücken während der Registrierung wird von PDI katalysiert. Während der Trimerisierung wird die Bildung von cis-trans Verbindungen durch PPlase Enzyme beschleunigt. Der Transport aus dem ER erfolgt über SEC-23. Das Prokollagen wird weiter N- und C-terminal durch BLI-4 und DPY-31 prozessiert. Die Kollagen-Vernetzung findet unter der Produktion von Wasserstoffperoxid durch BLI-3 statt (nach www.wormbook.org). (B) Funktionsweise der dualen Oxidase BLI-3. BLI-3 wird sekretiert und lokalisiert an der äußeren Membran der epidermalen Zellen. TSP-15 und DOXA-1 unterstützen die Produktion von H₂O₂, welches der Abwehr von Pathogenen und der Vernetzung von Kollagenen durch MLT-7 dient (Moribe *et al.* 2012).

1.5 Nematoden-fangende Pilze (NFP)

Nematoden-fangende Pilze (NFP) sind vielseitige carnivore Mikroorganismen, die mit komplexen Fangstrukturen Nematoden einfangen und verdauen können. Einige Pilze dieser Gruppe können in ihrer Lebensweise zwischen saprotrophem Lebensstil und einem räuberischen Verhalten in Anwesenheit von Nematoden wechseln, während andere obligat pathogen sind.

Obwohl viel über die Interaktionen zwischen pflanzlichen Pathogenen und Insekten-pathogenen Pilzen und ihren jeweiligen Wirten bekannt ist, ist die Wechselwirkung zwischen NFP und ihrer Beute immer noch weitgehend unerforscht.

Die evolutionäre Entstehung der räuberischen Lebensweise dieser Pilze wird auf einen möglichen Nährstoffmangel in stickstoffarmen Umgebungen zurückgeführt, in denen sich cellulolytische oder lignolytische Pilze entwickelten (Barron 2003). Fossile Funde deuten darauf hin, dass das Auftreten von Nematoden-fangenden Pilzen mit dem Massensterben während des Perm- und Triaszeitalters in Verbindung steht. Dieses Ereignis führte zu einem Anstieg der Diversität und Biomasse von Mikroorganismen, die sich von totem organischen Material ernährten (Visscher *et al.* 1996). Das Vorkommen von Nematoden wurde durch die Entdeckung von 500 bis 600 Jahre alten Fossilien datiert, während Bernsteinfossilien von Pilzen, die Nematoden fangen, etwa 100 Millionen Jahre alt sind (Schmidt *et al.* 2007; van Megen *et al.* 2009).

Es wird angenommen, dass der fleischfressende Lebensstil dieser Mikroorganismen unabhängig voneinander durch konvergente Evolution entstanden ist (Yang *et al.* 2007).

Heutzutage sind NFP in zahlreichen Ökosystemen weit verbreitet. Basierend auf ihrem Infektionsmechanismus können sie in vier Gruppen unterteilt werden: Nematoden-fangende Pilze, die spezialisierte Hyphenstrukturen ausbilden; endoparasitäre Pilze; opportunistische nematophage Pilze und toxinproduzierende Pilze (Hyde *et al.* 2014; Liu *et al.* 2009; Swe *et al.* 2011). Aus morphologischer und zellbiologischer Sicht ist die Gruppe der Nematoden-fangenden Pilze besonders interessant, da die Bildung von Infektionsstrukturen eine erhebliche morphologische Veränderung darstellt (Meerupati *et al.* 2013) Hierbei können fünf Gruppen unterschieden werden: klebrige Säulen, adhäsive Netzwerke, klebrige Fangknoten, kontraktile und nicht kontraktile Ringe (Abbildung 5) (Yang *et al.* 2007).

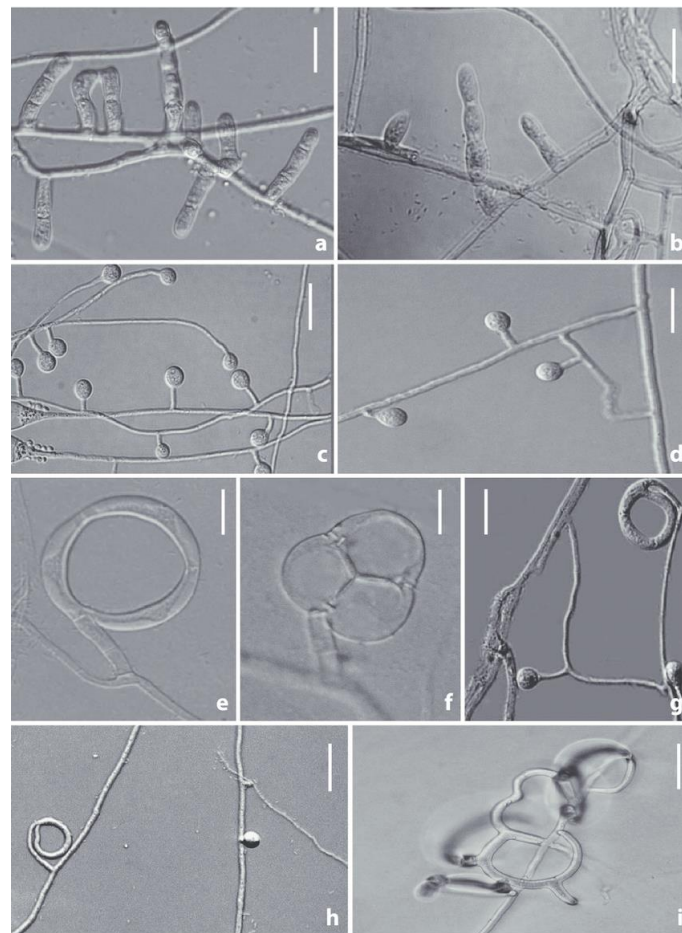


Abbildung 5: Fallenmorphologien verschiedener Nematoden-fangender Pilze. (A, B) Klebrige Säulen, (C, D) Adhäsive Knoten, (E, F) Kontraktile Ringe, (G, H) Adhäsive Knoten und nicht-kontraktile Ringe, (I) Adhäsive Netzwerke. Maßstabsbalken = 10 μ m (Li *et al.* 2015).

1.6 Lebenszyklus und Fallenbildung

In einer nährstoffreichen Umgebung führen Nematoden-fangende Pilze in der Regel einen saprotrophen Lebensstil. Wenn jedoch Nährstoffmangel herrscht, haben sie die Möglichkeit, auf einen parasitären Lebensstil zu wechseln (Nordbring-Hertz *et al.* 2006; Pramer 1964). Dieser Übergang erfordert sowohl biotische als auch abiotische Reize, wobei die Bildung von Fallen der wichtigste Indikator für diese Veränderung ist (Nordbring-Hertz und Stålhammar-Carlemalm 1978; Yang *et al.* 2011). Der direkte Kontakt mit Nematoden und eine nährstoffarme Umgebung sind Voraussetzungen für die Umstellung auf einen parasitären Lebensstil (Tunlid *et al.* 1992).

Nematoden werden zunächst von den Fangstrukturen angezogen und je nach Fangmechanismus gefangen. Dies kann einen aktiven Mechanismus beinhalten, wie er bei kontraktiven Ringfallen beobachtet wird. Diese Fallen bestehen aus drei Zellen, bei Kontakt mit Nematoden wird eine Signalkaskade aktiviert, die wahrscheinlich zu einem Wassereinfluss aufgrund von Glycerinansammlungen führt und somit zur aktiven Kontraktion der Fallen führt (Chen *et al.* 2001; Muller 1958). Bei klebrigen Fallen, die zum Beispiel mit extrazellulären Polymeren beschichtet sind, bleiben die Nematoden an den Fallen haften (Tunlid und Jansson 1991; Tunlid *et al.* 1991; Wang *et al.* 2015). Der Zeitraum von der Haftung bis zur Penetration beträgt, abhängig von der Art des Pilzes und des Nematoden, nur etwa ein bis vier Stunden (Veenhuis *et al.* 1985). Während dieses Prozesses wird die Kutikula durch mechanischen Druck und lytische Enzyme durchdrungen, wodurch eine gerundete Penetrationsstruktur entsteht. Anschließend wird der Nematode paralysiert und trophische Hyphen durchdringen den Körper des Nematoden, um Nährstoffe durch Zellhydrolyse aufzunehmen, was zur vollständigen Verdauung des Wirts innerhalb weniger Stunden führt (Dijksterhuis *et al.* 1994; Yang *et al.* 2011).

Die molekularen Grundlagen der Fallenbildung sind noch weitgehend unerforscht. Einige beteiligte Faktoren konnten jedoch bereits durch Gendelektionen identifiziert werden. *Arthrobotrys oligospora* gilt als Modellorganismus in der Forschung an NFP und ist Gegenstand der meisten Studien zur Entwicklung von dreidimensionalen Fangstrukturen (Niu und Zhang 2011). In einer Vorwärts-Genetik-Studie wurden 15 *A. oligospora*-Mutanten mit Defekten in der Fallenbildung durch Mutagenese identifiziert. Vorhersagen zur Genontologie ergaben Mutationen in drei Genen, die jeweils Proteine mit einer Proteinkinasedomäne, einer YAP-

Bindungs/ALF4/Glomulin-Domäne und einer Domäne unbekannter Funktion (DUF) kodieren (Huang *et al.* 2020). Die Deletion einer NADPH-Oxidase in *A. oligospora* führte zu einer Verringerung der Fallenbildung und deutet auf eine bedeutende Rolle der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hin (Li *et al.* 2017). Des Weiteren reduzierte die Deletion des Gens, das für die einzige G-Protein-beta-Untereinheit kodiert, die Fallenbildung erheblich (Yang *et al.* 2020). Dieses Protein ist ein Homolog von *Saccharomyces cerevisiae* STE4 und wirkt stromaufwärts der FUS3/KSS1 MAPK-Signalkaskade. Eine spätere Studie enthüllte, dass die Wirtswahrnehmung und -reaktion in *A. oligospora* über den MAPK-Pheromonreaktionsweg gesteuert werden (Chen *et al.* 2020). Die MAPK FUS3, die stromaufwärts liegende Kinase STE7 und der Transkriptionsfaktor STE12 sind die Hauptkomponenten zur Regulierung der Fallenmorphogenese und zur Wahrnehmung von nematodenspezifischen Signalmolekülen. Andere Proteine, die eine Rolle bei der Fallenbildung und Pathogenität von *A. oligospora* spielen, sind kleine GTPasen der ADP-Ribosylierungsfaktor (Arf)-Familie und ihre aktivierenden Proteine (Arf-GAPs), die Proteinkinase Ime2 (*inducer of meiosis 2*), die Velvet-Proteine VosA und VelB sowie den *high osmolarity glycerol* (HOG)-Signalweg (Kuo *et al.* 2020; Ma *et al.* 2020; Xie *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2019). In *A. flagrans* führte die Deletion von SipC, eine Komponente des STRIPAK-Komplexes, zum Verlust der Fallenzellenfusion der Fallenidentität (Wernet *et al.* 2021b).

1.7 Interspezieskommunikation

Die langanhaltende Ko-Evolution zwischen nematophagen Pilzen und Nematoden hat eine komplexe Kommunikation zwischen diesen beiden Organismen hervorgebracht. Da die Bildung von Fangstrukturen für die Pilze erheblichen Energieaufwand erfordert, müssen sie zunächst die Nematoden in ihrer Umgebung wahrnehmen, bevor sie ihren parasitären Lebenszyklus und die Bildung von Fallen initiieren können (Pramer und Stoll 1959). Bereits in den 1950er Jahren wurde festgestellt, dass Extrakte von Nematoden und Kulturfiltrate, sogenannte "Nemine", die Bildung von Fallen bei bestimmten NFP auslösen können (Lawton 1957; Pramer und Stoll 1959). Einige Aminosäuren und Dipeptide, wie Phenylalanin-Valin, können auch die Bildung von Fallen bei *A. oligospora* stimulieren (Tunlid *et al.* 1994)

In einem evolutionären Kontext ist es plausibel anzunehmen, dass die molekularen Signalstoffe, die speziell die Bildung von Fallen bei Nematoden auslösen, eine entscheidende Rolle für diese Organismen spielen, da sie andernfalls aufgrund von Selektionsdruck verloren gegangen sein könnten. In den frühen 2000er Jahren wurden Ascaroside als spezifische Signalmoleküle in Nematoden identifiziert, die sowohl als Sexualpheromone als auch als Lockstoffe fungieren. Es wurden auch Substanzen identifiziert, die von NFP ausgeschieden und von den Nematoden wahrgenommen werden. *A. oligospora* gibt flüchtige Verbindungen wie Dimethyl-Disulfid (DMDS), 2-Methyl-1-Butanol (MB), 2,4-Dithiapentan (DTP), Methyl 3-Methyl-2-Butanoat (MMB) und S-Methyl Thioacetat (SMT) an die Umgebung ab. Diese Moleküle werden von den Nematoden über olfaktorische Neuronen und mehrere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) erfasst. Sie ahmen Fortpflanzungs- und Nahrungssignale nach, die für die Würmer attraktiv sind und dazu führen, dass die Nematoden zu den Fallen gelockt werden (Hsueh et al. 2017). Darüber hinaus wurden Sekundärmetaboliten, wie Arthrosporol, eine Rolle in dieser Kommunikation zugewiesen (Yu et al. 2021).

1.8 Virulenzfaktoren

Die Wechselwirkung zwischen Wirt und Pathogen ist ein dynamischer Wettlauf, der dieses Zusammenspiel zu einem äußerst komplexen und sich ständig weiterentwickelnden System macht. Pathogene setzen Effektorproteine und Virulenzfaktoren frei, um den Wirt zu beeinflussen, sich einen Vorteil zu verschaffen und die Infektion voranzutreiben. In molekularen Studien wurden bereits über 60 verschiedene pilzliche Effektorproteine identifiziert, die ein breites Wirkungsspektrum haben. Diese bislang beschriebenen Proteine stellen jedoch lediglich einen kleinen Teil der tatsächlich existierenden Effektorproteine dar, und die Anzahl der erkannten Virulenzfaktoren steigt weiter an, da immer mehr Pathogen-Genome sequenziert werden und die Möglichkeit besteht, diese Proteine mittels bioinformatischer Methoden vorherzusagen (Sperschneider et al. 2015).

Die Vorhersage von Effektorproteinen in Pilzen gestaltet sich kompliziert, da es an bekannten konservierten Proteineigenschaften mangelt und die Anzahl der charakterisierten Effektoren in den einzelnen Arten begrenzt ist. Die Vorhersage bakterieller Effektoren ist hingegen einfacher, da diese oft durch pathogenspezifische

Translokationsmechanismen, wie das Typ-III-Sekretionssystem, übertragen werden. Bei Oomyceten sind konservierte Sequenzmotive, die für Vorhersagen genutzt werden können, auch in die Effektor-Translokation involviert (Djamei *et al.* 2011; Sperschneider *et al.* 2015; Stergiopoulos und de Wit 2009).

Im Gegensatz dazu sind Vorhersagen von pilzlichen Effektoren bislang aufgrund ihrer Lokalisierung, Größe und der Aminosäurezusammensetzung nur ungenau möglich. Moderne *machine learning*-Verfahren ermöglichen genauere funktionelle Analysen dieser Proteine. Bisher sind sie jedoch hauptsächlich auf pflanzenpathogene Pilze ausgerichtet und können noch nicht zuverlässig auf Tier- und Insektenpathogene übertragen werden (Sperschneider *et al.* 2016).

Die effektive Nutzung von Virulenzfaktoren erhöht den evolutionären Druck auf den Wirt, um eine entsprechende Abwehrreaktion zu entwickeln. Wenn der Wirt erfolgreich Abwehrmechanismen etabliert hat, muss das Pathogen fortgeschrittenere Strategien entwickeln, um seine Pathogenität aufrechtzuerhalten (van der Does und Rep 2007). Dieses komplexe Wettrüsten wurde am besten in Pflanzenpathogenen untersucht. In Bezug auf die Wirt-Pathogen-Beziehung zwischen der Nutzpflanze Flachs und dem Flachsrostpilz *Melampsora lini* wurde die Gen-für-Gen-Hypothese entwickelt. Diese Theorie besagt, dass jedem dominanten Avirulenz-Gen (*avr*) des Pathogens ein entsprechendes Resistenz-Gen (*R*) des Wirtes entspricht. Die Wechselwirkung dieser Genprodukte führt in der Pflanze zu einer sogenannten hypersensitiven Antwort (*hypersensitive response*, HR), die dazu führt, dass das Wachstum des pathogenen Pilzes gestoppt wird. Das Ziel des Pathogens besteht darin, die HR zu vermeiden. Infolgedessen entwickelten Pathogene immer raffiniertere Angriffsstrategien, die oft das Immunsystem des Wirtes entweder geschickt umgehen oder direkt manipulieren (Flor 1956; Stergiopoulos und de Wit 2009; Toruno *et al.* 2016). Das RXLR-Motiv ist das bekannteste Beispiel und wurde in Effektoren verschiedener *Phytophthora*-Spezies identifiziert. Dieses Motiv spielt eine entscheidende Rolle bei der Translokation der Effektoren, ihrer Virulenz und ihrer Erkennung durch den Wirt, gemäß dem Gen-für-Gen-Konzept (Anderson *et al.* 2015; Whisson *et al.* 2007).

Die molekularen Funktionen von Effektoren und Virulenzfaktoren sind äußerst vielfältig (Abbildung 6). Sie können die Zellbiologie des Wirtes verändern, Stress- und Abwehrmechanismen unterdrücken, den Stoffwechsel beeinflussen oder in Immun-Signalwegen eingreifen (Lanver *et al.* 2017). Beispielsweise hemmen die Effektoren

Pit2 und Pep1 von *Ustilago maydis* wichtige Abwehrreaktionen der Pflanze. Während Pit2 die pflanzlichen Cystein-Proteasen hemmt, blockiert Pep1 die Pflanzenperoxidase POX12, die für die Produktion von H₂O₂ im Apoplasten entscheidend ist (Doehlemann *et al.* 2009; Mueller *et al.* 2013).

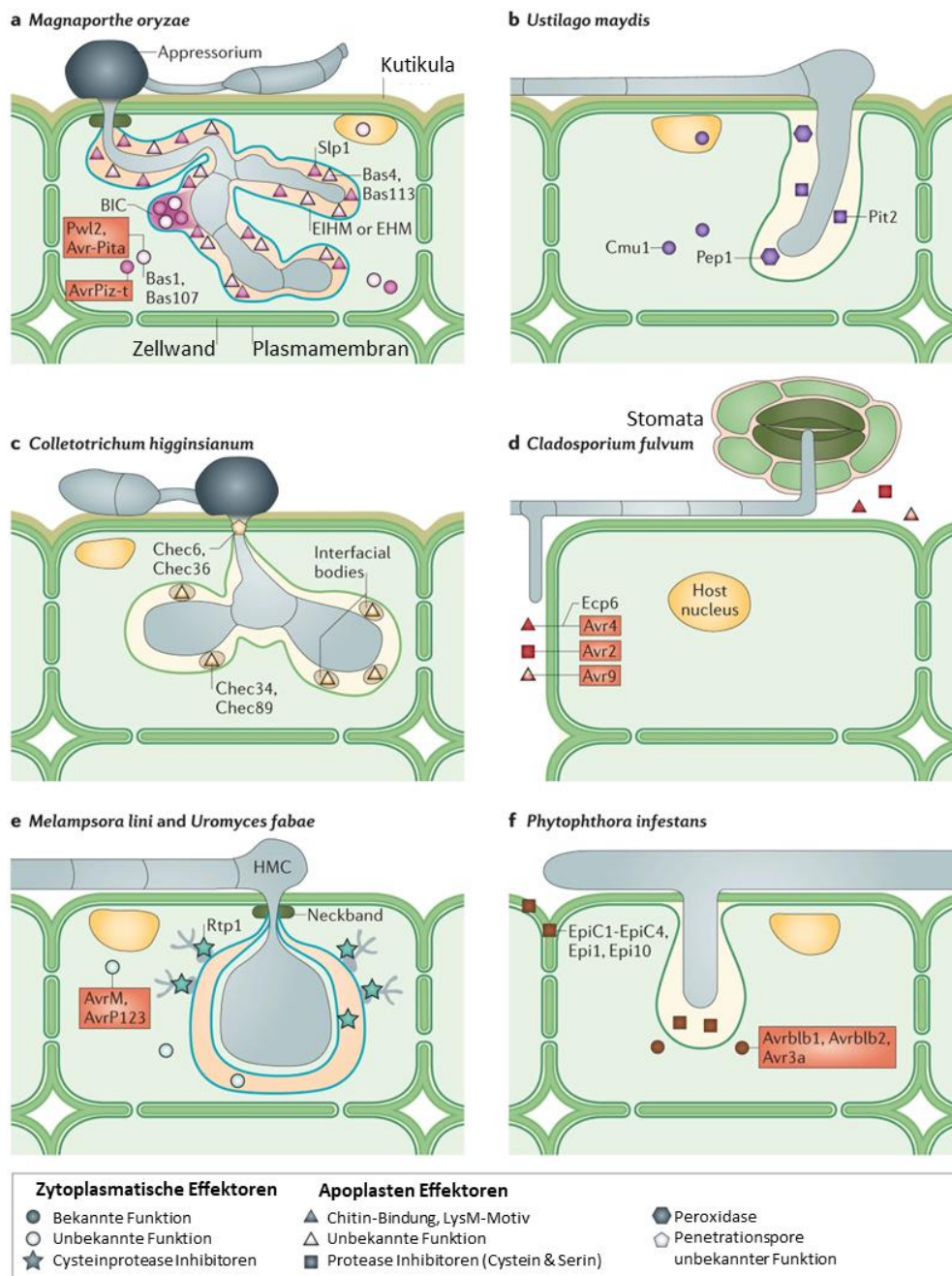


Abbildung 6: Sekretierte Effektoren verschiedener Pflanzenpathogene. Intrazelluläre biotrophische Hyphen sind durch eine Plasmamembran (extrahaustorische Membran (EHM) oder extrainvasive Hyphenmembran (EIHM)) vom pflanzlichen Cytoplasma getrennt. Die dazwischenliegende Matrix kann im Pflanzenapoplasten liegen oder als separates Kompartiment durch eine bandartige Struktur abgetrennt sein. Effektoren, die avirulente Aktivität aufweisen, sind in roten Kästen dargestellt. **(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 ist mit

dem Apoplasten verbunden. Pep1 schützt die Hyphen im Apoplasten vor ROS, während Pit2 die Cysteinproteasen der Pflanze hemmt. Der cytoplasmatische Effektor Cmu1 ist eine Chorismatmutase. **(C)** *Colletotrichum higginsianum* dringt über ein melanisiertes Appressorium in die Zellen ein. Die umgebende Matrix der Hyphen ist mit dem Apoplasten verbunden. Die Effektorkandidaten CheCs befinden sich im Apoplasten. **(D)** *Cladosporium fulvum* dringt über Stomata in die Blattzelle ein und wächst extrazellulär weiter. Der chitinbindende LysM-Effektor Ecp6 wird sekretiert. **(E)** *M. 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-Mesophyllzellen bilden. Der Cysteinprotease-Inhibitor Rtp1 wird in das Wirt-Cytoplasma abgegeben. **(F)** *Phytophthora infestans* dringt über nicht-melanisierte Appressorien in die Zellen ein und bildet fingerartige Haustorien, die von der mit dem Apoplasten verbundenen EHM umgeben sind. Die Protease-Inhibitoren EpiC1 und EpiC2 sind im Apoplasten vorhanden, während Avrblb2 ein Cytoplasmatischer RXLR-Effektor ist. Verändert nach (Giraldo und Valent 2013).

Die Identifizierung von Virulenzfaktoren und Effektorproteinen in Nematodenfangenden Pilzen ist ein wesentliches Forschungsziel, um den Infektionsprozess besser zu verstehen. In Bezug auf *A. flagrans* wurden bereits zwei Proteine identifiziert, die mit der Infektion von Nematoden in Verbindung stehen. Es wurde festgestellt, dass die Genexpression des potenziellen pilzlichen Virulenzfaktors PefB (putatives Effektorprotein) während der Infektion erhöht ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PefB in die Zellkerne von *C. elegans* transloziert (Youssar *et al.* 2019). Ein weiterer Kandidat, der als Virulenzfaktor identifiziert wurde, ist das kleine cysteinreiche Protein CyrA. Das zugehörige Gen *cyrA* wird ausschließlich während des pathogenen Lebenszyklus von *A. flagrans* exprimiert. Darüber hinaus hatte die Deletion dieses Gens einen signifikanten Einfluss auf die Fähigkeit des Pilzes, den erbeuteten Wurm zu paralysieren (Wernet *et al.* 2021a).

1.9 Das Nematoden-induzierte Protein A (NipA)

Zur Identifizierung von Effektorproteinen wurde das Genom von *A. flagrans* sequenziert und annotiert (Youssar *et al.* 2019). Eine Analyse des Genoms auf kleine sekretierte Proteine identifizierte 249 Proteine, die als solche kategorisiert werden. Mit dem auf *machine learning* basierten Programm EffectorP 2.0 wurden die untersuchten Proteine als Effektorproteine eingestuft. 117 der 249 SSPs wurden demnach als Effektoren kategorisiert. Unter den Proteinen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit befand sich NipA mit einem Wert von 0,95. Expressionsanalysen mit quantitativen RT-PCRs und Promotor-Reporterfusionen, zeigten eine spezifische Hochregulierung der Transkription, insbesondere in Bereichen mit Fallennetzwerken. Da dieses Experiment

im Wildtyp Hintergrund durchgeführt wurde, konnte nicht sicher bestätigt werden, dass die Expression in allen Zellkernen der Fallen stattfindet.

Die bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz von NipA mit SignalP, sagte eine Signalpeptidsequenz in den ersten 16 Aminosäuren voraus. Ein Laccase-Assay zur Sekretionsanalyse bestätigte die Funktionalität des Signalpeptids. Hierzu wurde die Laccase C, ohne eigenes Signalpeptid, aus *Aspergillus nidulans* C-terminal an NipA fusioniert. Eine erfolgreiche Sekretion wurde durch einen Farbumschwung im Medium, durch die Oxidation von ABTS durch die Laccase, nachgewiesen. Die Rolle des Signalpeptids blieb bei dieser Untersuchung noch unklar.

Lokalisationsstudien von NipA-GFP beziehungsweise NipA-mCherry unter dem konstitutiven oder nativen Promotor zeigten, spezifische Ansammlungen der Proteine an den Innenseiten leerer Fallen. Während der Infektion akkumulierte NipA an den Infektionsstellen außerhalb der Nematoden. Ko-Lokalisation mit CyrA, einem weiteren SSP, zeigte überlagerte Signale in leeren Fallen, jedoch aber unterschiedliche Lokalisationen während der Infektion. Die Beobachtung des Proteins in sich bildenden Fallen, so wie die Veränderung der Lokalisation während der Infektion können weitere Aufschlüsse über die Funktion des Proteins liefern und sollten genauer untersucht werden.

Um NipA eine Rolle während der Infektion nachzuweisen, wurde das *nipA*-Gen im Locus deletiert. Das durchgeführte Virulenz-Assay betrachtete ausschließlich die Dauer vom Fangen eines Nematoden bis zu dessen Paralyse. Dabei konnte gezeigt werden, dass in der NipA-Mutante die Paralyse etwa 30 Minuten später eintritt als beim Wildtyp. Da die erfolgreiche Penetration der Induktion der Paralyse jedoch vorrausgeht, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob schon die Penetration durch die Deletion von *nipA* beeinflusst wird.

Die im Rahmen einer Masterarbeit vorausgegangenen Untersuchungen haben NipA als einen putativen Effektor weitgehend charakterisiert, dennoch blieben einige Fragen bezüglich der tatsächlichen Rolle von NipA während der Infektion offen (Menzner 2020).

Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde das Nematoden induzierte Protein A (NipA) weiter charakterisiert und seine Funktion während der Infektion analysiert. Die Anwendung

neuer bioinformatischer Werkzeuge wie AlphaFold und ProtNLM sollten zur Identifizierung bekannter Proteinstrukturen verwendet werden. Zur Untersuchung der Sekretion sollte NipA ohne Signalpeptid an eine Laccase fusioniert werden, um Rolle des Signalpeptids zu untersuchen. Des Weiteren sollten durch die Ko-lokalisierung mit Bestandteilen der Sekretionsmaschinerie, wie den t-SNARES, der Sekretionsmechanismus besser untersucht werden. Eine Rolle von NipA während der Penetration sollte in einem weiterentwickelten Virulenz-Assay untersucht werden. Dafür wurde CyrA, ein in der Infektionsblase lokalisierendes Protein, mit mCherry markiert und unter dem nativen Promotor im Wildtyp und in der *nipA*-Deletionsmutante exprimiert. Die Penetrationszeit wurde vom Fang eines Nematoden bis zur Akkumulation von CyrA-mCherry im Infektionsbulbus gemessen. Heterologe Expression von *nipA* in den Nematoden sollte Aufschluss über dessen Wirkung auf den Wirtsorganismus geben. Transkriptionsanalysen von *nipA* exprimierenden Nematoden sollten zeigen, ob Nematoden-spezifische Gene während der heterologen Expression differenziell reguliert werden. Untersuchungen des genomischen Kontext von *nipA* sollten mögliche Interaktionspartner oder ähnlich regulierte Gene identifizieren.

2 Ergebnisse

2.1 Erweiterte bioinformatische Analyse von NipA

In der vorausgegangenen Masterarbeit wurde die Aminosäuresequenz von NipA bioinformatisch analysiert. Die damalige Annotation des Signalpeptids durch SignalP2.0 bestimmte dieses auf die ersten 15 AS am N-Terminus von NipA. Die erneute Untersuchung der Sequenz mit der neuen SignalP5.0 Version bestimmte jedoch die ersten 16 AS als Signalpeptid. Die damalige Betrachtung der Aminosäurezusammensetzung konzentrierte sich ausschließlich auf die am häufigsten vertretenen AS (abkürzen), welche als Glycin (10,5 %) und Lysin (9,8 %) identifiziert wurden. Die Untersuchung der Cysteine und ihrer Bildungen erfolgte in dieser Arbeit. Insgesamt sind 13 Cystein-Moleküle in der NipA-Proteinsequenz enthalten und machen somit 9,8 % der Gesamtsequenz aus. Mit Hilfe von AlphaFold, einem auf einem künstlichen neuronalen Netzwerk basierten Programm, welches anhand von der Aminosäuresequenz eines Proteins dessen Proteinstruktur vorhersagen kann, wurde ein Modell für NipA mit einem Vertrauensmaß (=pLDDT) von 61,32 erstellt. In dem Modell werden sechs Disulfidbrücken vorhergesagt, mit einem freien Cystein am N-Terminus. Die Bildung eines Dimers zweier NipA-Proteine wurde durch AlphaFold Berechnungen ausgeschlossen (Abbildung 7).

Aufgrund fortgeschrittener automatisierter Analysetechniken wie ProtNLM konnte inzwischen eine Ähnlichkeit von NipA zu EGF (*epidermal growth factor*) - Domänen enthaltenden Proteinen erkannt werden. ProtNLM ist eine neue Methode, welche von UniProt verwendet wird, um nicht charakterisierte Proteinsequenzen automatisch zu annotieren. Dies geschieht mit Hilfe eines Sequenz-zu-Sequenz-Modells, welches eine Vorhersage auf Grundlage der Aminosäuresequenz trifft.

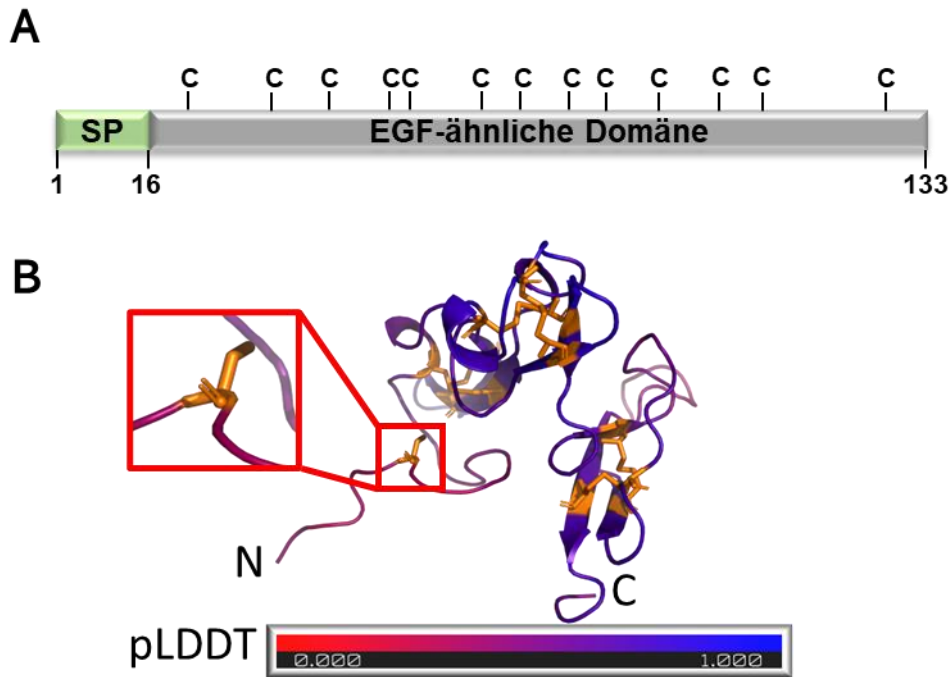


Abbildung 7: Bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz von NipA. **(A)** Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von NipA mit Signalpeptid und eingezeichneten Cysteinen. Durch ProtNLM wird eine EGF-ähnliche Domäne von AS17 bis AS133 für NipA vorausgesagt. **(B)** Durch AlphaFold berechnetes Proteinmodell mit Einfärbung anhand des Vertrauensmaßes (pLDDT; rot = geringes Vertrauensmaß, blau = hohes Vertrauensmaß). Die 13 Cysteine sind orange markiert. Der Ausschnitt vergrößert das freie Cystein am N-terminus.

2.2 NipA wird sekretiert und während der Infektion hochreguliert

Für Virulenzfaktoren ist die Sekretion eines der Hauptkriterien. Daher wurde in einer vorausgegangenen Arbeit die Funktionalität des Signalpeptids von NipA mit Hilfe eines Laccase-Reporterassays untersucht. Hierfür wurde das für die Laccase kodierende Gen *lccC* aus *Aspergillus nidulans* ohne Signalsequenz C-terminal an NipA fusioniert. Die Expression wurde durch den konstitutiven *oliC*-Promotor aus *A. nidulans* kontrolliert. Der *A. flagrans* Wildtyp wurde mit dem Konstrukt transformiert und positive Transformanten auf PDA mit Hygromycin selektiert. Das Wachstum der Transformanten auf ABTS-haltigem LNA führte zu einer Verfärbung des Mediums, was auf eine erfolgreiche Sekretion der Laccase durch die Fusion an NipA hindeutet.

Da noch nicht geklärt ist, ob die Effektorproteine in *A. flagrans* einem konventionellen oder unkonventionellen Sekretionsweg folgen und auch Proteine ohne Signalpeptid sekretiert werden können, sollte untersucht werden, ob NipA ohne Signalpeptid ebenfalls in der Lage ist, die Laccase C nach außen zu transportieren (Nielsen *et al.* 2019; Wernet *et al.* 2021a). Dazu wurde NipA ohne das vorhergesagte

Signalpeptid an die Laccase C fusioniert und in den *A. flagrans* Wildtyp transformiert. Zur Überprüfung der Sekretion wurden positive Transformanten auf PDA mit 1 mM ABTS überführt und für 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Erfolgreiche Sekretion wurde durch eine blaue Verfärbung des Mediums um die Hyphen visualisiert, welche durch die Oxidation des ABTS mittels der sekretierten Laccase verursacht wurde. Nach zwei Tagen war um die Hyphen der Transformanten mit dem Vollängenprotein eine blaue Verfärbung zu erkennen, während das Medium um die Hyphen der Kontrolle farblos blieb (Abbildung 8). Dies zeigt, dass das Signalpeptid für die NipA-Sekretion essenziell ist.

In einer vorausgegangenen Arbeit wurde gezeigt, dass mit GFP markiertes LifeAct eine bemerkenswerte Ähnlichkeit in den Verteilungsmustern zu NipA-mCherry in Form von beweglichen Patches aufweist, wodurch auf eine aktive Sekretion von NipA geschlossen wurde (Menzner 2020).

In *Magnaporthe oryzae* wurde gezeigt, dass SsoA, ein t-SNARE (*soluble N-ethyl,aleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), eine wichtige Rolle in der korrekten Sekretion Cytoplasmatischer Effektorproteine spielt (Giraldo *et al.* 2013). Lokalisationsstudien mit SsoA-GFP in *A. flagrans* zeigten eine spezifische Lokalisation von SsoA an den Membranen von Fallen. Eine Deletion von *ssoA* führte zu einer Verzögerung der Paralyse (Grünwald 2021). Um den Sekretionsprozess von NipA besser zu verstehen, wurden Ko-Lokalisationsstudien mit SsoA-GFP und NipA-mCherry durchgeführt. Hierfür wurde der Stamm sTG14, welcher GFP markiertes SsoA unter dem nativen *ssoA*-Promotor exprimiert, mit pJM16, zur Expression von NipA-mCherry, transformiert. Positive Transformanten wurden auf PDA mit Geneticin selektiert. Interessanterweise waren zu keinem Infektionszeitpunkt überlagerte Signale von SsoA-GFP und NipA-mCherry zu beobachten, was zeigt, dass die Vesikel-ähnlichen Strukturen, in denen NipA lokalisiert, zumindest in den Fallen ohne gefangene Nematoden nicht mit der Membran fusionieren. Sobald ein Nematode gefangen und penetriert wird, akkumuliert NipA an der Infektionsstelle. Dort ist ebenfalls keine Ko-Lokalisation mit SsoA zu beobachten, welches vor allem in leeren Fallen in der Membran lokalisiert und somit keine Rolle bei der Sekretion von NipA an der Infektionsstelle zu spielen scheint.

Die Sekretion von NipA in das Medium und die Ko-Lokalisation mit Aktin deuteten bereits auf eine aktive Sekretion von NipA hin (Menzner 2020). Die Abhängigkeit der Sekretion vom Signalpeptid und die fehlende Ko-Lokalisation mit

SsoA stellen neue Aspekte der Charakterisierung des Proteins und der unterliegenden Sekretionsprozesse dar.

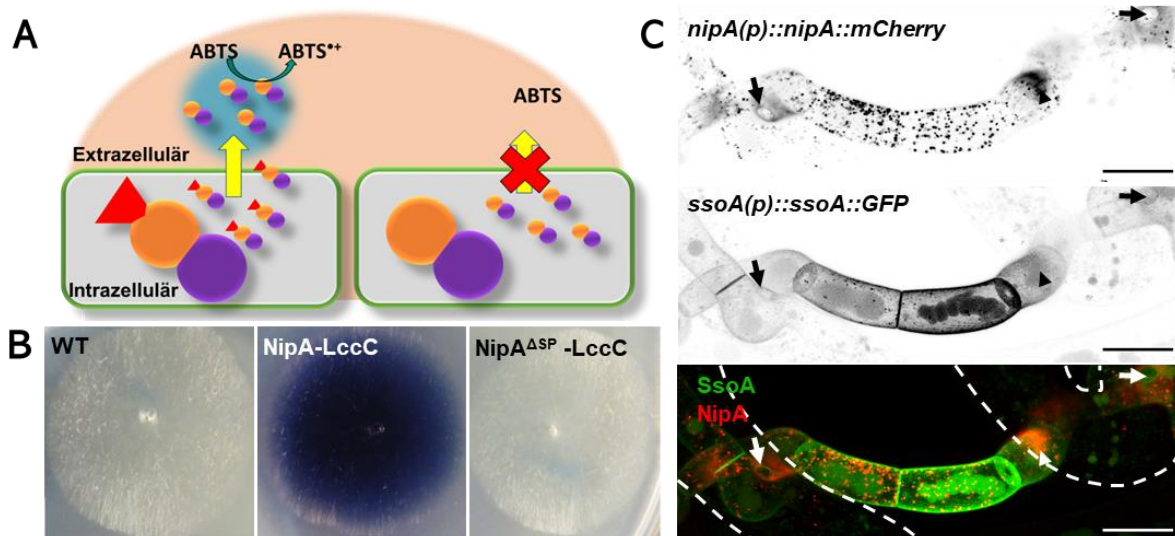


Abbildung 8: Sekretion von NipA. (A) Schematische Darstellung des Laccase-Reporterassays. Ein funktionelles Signalpeptid führt zur Sekretion der C-terminal fusionierten Laccase C. Die Laccase oxidiert das ABTS im Medium, wodurch eine blaue Verfärbung entsteht. Bei fehlendem Signalpeptid kann die Laccase nicht sekretiert werden und das Medium verfärbt sich nicht. (B) Laccase-Reporterassay: die Stämme wurden für 48 Stunden bei 28 °C auf PDA-Platten mit 1 mM ABTS inkubiert. Der *A. flagrans* Wildtyp produziert keine eigenen sekretierten Laccasen, welche das ABTS oxidieren. Die Fusion von Laccase C an NipA führt zur Sekretion der Laccase und damit zur Bildung des blauen Radikalions im Medium (Menzner 2020). Nach Deletion des Signalpeptids von NipA, wird keine Laccase mehr in das Medium abgegeben und es findet keine Farbveränderung mehr statt. (C) Ko-Lokalisation von NipA-mCherry und SsoA-GFP. SsoA-GFP lokalisiert spezifisch und gleichmäßig an den Membranen der Fallen von *A. flagrans*. NipA-mCherry hingegen akkumuliert an den Infektionsstellen. Die Pfeile deuten auf die Penetrationsstellen, der Pfeilkopf zeigt auf eine Akkumulation von NipA-mCherry. An diesen Stellen ist jeweils nur eine Anreicherung von NipA-mCherry, jedoch aber nicht von SsoA-GFP, zu sehen (Maßstabsbalken = 10 µm).

Virulenzfaktoren zeichnen sich unter anderem auch durch eine stark regulierte Genexpression aus. Um NipA eine Rolle während der Infektion nachzuweisen, wurden die Expressionslevel von *nipA* in vegetativem Myzel und in mit Nematoden induziertem Myzel mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) verglichen. Die Expression von *nipA* war im nicht-induzierten Myzel sehr niedrig ($4,3 \times 10^{-5} \pm 5,1 \times 10^{-6}$; $n = 3$), während sie im induzierten Myzel signifikant erhöht war ($4,5 \pm 0,2$; $n = 3$) (p -Wert $< 0,0001$, bestätigt durch einen zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test) (Menzner 2020).

Um den Zeitpunkt der Expression während der Interaktion weiter einzugrenzen, wurde ein Promotor-Reporter-Assay durchgeführt. Hierfür wurde der 1,7 kb stromaufwärts Bereich des *nipA*-Gens von genomischer DNA amplifiziert und mittels Gibson-Assembly in einen Vektor mit einem *h2b-mCherry* Fusionskonstrukt assembliert, um den Reporter unter Kontrolle des *nipA*-Promotors zu exprimieren. Das entstandene Plasmid wurde mit pJM10 bezeichnet. Zur Visualisierung aller Zellkerne

und einer Unterscheidung des Expressionsmusters wurde pJM10 in den sVW10-Stamm transformiert, welcher ein *h2b-GFP*-Reporterkonstrukt unter dem konstitutiven *h2b*-Promotor exprimiert, und auf Platten mit Hygromycin selektiert. Positive Transformanten wurden mit sJM15 bezeichnet. Mikroskopische Analysen positiver Transformanten zeigten nach Ko-Inkubation mit *C. elegans* zur Induktion der Fallenbildung, dass der *nipA*-Promotor ausschließlich im Bereich von Fallennetzwerken aktiv ist, während alle Zellkerne mit dem Kontrollkonstrukt fluoreszierten (Abbildung 9D). In nicht-induzierten Proben waren ausschließlich grün fluoreszierende Zellkerne erkennbar. Zur Quantifizierung der Expressionsstärke wurden im vegetativen sowie im induzierten Myzel die Zellkerne anhand der konstitutiven GFP-Expression lokalisiert. Die Zellkernbereiche wurden in ImageJ markiert und die Fluoreszenzstärke anhand des durchschnittlichen Grau-Wertes sowohl im GFP- als auch im mCherry-Kanal gemessen. Die Intensitäten wurden jeweils mit dem Hintergrund relativiert. Dadurch wurde für jeden Zellkern sowohl der GFP, als auch den mCherry Wert ermittelt. Der Vergleich der Werte im vegetativen Myzel zeigte, dass kaum bis kein mCherry-Signal zu messen war ($8,8 \pm 2,8$ SD), während die Intensität des GFP durchschnittlich $85,4 (\pm 16,6$ SD) betrug (arbiträre Einheit) (Abbildung 9B). Die Messung der Fluoreszenzintensitäten in den Fallennetzwerken des induzierten Myzels lag für die GFP-Kontrolle bei $81 (\pm 24,4$ SD) und für die *nipA*-abhängige *mCherry* Expression bei $357,2 (\pm 171,2$ SD) (Abbildung 9C). Die Signifikanz der Werte wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test berechnet (p-Wert (nicht-induziert) $<0,0001$; p-wert (induziert) $< 0,0001$).

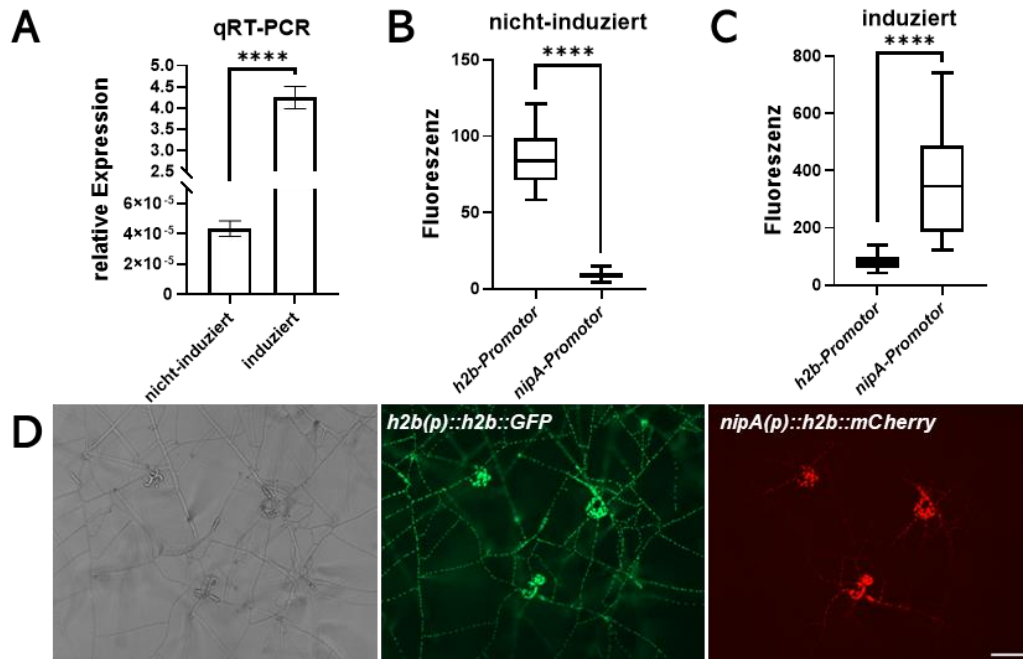


Abbildung 9: Expressionsanalysen des *nipA*-Gens. (A) q-RT-PCR Analyse der Expression von *nipA* in induziertem und nicht-induziertem Myzel. Für nicht-induziertes Myzel wurden 10⁸ Sporen auf Cellophan beschichtete LNM-Platten ausplattiert und für 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Für induzierte Proben wurden nach 24 Stunden *C. elegans* zu den ausgekeimten Sporen gegeben und für weitere 24 Stunden bei 28 °C ko-inkubiert. Die Signifikanz wurde durch einen zweiseitigen Student's t-Test bestimmt (t-test <0,0001). ****, P <0,0001 (sehr stark signifikanter Unterschied); ***, P <0,005 (stark signifikanter Unterschied); **, P <0,01 (sehr signifikanter Unterschied); *, P < 0,05 (signifikanter Unterschied); n.s., P >0,05 (nicht signifikanter Unterschied) (Menzner 2020) (B-C) Gemessene Fluoreszenzintensitäten im Promotor-Reporter-Assay. Die Zellkerne wurden anhand der konstitutiven grünen Fluoreszenz in ImageJ lokalisiert und die Grau-Werte der Zellkerne sowohl im GFP als auch im mCherry Kanal gemessen und mit dem Hintergrund relativiert. Die Signifikanz der Werte wurde mit einem ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test berechnet. (B) Messungen der Fluoreszenzintensitäten der Reporterkonstrukte unter dem konstitutiven *h2b*- und dem *nipA*-Promotor im nicht-induzierten Myzel. (C) Gemessene Fluoreszenzintensitäten der Reporterkonstrukte unter dem *h2b*- bzw. unter dem *nipA*-Promotor im induzierten Myzel. (D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen induzierten Myzels von sJM15. Die Zellkerne im *h2b(p)::h2b::GFP* Kontrollkonstrukt exprimierenden Stamm sind im gesamten Myzel zu sehen, während die Expression des H2B-mCherry Konstrukts unter dem *nipA*-Promotor auf die Fallennetzwerke beschränkt ist (Maßstabsbalken = 10 µm).

2.3 *NipA* lokalisiert an der Infektionsstelle

Die Lokalisierung von Effektorproteinen kann Aufschluss über den Wirkungsort und die zeitliche Expression geben. Hierzu wurde, in einer vorausgegangenen Arbeit, *NipA* C-terminal an GFP oder mCherry fusioniert. Das Konstrukt wurde dem nativen *nipA*-Promotor exprimiert (sJM05). Die Reporterstämme wurden auf dünnen LNA-Kissen auf Objektträgern angeimpft und 24 Stunden zusammen mit *C. elegans* bei 28 °C ko-inkubiert. Erste Beobachtungen der *NipA*-GFP Lokalisation zeigten die spezifische Lokalisation an den Innenseiten leerer Fallen, wobei das Signal in bereits infizierten Nematoden an den Infektionsstellen akkumulierte. Die Ko-Lokalisation mit *CyrA* zeigte eine distinkte Verteilung beider Proteine (Abbildung 10C) (Menzner 2020).

Um ein besseres Verständnis für die Lokalisierung und ihre Veränderung während der Infektion zubekommen, wurden nun Langzeitaufnahmen des sJM05 Stammes angefertigt. Die Fallenbildung wurde mit einem Konfokalmikroskop über einen Zeitraum von 5 Stunden, in einem Intervall von 2 Minuten, aufgenommen. Eine Falle besteht in der Regel aus drei, durch Septen getrennte, Kompartimenten. Die Fallen sind bereits während ihrer Entstehung an einem größeren Hyphendurchmesser und ihrer Abzweigung von der Haupthyphe erkennbar.

Die Beobachtung einer sich formenden Falle zeigte, dass die Fluoreszenz von NipA-GFP in der Falle mit fortschreitender Fallenbildung zunimmt, allerdings nicht im umliegenden Myzel. Vor dem Schließen des ersten Fallenrings ist das NipA-GFP-Signal deutlich erkennbar. Nachdem die Falle gebildet ist, nimmt das Fluoreszenzsignal zu und lokalisiert in kleinen dynamischen, Vesikel-artigen Punkten, welche an der Innenseite der leeren Falle akkumulieren (Abbildung 10A). Sobald ein Nematode in der Falle gefangen ist, ist eine Veränderung des Signals zu erkennen. Dabei bewegt sich NipA von der Innenseite der Falle zu der Stelle, an der der meiste Kontakt zum Nematoden besteht und akkumuliert plattenförmig. Nach etwa 45 Minuten bildet sich ein porenförmiger Ring an der Stelle, an welcher der Pilz schließlich in den Nematoden mit einer Penetrationshyphe einwächst (Abbildung 10B). Nach der Penetration des Nematoden bildet sich eine Infektionsblase, in welcher andere Effektoren, wie CyrA, akkumulieren (Wernet *et al.* 2021a). NipA bleibt jedoch im äußeren Penetrationsbereich zurück (Abbildung 10C). Die Langzeitbeobachtung der Lokalisationen beider Effektor-Proteine während der Infektion könnte weitere Aufschlüsse über den zeitlichen Ablauf der Infektion liefern.

Durch die Langzeitbeobachtung der NipA-GFP Lokalisation konnte gezeigt werden, dass NipA aktiv an einen anderen Bereich in der Fallenhyphe transportiert wird, um dort seine Funktion auszuüben. Die Mechanismen hinter der Bestimmung des Penetrationsortes bilden eine weitere interessante Forschungsrichtung. Des Weiteren deutet die Beobachtung der frühen Lokalisierung von NipA-GFP an der späteren Penetrationsstelle, darauf hin, dass NipA eine Rolle in der frühen Infektion spielt.

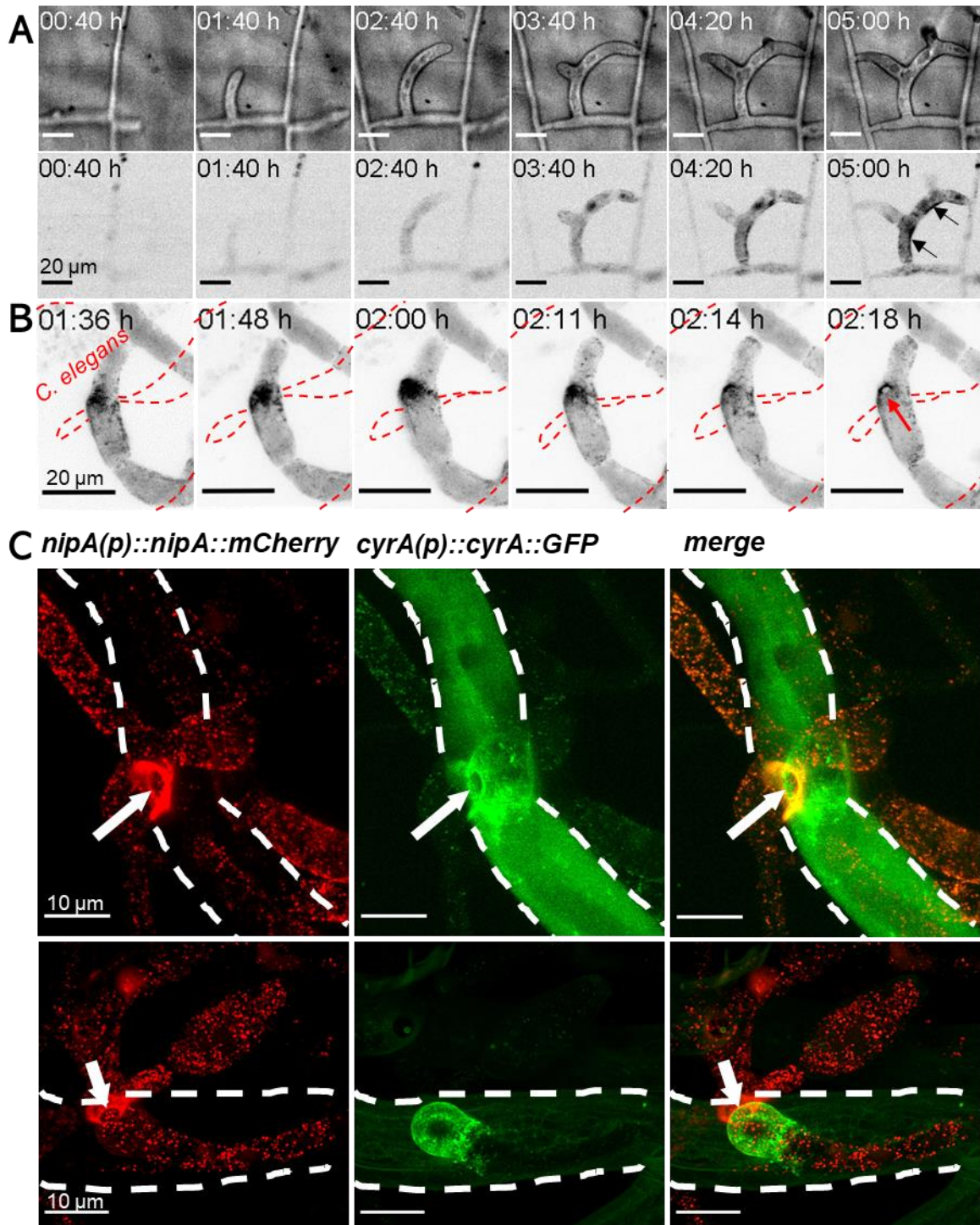


Abbildung 10: Lokalisation von NipA während der Fallenbildung und Infektion von *C. elegans*. Die Reporterstämme wurden für 24 Stunden bei 28 °C mit *C. elegans* zur Falleninduktion auf dünnen LNA-Kissen ko-inkubiert. **(A)** Beobachtung eines sich bildenden Fallennetzwerks über einen Zeitraum von 5 Stunden unter einem Konfokalmikroskop. Aufnahmen erfolgten alle 2 Minuten im DIC- (oben) und GFP-Kanal (unten). Zu Beginn ist kein Signal des NipA-GFP-Fusionsproteins zu sehen. Das GFP-Signal nimmt jedoch mit fortschreitender Entwicklung der Falle zu. Nach dem Ringschluss ist das Signal am stärksten und lokalisiert an der Innenseite der leeren Falle (Pfeile). **(B)** Beobachtung der Lokalisation von NipA-GFP während der Infektion von *C. elegans*. Die Aufnahmen erfolgten über 4 Stunden in einem Intervall von 1,6 Minuten im GFP-Kanal eines Konfokalmikroskops mit AiryScan. Die Akkumulation von NipA-GFP an der Penetrationsstelle beginnt bereits 1,5 Stunden nachdem der Nematode (gestichelte Linie) gefangen wurde. NipA-GFP lokalisiert zunächst plattenförmig an einer Stelle. Nach 2 Stunden 18 Minuten hat sich ein porenförmiger Ring gebildet (roter Pfeil). **(C)** Ko-Lokalisierung von NipA-mCherry und CyrA-GFP im *A. flagrans* Wildtypstamm. NipA-mCherry lokalisiert nach der Penetration im äußeren

Bereich der Eintrittsstelle, während sich die Infektionsblase bildet, in welcher CyrA-GFP akkumuliert (Menzner 2020).

Um die Rolle des Signalpeptids an der Lokalisation zu untersuchen, wurde NipA sowohl mit (sJM03 (Menzner 2020)) als auch ohne Signalpeptid (AS1-16) (sJM45) sowie das Signalpeptid allein (sJM11) an GFP fusioniert. Die Expression erfolgte unter dem konstitutiven *oliC*-Promotor. Die Lokalisation des SP^{ΔNipA}-GFP entsprach der des vollständigen NipA-Proteins. Die Deletion des SP führte zu einer gleichmäßigen Verteilung des Signals im Cytoplasma des gesamten Myzels. Durch die konstitutive Expression, war das NipA-GFP Signal auch im vegetativen Myzel erkennbar, jedoch konnte in keinem Stamm Signalansammlungen in besonderen Strukturen, wie im Falle von CyrA (Wernet *et al.* 2021a), festgestellt werden. Während der Infektion lokalisierte NipA-GFP, wie unter dem nativen Promotor, an den Infektionsstellen. Die spezifische Akkumulation an den Penetrationsstellen ohne das Signalpeptid blieb jedoch aus (Abbildung 11).

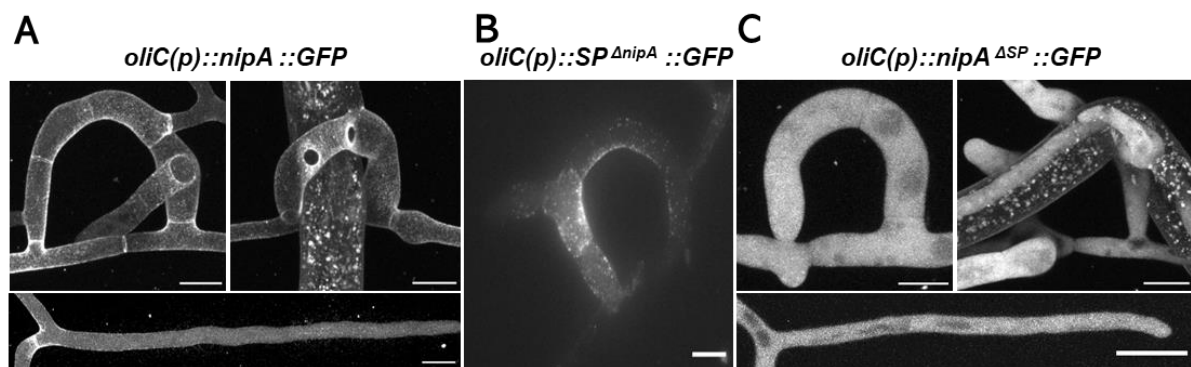


Abbildung 11: Lokalisation von NipA mit und ohne Signalpeptid. (A) NipA lokalisiert in dynamischen Vesikeln an der Innenseite leerer Fallen. Während der Infektion akkumuliert das Signal an der Infektionsstelle. Unter dem konstitutiven *oliC*-Promotor ist Signal auch im vegetativen Myzel sichtbar. **(B)** Das Signalpeptid allein fusioniert an GFP ist in der Lage die Lokalisation des vollständigen NipA-Proteins darzustellen. **(C)** Deletion des Signalpeptids jedoch führt zu einer gleichmäßigen Verteilung des Signals im Cytoplasma des gesamten Myzels (Maßstabsbalken = 10 µm).

2.4 Deletion von *nipA* führt zu einer verzögerten Penetration

Zur Untersuchung der Funktion von NipA während der Infektion wurde das Gen mittels homologer Rekombination durch eine Hygromycin-Resistenz-Kassette ersetzt (sJM01 (Menzner 2020)). Der Deletionsstamm war weiterhin in der Lage Nematoden zu fangen, zu penetrieren und zu verdauen. Da die Lokalisationsstudien darauf hinweisen, dass NipA eine Rolle in den frühen Stadien der Infektion spielt, musste für die Evaluation eines Phänotyps der *nipA*-Mutante ein Assay entwickelt werden, das

Rückschlüsse auf den Erfolg bzw. den zeitlichen Verlauf der Penetration erlaubt. Dazu wurde im Verlauf dieser Arbeit der *nipA*-Deletionsstamm, sowie der Wildtyp zur Kontrolle, mit pNH94, zur Lokalisation von CyrA-mCherry in der Infektionsblase, transformiert, um den Zeitpunkt des Auftretens der Infektionsblase visualisieren zu können. Transformanten wurden auf PDA-Platten mit Geneticin selektiert. Der *cyrA*-mCherry exprimierende *nipA*-Deletionsstamm wurde mit sJM44 und die Wildtypkontrolle mit sJM43 bezeichnet. Zur Untersuchung des Infektionsprozesses wurden mikroskopische Langzeitaufnahmen beider Stämme angefertigt. Hierzu wurden Sporen der Stämme auf dünne LNA-Kissen angeimpft und zusammen mit einer gemischten Population *C. elegans*, zur Induktion der Fallenbildung, für 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Nicht gefangene Nematoden wurden nach der Inkubation mit Wasser abgewaschen. Positionen mit Fallen wurden ausgewählt und gespeichert. Kurz vor Beginn der Aufnahme wurden synchronisierte, junge adulte Nematoden auf die Proben gegeben. Die Bestimmung der Penetrationszeit erfolgte vom Zeitpunkt des Kontaktes des Nematoden mit der Falle bis zur Akkumulation von CyrA-mCherry in der Infektionsblase (Abbildung 12A). Die durchschnittliche Penetrationszeit des Wildtyps betrug 101 Minuten (± 36 SD), während die Penetration in der Deletionsmutante nach 138 Minuten (± 52 SD) eintrat. Die Signifikanz der Messungen wurde mittels eines ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test bestimmt (P-Wert = 0,0007) (Abbildung 12B). Dies bestärkt die Hypothese, dass NipA eine wichtige Rolle in den frühen Stadien der Interaktion spielt.

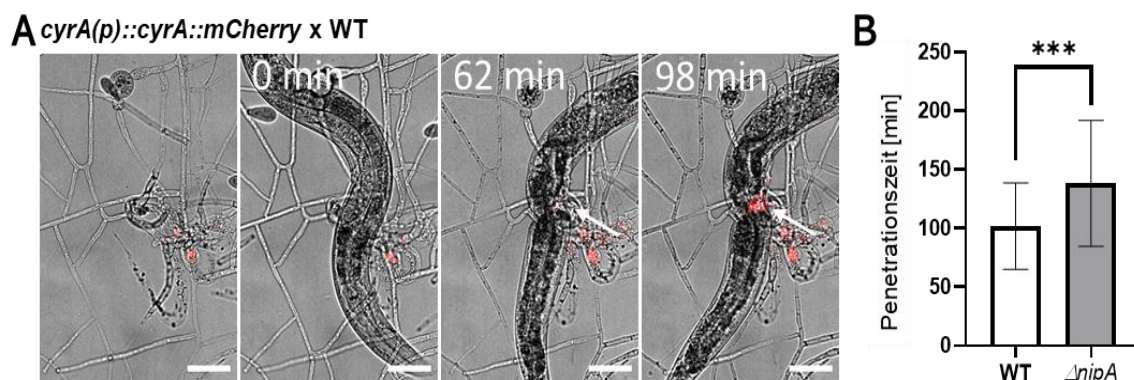


Abbildung 12: Penetrationsassay der *nipA*-Mutante. (A) Exemplarische Aufnahme einer Penetrationszeitmessung im Wildtyp-Hintergrund. Die Zeitmessung beginnt, sobald ein Nematode in einer Falle gefangen ist und wird beendet, sobald eine Akkumulation von CyrA-mCherry innerhalb der Nematoden erkennbar ist (Pfeil) (Maßstabsbalken = 50 μ m). **(B)** Penetrationsassay der *nipA*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Signifikanz wurde durch einen ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test mit GraphPad berechnet (P = 0,0007). ****, P <0,0001 (sehr stark

signifikanter Unterschied); ***, P <0,005 (stark signifikanter Unterschied); **, P <0,01 (sehr signifikanter Unterschied); *, P < 0,05 (signifikanter Unterschied); n.s., P >0,05 (nicht signifikanter Unterschied).

2.5 Heterolog exprimiertes *nipA* in *C. elegans* führt zur Akkumulation in den Coelomocyten

Die heterologe Expression von pilzlichen Genen im Wirt kann Aufschluss über die Funktion des Proteins liefern. Zur Expression in *C. elegans* wurde *nipA* unter verschiedenen Nematoden-spezifischen Promotoren im Wildtyp Stamm N2 und im Coelomocyten defizienten Stamm GS2478 als extrachromosomales Array exprimiert (Tabelle 1). *C. elegans* ist ein komplexer mehrzelliger Organismus, dessen Gene Gewebe- und Stadien-spezifisch exprimiert werden. Die Wahl eines passenden Promotors für die heterologe Expression von pilzlichen Genen erweist sich damit als schwierig. Weiter ist zu beachten, dass nicht bekannt ist, in welche Gewebe der Virulenzfaktor eindringt und seine Funktion erfüllt.

Tabelle 1: Liste der unterschiedlichen Varianten der *nipA*-Expression in *C. elegans*.

Stammbezeichnung	Promotor	Gewebe	Signalpeptid	Fluorophor	Stamm
KIT40	<i>eft-3</i>	Ubiquitär	+	mScarlet	N2
KIT42	<i>eft-3</i>	Ubiquitär	+	mScarlet	GS2478
KIT44	<i>dpy-7</i>	Epidermis	+	mScarlet	N2
KIT45	<i>col-19</i>	Epidermis	+	mScarlet	N2
KIT48	<i>col-19</i>	Epidermis	-	mScarlet	N2
KIT49	<i>col-19</i>	Epidermis	+	-	N2
KIT51	<i>col-19</i>	Epidermis	+	mScarlet	GS2478

Da *A. flagrans* zunächst die Kutikula und Epidermis durchdringen muss, und NipA eine Lokalisation an der äußeren Infektionsstelle aufweist, sind diese Gewebe gute Kandidaten für Expressionsanalysen mit NipA. Zusätzlich stehen auch ubiquitäre Promotoren zur Verfügung, welche allerdings, wenn sie als extrachromosomales Array exprimiert werden, häufig zu ungleichmäßigen, mosaikförmigen Expressionsmustern führen, wodurch die Analysen erschwert werden können.

Während der Infektion werden normalerweise die Virulenzfaktoren im Pilz prozessiert und ohne das Signalpeptid in den Wirt sekretiert. Die Expression von *nipA* mit Signalpeptid in *C. elegans* soll zur Sekretion aus Nematodenzellen und zur Lokalisation im Zielgewebe führen. Proteine, die in das Pseudocoel von *C. elegans*

gelangen, wie beispielsweise mit einem Signalpeptid versehenes GFP, werden unspezifisch von so genannten Coelomocyten mittels Endocytose aufgenommen. Coelomocyten sind Makrophagen-ähnliche Zellen. Im Gegensatz zu Makrophagen sind sie jedoch nicht zu Phagozytose befähigt, können aber durch unspezifische Endozytose Makromoleküle aufnehmen und abbauen (Ewbank 2002; Fares und Grant 2002). Um auszuschließen, dass NipA im Pseudocoel von den Coelomocyten aufgenommen und abgebaut wird, wurden die Fusionsproteine zusätzlich in einem Coelomocyten-defizienten Stamm exprimiert.

Ein NipA-mScarlet Fusionsprotein, mit dem NipA-Signalpeptid, wurde zunächst unter der Kontrolle des *eft-3* (*elongation factor 1-alpha*) - Promotors exprimiert, welches zur ubiquitären Expression in den Nematoden, während allen Entwicklungsstadien, führte (pJM85). Der N2 Wildtypstamm wurde mit pJM85 mittels Mikroinjektion in die Gonaden junger adulter Tiere transformiert. Erfolgreich transformierte Nachkommen wurden anhand der Expression von GFP im Pharynx, durch Ko-Injektion mit dem *myo2P::GFP* Markerplasmid, selektiert. Der Stamm erhielt die Bezeichnung KIT40. Als Kontrolle wurde mScarlet allein und ohne Signalpeptid unter demselben Promotor (pJM86) ebenfalls mit dem *myo2P::GFP* Marker-Konstrukt in den N2 Wildtypstamm ko-transformiert und erhielt den Namen KIT39. Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigen, dass das mScarlet des Kontrollstamms gleichmäßig im Nematoden verteilt ist, während in Nematoden mit NipA-mScarlet Akkumulationen in spezifischen Strukturen im Pseudocoel, beobachtet wurden, die der Lokalisation von Coelomocyten entsprechen könnte (Abbildung 13A und C).

Zur Identifizierung des Gewebes, in welchen die NipA-mScarlet Ansammlungen beobachtet wurden, wurde GFP unter dem *unc-122*-Promotor (pNH79), zur Expression in den Coelomocyten, zusammen mit pJM85 (*eft-3(p)::nipA::mScarlet*) in den N2 Wildtyp injiziert. Mikroskopische Aufnahmen bestätigten, dass NipA-mScarlet zusammen mit dem freien GFP in den Coelomocyten lokalisiert. Das Signal von NipA-mScarlet lokalisiert in mehreren kleineren, runden Ansammlungen innerhalb der Coelomocyten, bei denen es sich um die Vakuolen handeln könnte. Dies deutet auf eine Aufnahme und den Abbau von NipA-mCherry in den Coelomocyten hin (Abbildung 13C und D).

Um die erfolgreiche Entwicklung der NipA exprimierenden Nematoden zu quantifizieren, wurden ein Entwicklungsassay angewendet (Harlow *et al.* 2016). Hierbei wurden junge adulte Tiere der transformierten Stämme auf eine frische NGM-

Platte mit OP50-Rasen überführt und nach 4 Stunden bei 20 °C wieder entfernt. Die gelegten Eier wurden nach 24 h bei 20°C auf geschlüpfte Larven hin überprüft. Es zeigte sich, dass 15,47 % (n = 84) der Larven des ubiquitär NipA-mScarlet exprimierenden Stamms Körperdeformationen aufwiesen (Abbildung 13E). In der Kontrolle zeigten lediglich 3,48 % (n = 86) der Larven einen ähnlichen Phänotyp.

Da die in die Coelomocyten aufgenommenen Proteine abgebaut werden, ist es möglich, dass dadurch der Effekt von NipA auf die Nematoden verringert wird. Um den Abbau von NipA in den Coelomocyten zu verringern und damit den Effekt von NipA zu verstärken, wurde pJM85 im GS2478 Stamm, als extrachromosomales Array, exprimiert. Der Stamm erhielt den Namen KIT42. In GS2478 ist die Aufnahme von Proteinen aus dem Pseudocoel in die Coelomocyten, durch die Deletion des *cup-8* (*Coelomocyte Uptake-defective*) Gens, verringert, aber nicht komplett verhindert (Fares und Greenwald 2001). Trotz der verringerten Aufnahmefähigkeit der Coelomocyten, konnte das NipA-mScarlet Signal weiter in Coelomocyten-ähnlichen Strukturen beobachtet werden. Als Kontrolle wurde pJM86 im GS2478 Stamm exprimiert und mit KIT41 bezeichnet. Das mScarlet Signal war in der Kontrolle ähnlich gleichmäßig verteilt wie in der N2-Kontrolle. Das Entwicklungsassay zeigte, dass 74 % der gelegten Eier des NipA-mScarlet exprimierenden Stamms nicht schlüpfen konnten. Von den geschlüpften Larven zeigten 4 % Deformationen, vergleichbar mit den Beobachteten deformierten Larven im Wildtyphintergrund. Auch in der Kontrolle konnte eine verringerte Schlüpftrate festgestellt werden. Im Kontroll-Stamm konnten lediglich 22 % der Eier schlüpfen. Die niedrigere Schlüpftrate deutet auf eine erhöhte Sensitivität des GS2478-Stamms auf die Expression von Fluorophoren, wie mScarlet, hin.

Die Ergebnisse zeigen, dass NipA einen Einfluss auf die Entwicklung der Larven ausüben kann. NipA-mScarlet exprimierende Larven zeigen ein erhöhtes Auftreten von deformierten Larven, was auf einen negativen Einfluss von der NipA-Expression auf die Nematoden und somit eine Funktion hinweist.

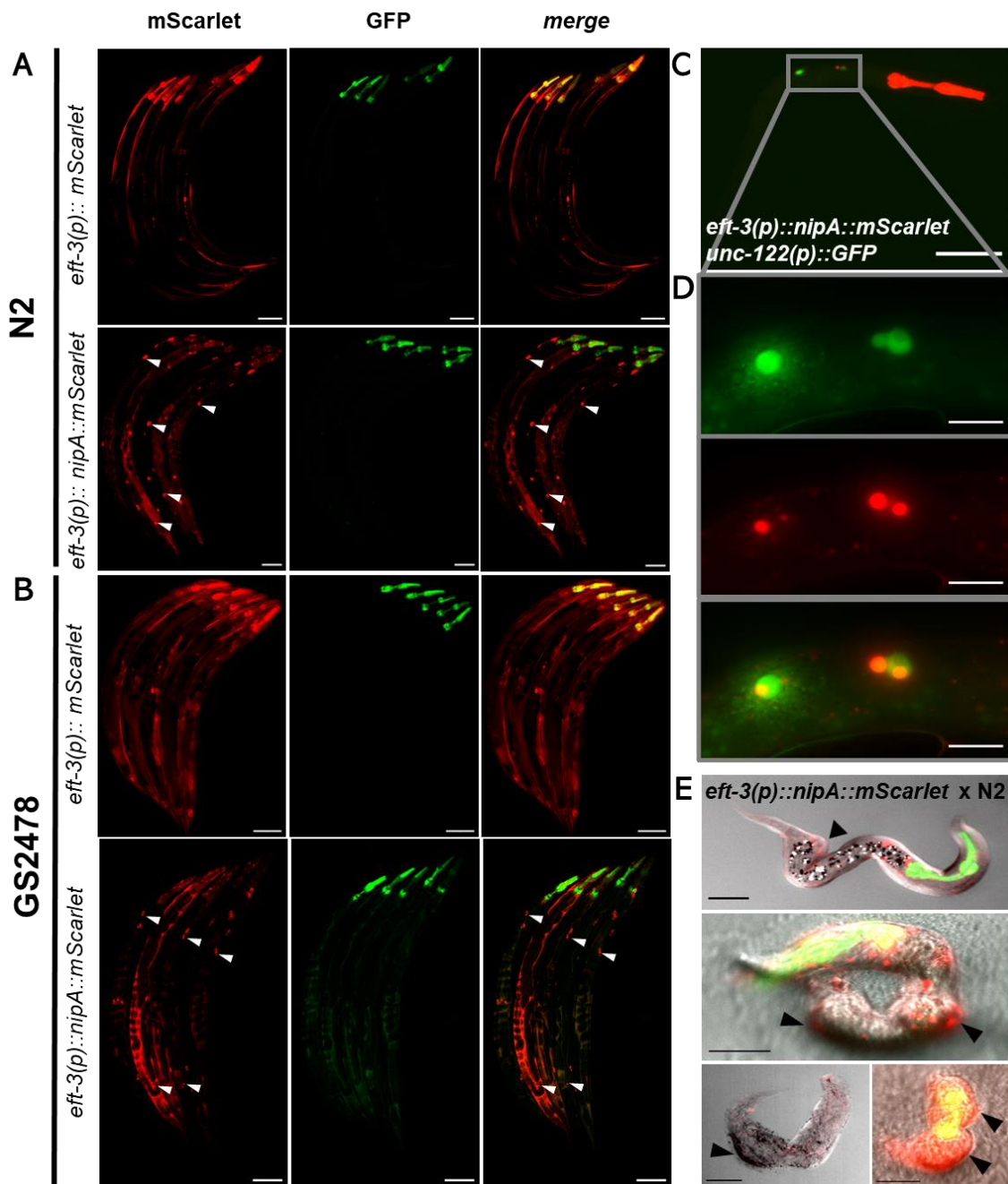


Abbildung 13: Expression von *nipA-mScarlet* unter dem *eft-3*-Promotor in *C. elegans*. (A-B) Die Stämme KIT40 und KIT42 sowie die entsprechenden Kontrollstämme KIT39 und KIT41 wurden im kleinen Maßstab synchronisiert und für sechs Tage bei 20 °C auf NGM-Platten mit OP50 Rasen inkubiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden die Nematoden in einen Tropfen 0,25 mM Natriumazid auf einem Agar-Kissen einzeln überführt. NipA-mScarlet lokalisiert sowohl im Wildtyp-Hintergrund als auch im Coelomocyten-defizienten GS2478 Hintergrund in den Coelomocyten (Pfeilköpfe). In den Kontrollen ist die Fluoreszenz hauptsächlich in den Muskeln und der Epidermis sichtbar. *myo-2(p)::GFP*-Expression führt zu einer grünen Fluoreszenz im Pharynx. (Maßstabsbalken = 100 μm). (C+D) Ko-Lokalisation von NipA-mScarlet unter Kontrolle des ubiquitären *eft-3*-Promotors im N2 Wildtyp Hintergrund und freiem GFP, exprimiert unter der Kontrolle des *unc-112*-Promotors in einer L2-Larve. Das freie GFP wird im Pseudocoel von den Coelomocyten aufgenommen und abgebaut. Das NipA-mScarlet Signal ko-lokalisiert mit dem des GFP, was auf eine gemeinsame Lokalisation in den Coelomocyten schließen lässt (Maßstabsbalken = 50 μm). (D) Vergrößerung des Coelomocyten Bereichs aus (C). Überlagerungen des GFP und mScarlet Signals lassen auf eine gemeinsame Lokalisation in den Coelomocyten schließen (Maßstabsbalken = 10 μm). (E) Deformierte Larven des KIT40 Stamms, welcher NipA-mScarlet unter dem konstitutiven, epidermalen *dpy-7*-Promotor exprimiert. Pfeilköpfe zeigen auf besonders ausgeprägte Deformationen (Maßstabsbalken = 20 μm).

2.6 Epidermal exprimiertes NipA führt zu Blasenbildung in adulten Nematoden

Zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien häuten sich die Nematoden, wobei sie ihre alte Kutikula durch eine neue ersetzen, welche von der Epidermis abgesondert wird. Die Zusammensetzung der Kollagene und die Struktur der Kutikula verändert sich in jedem Lebensstadium.

Da die Kutikula und die Epidermis des Nematoden die ersten Barrieren für den Pilz während der Infektion darstellen wurde *nipA-mScarlet* unter dem epidermalen *dpy-7 (dumpy)*-Promotor extrachromosomal im N2 Wildtyp-hintergrund exprimiert (KIT44). Der *dpy-7*-Promotor führt bereits in Embryonen zur epidermalen Expression. Als Kontrolle wurde *mScarlet* unter demselben Promotor in N2 exprimiert (KIT52). Die Fluoreszenz positiver Transformanten konnte bereits in den Eiern detektiert werden. Ein Entwicklungsassay zeigte auch hier eine verringerte Schlüpftrate sowie das Auftreten von deformierten Larven in dem *nipA* exprimierenden Stamm. Die Quantifizierung ergab, dass 17,89 % der geschlüpften Larven (n = 95) eine Deformation aufwiesen. In der Kontrolle zeigten lediglich 5,4 % der Larven eine Deformation.

Die verringerte Schlüpftrate der epidermal *nipA-mScarlet* exprimierenden Nematoden, so wie die veränderte Morphologie einiger Larven der konstitutiven Expression von *nipA-mScarlet*, gibt Hinweise auf eine schädliche Wirkung von NipA auf die Entwicklung der Nematoden, mit besonderer Wirkung auf die epidermale Entwicklung.

Um einen direkten Einfluss von NipA auf die äußeren Schichten von *C. elegans* zu untersuchen, wurde NipA mit Signalpeptid (pJM46) und ohne Signalpeptid (pJM36) C-terminal an mScarlet fusioniert und unter dem *col-19*-Promotor (*collagen-19*) im N2 Wildtyp und in GS2478 exprimiert. Der N2 Wildtypstamm, der mit pJM46 transformiert wurde, erhielt den Namen KIT45. GS2478 Nematoden, die mit pJM46 transformiert wurden, erhielten den Namen KIT50. Der N2 Wildtypstamm, der pJM36 exprimiert, erhielt den Namen KIT48. Als Kontrolle wurde mScarlet ohne Signalpeptid unter dem *col-19*-Promotor exprimiert (pJM72). Der mit pJM72 transformierte N2 Wildtypstamm wurde mit KIT46 und der transformierte GS2478 Stamm als KIT51, bezeichnet. Der *col-19*-Promotor führt zur epidermalen Expression in adulten Nematoden, wodurch der Effekt von NipA nicht mehr durch Häutungen beeinflusst wird. Zwei bis drei Tage nach Erreichen des adulten Stadiums entwickelten einige Nematoden der *nipA-mScarlet*

exprimierenden Stämme (KIT45; KIT50) stark leuchtende, blasenförmige Strukturen über den gesamten Körper verteilt (Abbildung 14A). Der Blister (*Bli*; *BLIstered*) Phänotyp wird in der Literatur mit Defekten der Kollagenbiosynthese, der Mutation von Kollagengenen selbst und Deletionen bestimmter Komponenten der *fibrous organelles* (FOs) in der Epidermis selbst in Verbindung gebracht (Bosher *et al.* 2003; Johnstone 2000; Peters *et al.* 1991). Demnach können diese Blasenstrukturen sowohl epidermalen als auch kutikulären Ursprungs sein. Das Öffnen der Blasen der NipA-mScarlet exprimierenden Nematoden, mit einer Nadel, führte zum Auslaufen einer fluoreszenten Flüssigkeit in das Medium, während der Rest des Nematoden intakt blieb (Abbildung 14B). Zur Überprüfung eines Zusammenhangs des Phänotyps und der Expression von NipA zusammen mit mScarlet, wurde das vollständige NipA-Protein zusätzlich ohne mScarlet unter dem *col-19* Promotor im N2 Wildtyp exprimiert. Der transformierte Stamm erhielt den Namen KIT49. In diesem Stamm war ebenfalls die Formation von Blasen in der Außenhülle zu beobachten (Abbildung 14C). Die Blasenbildung setzte hier allerdings etwa sieben Tage später ein als in den Stämmen, die das NipA-mScarlet Fusionsprotein exprimieren. Hier traten die ersten Blasen bereits nach drei Tagen auf. Zur Untersuchung einer Beteiligung des Signalpeptids an dem beobachteten Phänotyp wurde NipA-mScarlet ohne Signalpeptid unter dem *col-19* Promotor exprimiert (KIT48) und auf Blasenbildung untersucht. Erst nach 12 Tagen im adulten Stadium konnten hier Blasen an einzelnen Nematoden beobachtet werden. Unterschiede bei der Häufigkeit und dem Auftreten von Blasen können auch durch die Expression als extrachromosomales Array mit verschiedenen Expressionsstärken und Mustern erklärt werden. Die Nematoden der N2 und GS2478 Kontroll-Stämme, die lediglich mScarlet exprimierten, zeigten auch über längere Zeiträume keine Blasenbildung (Abbildung 14D).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Außenhülle eines *col-19(p)::nipA::mScarlet* exprimierenden Nematoden mit Blase zeigten, dass die Blasen sich ausschließlich auf die ventralen und dorsalen Seiten des Nematoden beschränken und durch die Alae getrennt werden. Blasen über den lateralen *seam cells*, beziehungsweise unter den Alae, konnten nicht beobachtet werden. Die Struktur der Annuli und Alae war durch die *nipA* Expression und Blasenbildung nicht verändert (Abbildung 14E).

Die Bildung von Blasen in der Kutikula oder Epidermis deutet auf eine Rolle von NipA hin, welche die Integrität der äußeren Barriere des Nematoden stört. Das

Auftreten von Blasen in Nematoden die NipA-mScarlet ohne Signalpeptid exprimieren, zeigt, dass der Phänotyp unabhängig von der Präsenz des NipA-Signalpeptids ist, wodurch die Hypothese einer Funktion von NipA in der Epidermis gestützt wird. Ebenso zeigt die Blasenbildung in nur NipA exprimierenden Nematoden, dass die Fusion mit mScarlet nicht notwendig für die Blasenbildung ist, diese aber möglicherweise verstärken kann.

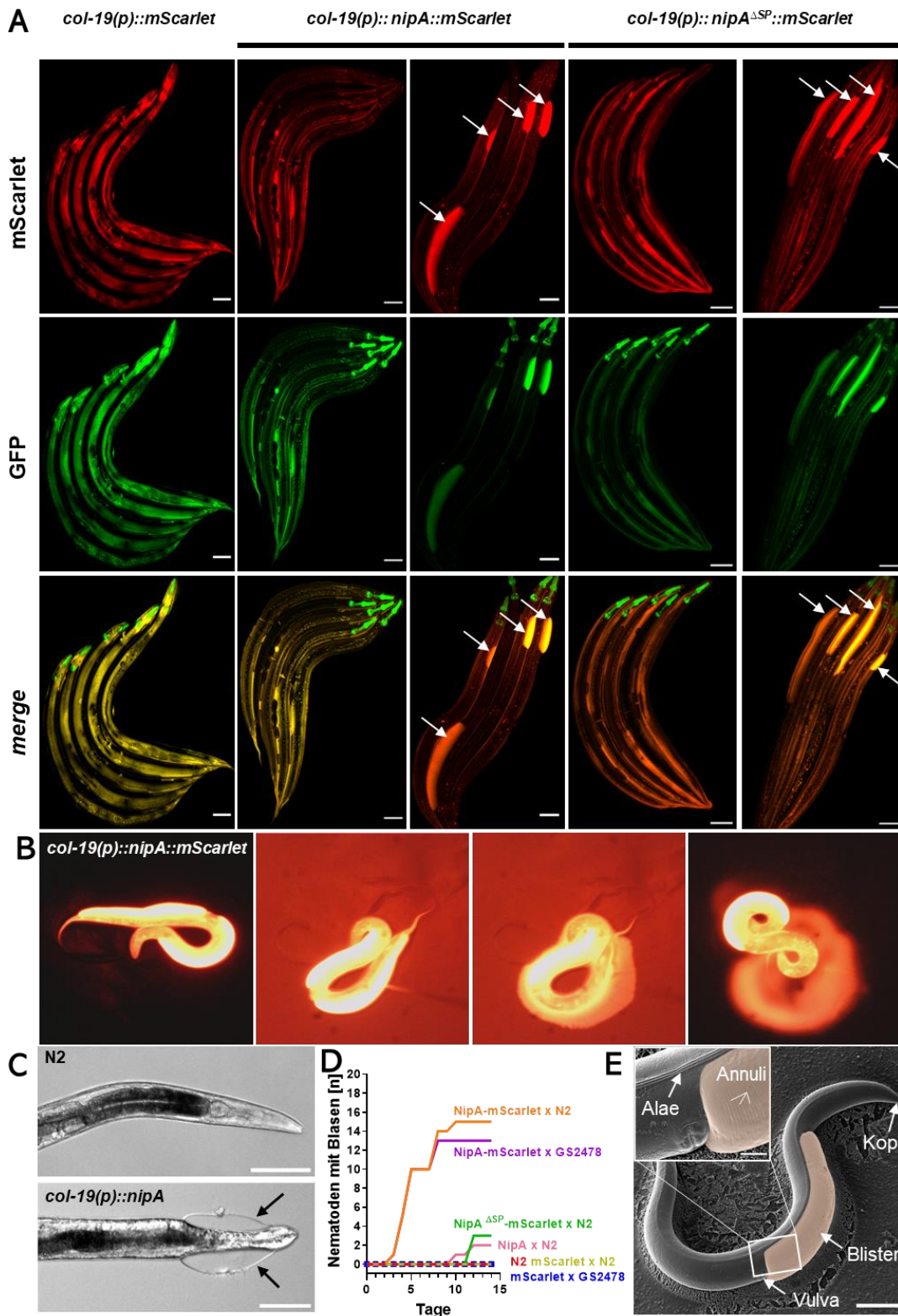


Abbildung 14: Expression von *nipA* in *C. elegans* unter dem epidermalen *col-19*-Promotor. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von adulten, synchronisierten Nematoden, der Stämme KIT46, KIT45 und KIT48. Die Fluoreszenz ist in allen Stämmen gleichmäßig in der Kutikula oder Epidermis verteilt. Einige Nematoden der Stämme KIT45 und KIT48 haben bereits Blasen ausgebildet, welche stark rot fluoreszieren. Auch ohne Signalpeptid ist die Bildung von Blasen zu beobachten. Im GFP-Kanal wird neben dem Pharynxmarker (*myo-2(p)::GFP*) weiteres Signal im Nematodenkörper detektiert, welches vermutlich auf das starke mScarlet Signal und somit auf *blead-through* zurückzuführen ist. (B) Bildausschnitte eines Videos in dem eine Blase händisch mit einer Injektionsnadel geöffnet wird. Die Blase ist mit einer fluoreszenten Flüssigkeit, womöglich dem NipA-mScarlet Fusionsprotein, gefüllt.

Durch das Aufstechen gelangt die Flüssigkeit in das Medium und färbt dieses an. **(C)** Hellfeldmikroskopische Aufnahmen eines *nipA* exprimierenden Nematoden (unten) und des Wildtyps N2 (oben). Die Expression von *nipA* unter dem *col-19* Promotor reicht aus, um die Blasenbildung auszulösen. Die Pfeile zeigen auf Blasen im *nipA* exprimierenden Stamm. **(D)** Quantifizierung des Blasenvorkommens in verschiedenen *nipA* exprimierenden Nematoden Stämmen. Die Stämme wurden synchronisiert und auf frische NGM-Platten überführt. 90 L4-Larven wurden anschließend auf NGM-Platten mit 0,5 mM FUDR überführt, um die Produktion von Nachkommen zu unterdrücken. Die Nematoden wurden für 14 Tage unter einem Stereomikroskop täglich auf Blasen untersucht. **(E)** Kryo-Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines *NipA-mScarlet* exprimierenden Nematoden des KIT45 Stamms. Die Nematoden wurden einzeln auf LNM-Platten überführt. Zur Fixierung der Proben wurde ein Agar-Stück mit Nematoden ausgeschnitten und auf einem Metall-Träger mit Eindeckmedium befestigt und anschließend in gefrorenen Stickstoff getaucht. Anschließend wurde die Probe mit einer feinen Schicht Platin überzogen und im Rasterelektronenmikroskop mit einem Arbeitsabstand von 8,3 mm und einer Beschleunigungsspannung von 5 kV untersucht. Die Blase befindet sich auf der ventralen Seite und wird von den Alae und der Vulva begrenzt. Annuli sind weiterhin auf der Oberfläche der Blase zu erkennen. Maßstabsbalken = 100 µm

2.7 NipA stört die Integrität der Kutikula

Durch die in der Literatur bekannten Zusammenhänge bestimmter Gene mit dem Blister Phänotyp können möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktionsweise von NipA gezogen werden. Die Expression des antimikrobiellen Proteins NLP-29 (*neuropeptide like protein*) wird durch Verletzung der Epidermis und bestimmter kutikulärer Bestandteile hochreguliert, um Abwehrmechanismen des Wurms zu aktivieren. Auch bei der Infektion durch *A. flagrans* wurde gezeigt, dass *nlp-29* hochreguliert wird (Pop *et al.*, 2023, in revision). *nlp-29* wird in der Epidermis der Nematoden exprimiert und wird während pathogener Invasionen hochreguliert, was zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort führt. Die Regulierung der *nlp-29* Expression ist von der Lokalisation der Verletzung abhängig. Zerstörung der basalen Epidermismembran führt zur Hochregulierung von *nlp-29*, während Verletzung der apikalen Seite der epidermalen Zellen keinen Einfluss auf die *nlp-29* Expression hat (Fu *et al.* 2022). Deletion oder RNAi von *bli-1* und *mup-4* in der Kutikula führen ebenfalls zur Hochregulierung von *nlp-29*, sowie zur Separierung der Kutikula und Epidermis (De Melo *et al.* 2002; Hong *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2015). Zur Überprüfung, ob NipA eine Hochregulierung der Expression von *nlp-29* auslöst, wurde eine quantitative Real-Time PCR auf die *nlp-29* mRNA in *nipA-mScarlet* exprimierenden Nematoden (*col-19(p)::nipA::mScarlet*) durchgeführt. Die Nematoden wurden synchronisiert und für 3 Tage bei 20 °C auf NGM-Platten mit OP50-Bakterienrasen inkubiert. Die RNA wurde von adulten Tieren mit der TRIzol-Methode isoliert. DNA wurde mit dem TURBO DNA-free KIT (Invitrogen) entfernt. Die qRT-PCR wurde mit dem Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit mit spezifischen Oligonukleotiden für das

nlp-29 Gen durchgeführt. Als Kontrolle wurde RNA aus dem N2 Wildtyp verwendet. Zur Normalisierung wurden Nematoden spezifische Oligonukleotide für das *aktin-1* Gen verwendet. In die Reaktion wurden jeweils 50 ng/μl RNA eingesetzt. Die relative Expression für *nlp-29* in den *nipA-mScarlet* exprimierenden Nematoden betrug 0,135 (\pm 0,01 SD; n = 3) und in der Kontrolle 0,138 (\pm 0,043 SD; n = 3) wobei keine signifikante Regulation festgestellt werden konnte, was darauf hindeutet, dass in den NipA exprimierenden Stämmen kein Einfluss auf die Regulation von *nlp-29* ausgeübt wird (Abbildung 15). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die apikale Epidermismembran nicht durch NipA beschädigt wird. In den RNAseq Daten von den Stämmen KIT46 und KIT45 sowie N2 und KIT49 konnte ebenfalls keine Regulierung von *nlp-29* nachgewiesen werden.

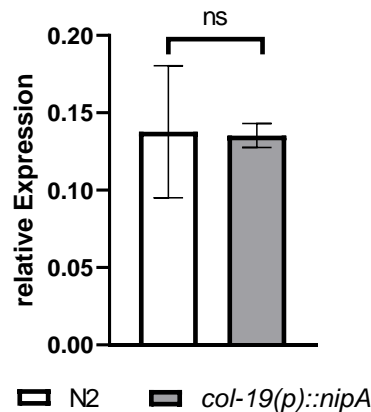


Abbildung 15: Relative Expression des *nlp-29* Gens in KIT49. RNA aus synchronisierten, jungen adulten Nematoden wurde mittels TRizol extrahiert. Als Kontrolle wurde RNA aus dem N2 Wildtypstamm isoliert. Die relative Expression von *nlp-29* zum Haushaltsgen *aktin-1* zeigt keinen signifikanten Unterschied. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten zweiteiligen t-Test in GraphPad Prism8.0 berechnet (P-Wert = 0,9). ****, P <0,0001 (sehr stark signifikanter Unterschied); ***, P <0,005 (stark signifikanter Unterschied); **, P <0,01 (sehr signifikanter Unterschied); *, P < 0,05 (signifikanter Unterschied); n.s., P >0,05 (nicht signifikanter Unterschied)

Wichtige Bestandteile der Nematodenepidermis sind epidermale Stützstrukturen, wie die *fibrous organelles* (FO), welche Klasse I Hemidesmosomen entsprechen und die epidermalen Zellen mit der Basallamina an der basalen, und mit der Kutikula an der apikalen Seite verbinden (Francis und Waterston 1985; Francis und Waterston 1991). Deletion oder Mutation einiger Komponenten der FOs oder ihrer Interaktionspartner führen zu einer Ablösung der Epidermis von der Basallamina beziehungsweise der Kutikula. Ein Hauptbestandteil der FOs ist VAB-10A, wessen Deletion zu Blasenbildung in *C. elegans* führt. Im Stamm GOU2043 wurde VAB-10A mit GFP markiert, um so seine Lokalisierung fluoreszenzmikroskopisch zu

beobachten. Um eine Beteiligung der FOs während der Blasenbildung durch NipA zu untersuchen, wurde *nipA* mit und ohne *mScarlet* unter dem *col-19* Promotor im GOU2043 Stamm als extrachromosomales Array exprimiert. Die Signale von VAB-10A-GFP und NipA-mScarlet überlagerten sich nicht. Die Lokalisation von VAB-10A-GFP, in Bereichen mit Blasenbildung blieb unverändert (Abbildung 16A). Dies deutet darauf hin, dass NipA keinen Einfluss auf die Fos ausübt.

Ein weiterer Hinweis auf den Ursprung der Blasenbildung kann das Vorhandensein von zellulären Bestandteilen in den Blasen liefern. Ist die Epidermis verletzt so können Cytoplasma und zelluläre Bestandteile in die Blasen gelangen. Um dies zu überprüfen, wurden N2 Nematoden mit pJM91 und pJM32 transformiert. Transformierte Nematoden erhielten den Namen KIT53. pJM91 führt zur epidermalen Expression von Cytoplasmatischen mScarlet unter dem *dpy-7* Promotor, während pJM32 zur Expression von *nipA* in der Epidermis adulter Tiere unter dem *col-19* Promotor führt. Bei einer verletzten Epidermis gelangt mScarlet in die Blasenflüssigkeit und färbt diese an (Moribe *et al.* 2004). Die NipA induzierten Blasen des KIT53 Stammes zeigten keine Fluoreszenz, was eine Verletzung der Epidermis ausschließt und auf einen kutikulären Ursprung der Blasenbildung hindeutet (Abbildung 16B).

Diese Beobachtungen zeigen, dass NipA keinen Einfluss auf die epidermale Integrität, aber auf die Struktur der Kutikula des Nematoden hat, wobei keine Immunantwort durch NLP-29 ausgelöst wird.

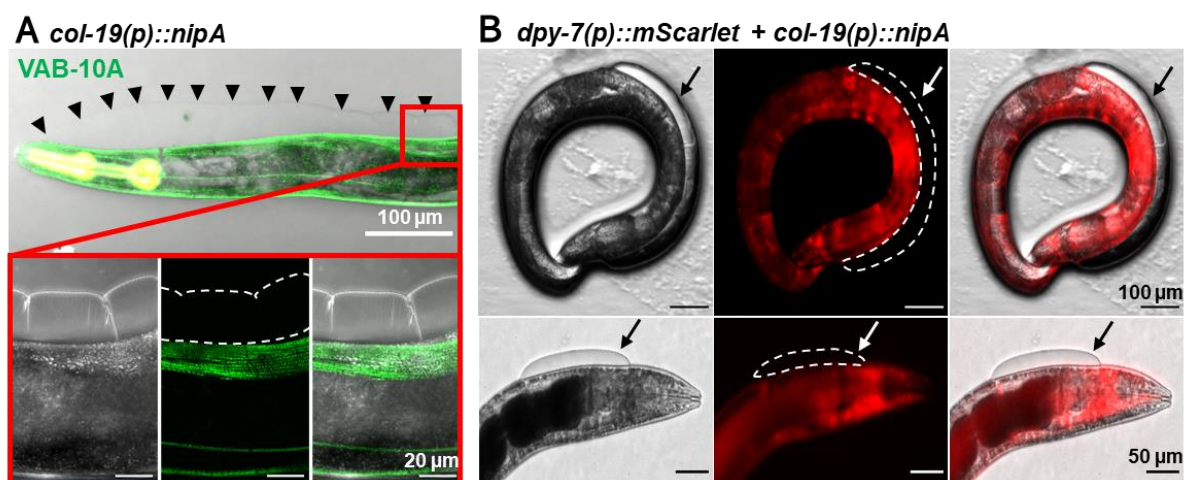


Abbildung 16: Strukturelle Untersuchung des Blasenursprungs. (A) Lokalisierung von VAB-10-GFP unter einer Blase eines *nipA*-exprimierenden GOU2043 Nematoden. Die Blasenbildung beeinflusst nicht die Lokalisation des in der Epidermis befindlichen Vab-10A, einem Bestandteil der *fibrous organelles*. Pfeilköpfe markieren den Blasenrand. (B) Ko-Expression von Cytoplasmatischem *mScarlet* unter der Kontrolle des *dpy-7* Promotors in epidermalen Zellen eines Nematoden und *nipA* unter der Kontrolle des *col-19* Promotors. Pfeile zeigen auf Blasen. Die Blasen sind im RFP-Kanal weiß umrandet. Die, durch NipA induzierten, Blasen sind nicht mit fluoreszenter Flüssigkeit gefüllt.

2.8 Cystein 1 wird für die NipA induzierte Blasenbildung in Nematoden benötigt

Viele tierische Proteine beinhalten EGF-ähnliche Domänen, insbesondere in den extrazellulären Domänen membrangebundener Proteine und sekretierte Proteine. Sie spielen unter anderem eine Rolle in der Signalweiterleitung durch Interaktion mit EGF-Rezeptoren. Die 30-40 AS großen EGF-Domänen sind definiert durch sechs Cysteine, welche drei Disulfidbrücken ausbilden. Die Hauptstruktur ist ein zweisträngiges beta-Faltblatt gefolgt von einer Schleife zu einem C-terminalen zweisträngigen Faltblatt (Abbildung 17B). Die Subdomänen zwischen den konservierten Cysteinen können in der Länge variieren (Appella *et al.* 1988; Doolittle *et al.* 1984; Engel 1989).

Laut AlphaFold-Modellierung weist NipA zwei zweisträngige und ein dreisträngiges beta-Faltblatt mit verbindenden Schleifen auf. Die Anzahl der Cysteine mit insgesamt sechs Disulfidbrücken lässt auf zwei EGF-ähnliche Domänen schließen. Jedoch befinden sich nur jeweils zwei Disulfidbrücken innerhalb der beta-Faltblätter (Abbildung 17A).

Ungepaarte Cysteine stellen eine Möglichkeit dar, mit anderen Proteinen, die möglicherweise ebenfalls eine ungerade Anzahl an Cysteinen haben, eine Interaktion einzugehen. Um herauszufinden, ob das erste Cystein der NipA-Sequenz eine Rolle für die Funktion von NipA spielt, wurde dieses durch eine Punktmutation zu Alanin umgewandelt. Dazu wurde NipA von cDNA mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide, welche die Punktmutation implizierten, amplifiziert. Das Amplikon wurde mittels Gibson-Assembly, zur Expression unter dem *col-19* Promotor und Fusion an mScarlet, in den Vektor pJM32 kloniert und erhielt die Bezeichnung pJM92. Die Etablierung der Punktmutation wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Das Plasmid wurde zusammen mit dem *myo2(p)::emGFP* Markerplasmid in den N2 Wildtyp Stamm injiziert. Transformanten wurden synchronisiert und als L4 Larven auf NGM-Platten mit FUDR überführt, um Nachkommen zu unterdrücken. 90 Tiere wurden für einen Zeitraum von 20 Tagen täglich auf Blasenbildung untersucht, jedoch zeigte kein Nematode morphologische Auffälligkeiten.

Diese Beobachtung legt nahe, dass die Mutation des ersten Cysteins der AS-Sequenz von NipA entweder die Funktion in Form von unterdrückter Interaktion mit

anderen Proteinen verhindert oder die Tertiärstruktur von NipA so weit verändert wird, dass NipA nicht mehr funktionell ist.

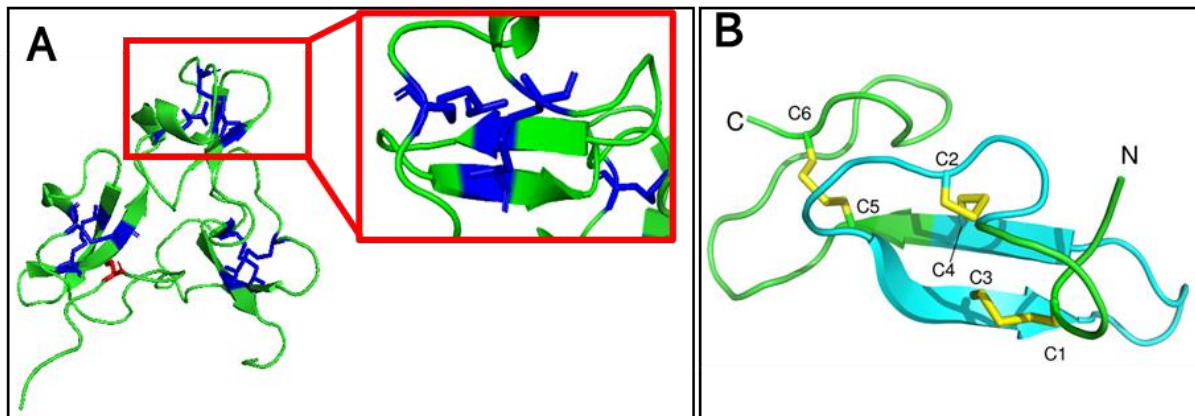


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Tertiärstrukturen von NipA und EGF-ähnlichen Domänen. (A) Darstellung der Tertiärstruktur von NipA. Die Disulfidbrücken sind blau gefärbt. Das ungepaarte Cystein wird rot dargestellt. Die Struktur weist zwei zweisträngige und ein dreisträngiges beta-Faltblatt auf, welche durch jeweils zwei Disulfidbrücken verbunden sind. **(B)** Darstellung der Struktur der EGF-Domäne des Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1) aus *Plasmodium vivax*. Die Disulfidbrücken sind gelb dargestellt. Ein zweisträngiges beta-Faltblatt wird durch drei Disulfidbrücken mit den umliegenden Schlaufen verbunden (de Silva *et al.* 2011).

2.9 RNAseq Analysen NipA exprimierender Nematoden zeigen regulatorische Veränderungen in ECM- und Stressreaktionsgenen

Die Sequenzierung von RNA hat sich als nützliches Werkzeug zur Untersuchung von Wirt-Pathogeninteraktionen etabliert und bietet einen umfassenden Überblick über die Genexpressionsdynamik sowohl im Wirt als auch im Pathogen. Durch RNAseq-Daten infizierter Wirte können Einblicke in die molekulare Reaktion des Immunsystems des Wirts gewonnen und unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert werden. Die differenziell exprimierten Gene können dabei helfen, die infektionsbedingten Stressreaktionsmechanismen des Wirtes und die Infektionsmechanismen des Pathogens besser verstehen.

Um die NipA-induzierte Blasenbildung besser zu untersuchen und zu Grunde liegende regulatorische Ereignisse zu entschlüsseln, wurde RNA aus NipA-exprimierenden Nematoden der Stämme KIT45 (*col-19(p)::nipA::mScarlet*) und KIT49 (*col-19(p)::nipA*), wie zuvor beschrieben, isoliert. Als Kontrolle wurde RNA zusätzlich aus KIT46 (*col-19(p)::mScarlet*) und dem N2 Wildtyp isoliert. Die Sequenzierung der reinen RNA erfolgte durch BGI Tech Solutions (Hongkong, China). Die Expressionsdaten der Stämme KIT45 und KIT46, welche mScarlet mit und ohne NipA

unter dem *col-19* Promotor exprimieren, sowie des N2 Wildtyps und KIT49, welcher lediglich NipA unter dem *col-19* Promotor exprimiert, wurden zueinander relativiert und anschließend miteinander verglichen. Durch diese Kontrollen sollte ein Einfluss der *mScarlet* Expression ausgeschlossen werden. Die von BGI übermittelten Gen IDs wurden mittels *g:convert* in WormBaselIDs umgewandelt. Insgesamt waren 161 Gen IDs zu keiner WormBaselID zuzuordnen. Davon waren 15 in beiden Datensätzen vertreten. Gene ohne WormbaselID wurden aus weiteren Analysen ausgeschlossen. In den NipA-*mScarlet* exprimierenden Nematoden wurden insgesamt 417 Gene differenziell zu KIT46 exprimiert. Davon wurden 318 Gene hoch- und 131 Gene herunterreguliert. In KIT49, welcher *nipA* ohne Modifikation exprimiert, wurden insgesamt 4524 Gene differenziell zur N2 Wildtypkontrolle exprimiert. Davon wurden 713 Gene hoch- und 3952 Gene herunterreguliert. Der Vergleich der beiden Datensätze zeigte, eine gemeinsame Regulierung von 253 Genen von denen 76 hoch- und 57 herunterreguliert wurden (Abbildung 18). Für weitere Analysen wurden lediglich die Gene verwendet, welche mit einem *fold change* ≥ 2 bzw. *fold change* ≤ -2 , in einem oder beiden Datensätzen hoch- oder runterreguliert wurden. Dabei ergab sich eine Liste mit 51 gemeinsam hoch regulierten Genen und eine Liste mit 42 runterregulierten Genen (Tabelle 2; Tabelle 3).

Für die genontologische Analyse der gemeinsam regulierten Datensätze wurde WormCat verwendet, welches die biologische Funktion von Genen anhand von drei Hauptklassifikationen (biologischer Prozess, molekulare Funktion oder zelluläre Komponente) annotiert, um Einblicke in ihre Funktion zu gewinnen (Holdorf *et al.* 2020). Die herunterregulierten Gene fallen bei der Analyse überwiegend in zwei Hauptkategorien: extrazelluläre Komponenten, wie Kollagen, und Stressreaktionselemente, die durch C-typ Lektine typisiert werden (Abbildung 17B unten). Umgekehrt stimmen die Gene des gemeinsam hochregulierten Datensatzes überwiegend mit Stressreaktionswegen, welche mit Pathogenreaktionen und Entgiftungsprozessen verbunden sind, überein (Abbildung 18B oben).

Mit Hilfe der String-DB-Analyse, mit welcher Protein-Protein-Interaktionen analysiert werden können, konnten aufschlussreiche Interaktionsnetzwerke zwischen den regulierten Genprodukten erstellt werden und so das Verständnis ihrer funktionellen Beziehungen erweitern. Im Fall des hochregulierten Datensatzes weisen CUB-Domänen enthaltene Proteine, am Beispiel von IRG-4, welches für die angeborene Immunität und Stressreaktion von Bedeutung ist, robuste Verbindungen

auf (Teclé *et al.* 2021). Das String-DB Netzwerk verbindet diese immunbezogenen Proteine auf komplexe Weise mit Proteinen, die für Entgiftungsprozesse von wesentlicher Bedeutung sind, wie beispielsweise die UGT-Proteine (UDP-Glucuronosyltransferase) (Jarrar und Lee 2021) (Abbildung 17C oben). Im Kontext der herunterregulierten Gene entsteht ein deutliches Muster innerhalb des Interaktionsnetzwerks. Bemerkenswerterweise zeigen Proteine, die C-Typ-Lektindomänen enthalten, ein offensichtliches Zusammenspiel. Darüber hinaus entsteht ein ausgeprägtes Netzwerk zwischen Kollagenproteinen, was auf eine orchestrierte Veränderung extrazellulärer Komponenten schließen lässt (Abbildung 18C unten).

Aufgrund des beobachteten Blasenphänotyps wurden die Datensätze genauer auf Gene untersucht, welche bekannterweise eine Rolle während der Blasenbildung spielen. Innerhalb der herunterregulierten Kollagengene befindet sich *bli-6* mit einem *fold change* von -2,4 (P-Wert = $3,5 \times 10^{-8}$) im Datensatz der NipA-mScarlet exprimierenden Nematoden und einem *fold change* von -3,4 (P-Wert = $1,96 \times 10^{-10}$) im nur NipA exprimierenden Datensatz. Im String-DB Netzwerk wird BLI-6 mit vielen weiteren herunterregulierten Kollagenen vernetzt. BLI-6 wurde als grundlegender Bestandteil identifiziert, der zur strukturellen Integrität der Kutikula beiträgt. Experimentelle Beweise in der Literatur bestätigen, dass die Deletion oder Mutation von BLI-6 konsistent mit der Induktion der Blasenbildung verbunden ist (Park und Horvitz 1986).

Die erhobenen Daten bieten wertvolle Einblicke in die Wirt-Pathogeninteraktion zwischen *C. elegans* und *A. flagrans* hinsichtlich der spezifischen Funktion des Effektorproteins NipA. Die RNAseq Analysen der heterolog NipA exprimierenden Nematoden liefern Hinweise darauf, dass NipA für die Schwächung der Stressreaktion und der äußeren Barriere der Nematoden verantwortlich ist, wodurch der Infektionsprozess erleichtert wird. Zeitgleich löst es aber auch die Induktion der angeborenen Immunantwort aus.

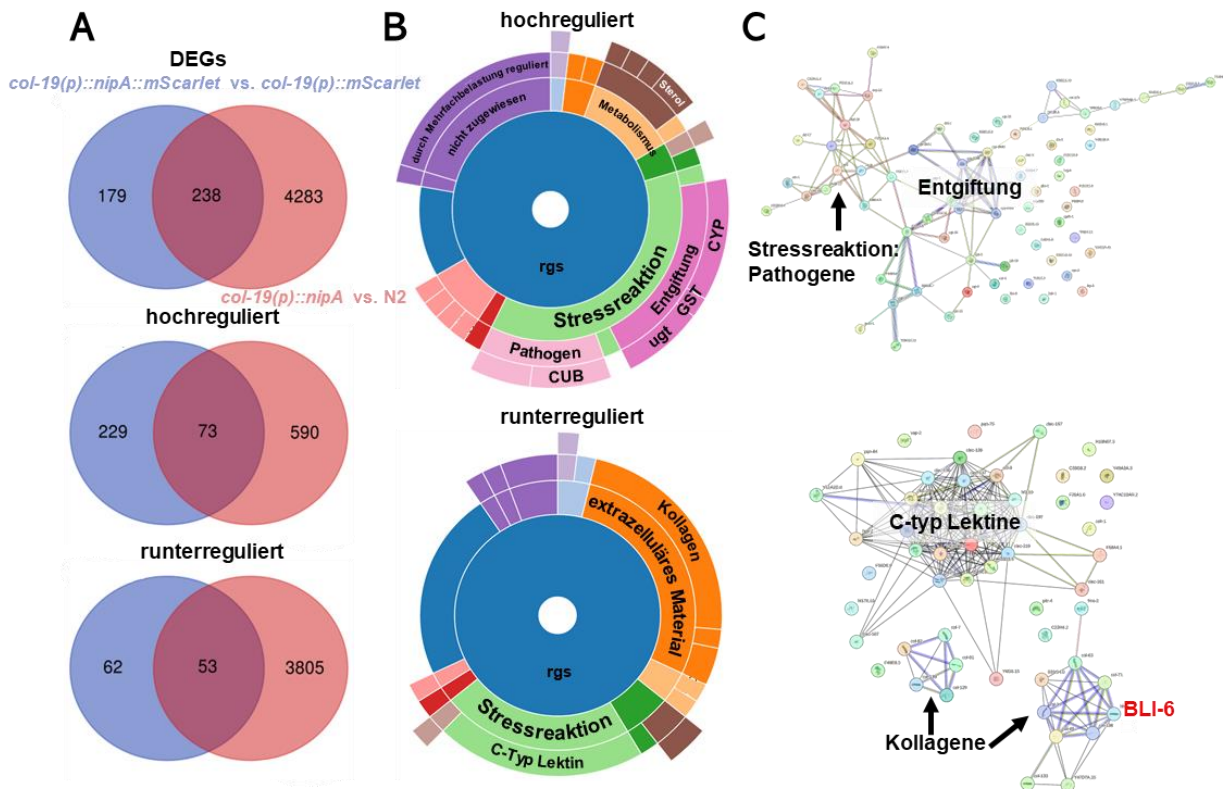


Abbildung 18: RNAseq Analyse der *nipA* exprimierenden Stämme KIT45 und KIT49. Es wurden die Genexpressionslevel der Stämme KIT45 gegen KIT46 und KIT49 gegen N2 Wildtyp verglichen. **(A)** Venn-Diagramme der differenziell exprimierten Gene (DEGs). In blau werden die DEGs des KIT45 Stamms und in rot die DEGs des KIT49 Stamms dargestellt. In beiden Datensätzen befinden sich 238 gemeinsam regulierte Gene (oben). Davon sind 73 Gene hochreguliert (Mitte) und 53 Gene herunterreguliert (unten). **(B)** Mehrstufige Tortendiagramme, der Genkategorien der gemeinsam regulierten Gene (rgs) von KIT45 und KIT49, erstellt durch WormCat. In dem Datensatz der gemeinsam hochregulierten Gene befindet sich eine erhöhte Anzahl an Genen, welche eine Rolle während der Stressreaktion spielen (oben). Die herunterregulierten Gensätze werden ebenfalls in die Kategorie der Stressreaktion, in diesem Fall insbesondere C-Typ Lektine, eingeordnet. Zusätzlich werden Gene der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagene, herunterreguliert (unten). **(C)** Protein-Interaktionsnetzwerke der gemeinsam regulierten Gene der Stämme KIT45 und KIT49, erstellt durch String-DB. Die Proteine des hochregulierten Datensatzes zeigen eine starke Vernetzung miteinander, insbesondere die Proteine, die in der Stressreaktion bei Pathogenen und Entgiftung eine Rolle spielen (oben). Die C-typ Lektine der herunterregulierten Gene sind stark miteinander verbunden und bilden ein aufwändiges Interaktionsnetzwerk. Die regulierten Kollagene bilden zwei unabhängige Interaktionsnetzwerke. Eines der am besten vernetzten Kollagene ist BLI-6 (unten).

Tabelle 2: Liste der Gene die in KIT45 und KIT49 hochreguliert sind. Gene, die in beiden Datensätzen einen *fold change* unter 2 zeigten wurden exkludiert (**P-Wert < 0,05**).

WormBase Gen ID	Name	KIT45	KIT49
		fold change	fold change
WBGene00010738	K10D3.4	1.13	10.02
WBGene00019565	<i>cyp-35A3</i>	7.28	9.20
WBGene00016786	<i>cyp-35A4</i>	8.33	8.67
WBGene00019089	<i>clec-206</i>	5.55	6.61
WBGene00008584	<i>irg-4</i>	2.67	6.17
WBGene00007362	<i>cyp-35C1</i>	2.92	6.13

WBGene00009429	irg-5	2.00	6.03
WBGene00002260	lbp-8	2.05	5.52
WBGene00019473	cyp-35A5	3.18	5.39
WBGene00020014	srff-19	1.51	5.11
WBGene00007875	dod-24	2.32	4.95
WBGene00007455	ugt-22	2.12	4.88
WBGene00013007	Y48E1B.8	1.14	4.86
WBGene00044109	K02E11.10	1.17	4.54
WBGene00015400	cyp-35A2	3.43	4.34
WBGene00007864	irg-6	2.97	4.10
WBGene00015399	cyp-35A1	3.74	3.96
WBGene00050875	bah-1	1.17	3.77
WBGene00016340	gba-2	2.02	3.70
WBGene00009902	drd-1	1.05	3.58
WBGene00219274	T25G12.13	2.20	3.56
WBGene00019550	K09C4.5	1.04	3.42
WBGene00003522	nas-3	1.37	3.37
WBGene00010123	F55G11.2	2.51	3.23
WBGene00008678	stdh-2	3.31	3.22
WBGene00009493	hrg-4	1.39	3.16
WBGene00010124	F55G11.4	1.17	3.10
WBGene00019235	ugt-67	4.59	3.02
WBGene00044644	B0205.13	1.32	2.98
WBGene00015271	C01B4.7	1.31	2.97
WBGene00000986	dhs-23	2.45	2.95
WBGene00018647	F49F1.7	1.23	2.95
WBGene00017658	F21C10.9	1.07	2.92
WBGene00020587	ugt-9	1.25	2.88
WBGene00044011	idpc-3	1.98	2.82
WBGene00000412	cdr-1	1.48	2.57
WBGene00020394	T10B5.8	1.03	2.55
WBGene00009431	dct-17	1.22	2.55
WBGene00009237	F28H7.3	1.08	2.53
WBGene00006534	tba-8	1.37	2.53
WBGene00011548	T06G6.6	1.37	2.49
WBGene00044514	R09E12.9	2.31	2.47
WBGene00044488	Y54G2A.45	1.62	2.46
WBGene00003995	pgp-1	1.31	2.36
WBGene00022287	Y75B7AR.1	1.05	2.15
WBGene00009110	F25D1.5	1.70	2.12
WBGene00008494	F01D5.3	2.15	2.12
WBGene00022680	ZK180.6	1.14	2.07
WBGene00001753	gst-5	2.51	2.07
WBGene00017095	E02C12.10	4.56	2.05
WBGene00020594	ugt-10	3.50	2.00

Tabelle 3: Liste der in KIT45 und KIT49 herunterregulierten Gene. Gene mit einem *fold change* in beiden Datensätzen über -2 wurden exkludiert (P-Wert <0,05).

WormBase Gen ID	Name	KIT45 fold change	KIT49 fold change
WBGene00013026	Y49A3A.3	-7.21	-10.75
WBGene00000711	col-138	-3.44	-9.65
WBGene00000626	col-49	-3.86	-8.62
WBGene00004394	rol-1	-3.11	-6.29
WBGene00007691	cest-8	-2.41	-5.88
WBGene00000596	col-7	-3.13	-4.58
WBGene00021627	Y47D7A.15	-2.29	-3.91
WBGene00007141	pit-4	-1.48	-3.78
WBGene00011462	vap-2	-1.28	-3.68
WBGene00000639	col-63	-3.40	-3.66
WBGene00000256	bli-6	-2.41	-3.40
WBGene00008448	E01G4.6	-1.76	-3.35
WBGene00001477	fmo-2	-1.03	-3.27
WBGene00000657	col-81	-2.54	-2.63
WBGene00000707	col-133	-3.02	-2.62
WBGene00044471	F56D6.9	-1.42	-2.22
WBGene00017806	F26A1.8	-1.25	-2.09
WBGene00000638	col-62	-2.11	-2.03
WBGene00000712	col-139	-2.20	-2.01
WBGene00020945	clec-219	-2.59	-1.92
WBGene00010886	srlf-17	-7.38	-1.82
WBGene00017810	clec-157	-3.20	-1.80
WBGene00189937	Y6G8.15	-2.68	-1.74
WBGene00018048	clec-137	-2.21	-1.63
WBGene00015847	C16C8.9	-2.78	-1.54
WBGene00018097	clec-208	-2.32	-1.52
WBGene00000703	col-129	-2.02	-1.52
WBGene00010531	K03D3.5	-2.14	-1.50
WBGene00008030	scl-8	-3.16	-1.50
WBGene00022886	ZK1290.1	-2.60	-1.46
WBGene00012502	clec-107	-6.93	-1.39
WBGene00018047	clec-136	-2.93	-1.37
WBGene00018049	clec-138	-2.79	-1.36
WBGene00017183	scl-15	-2.55	-1.27
WBGene00022282	Y74C10AR.2	-3.30	-1.26
WBGene00008202	clec-197	-2.54	-1.24
WBGene00008231	tag-329	-2.84	-1.19
WBGene00010946	M176.10	-3.92	-1.19
WBGene00013928	clec-94	-3.53	-1.14
WBGene00010885	srlf-18	-2.21	-1.12
WBGene00008175	C48B4.12	-2.25	-1.08
WBGene00013076	Y51A2D.8	-2.45	-1.00

2.10 Untersuchung des genetischen Kontextes von *nipA*

2.10.1 Bioinformatische Analyse der *nipA* umgebenden Gene

Die Deletion einzelner Effektorproteine führt meist zu keiner oder nur einer geringen Veränderung der Virulenz eines Pathogens. Dies kann an der jahrhundertelangen Ko-Evolution von Wirt und Pathogen liegen, welche durch gegenseitiges Wettrüsten zu Redundanzen im Proteom geführt haben. Ein ausgeklügeltes Zusammenspiel verschiedener Virulenzfaktoren, wie der Stp-Komplex aus *U. maydis* könnte ebenfalls die geringe Veränderung der Virulenz erklären, da hier die anderen Proteine des Komplexes die Aufgabe des Deletierten übernehmen (Ludwig *et al.* 2021). Auf der Suche nach potenziellen pilzlichen Interaktionspartnern von NipA bzw. funktionell redundanten Proteinen wurde dessen genomischer Kontext genauer untersucht (Abbildung 19). Dazu wurden die Proteinsequenzen der umliegenden Gene auf Signalpeptide mit SignalP5.0, Transmembrandomänen mit TMHMM, homologen Proteinen in anderen Organismen mit BLAST und auf konservierte Domänen mit InterProScan, analysiert. Schließlich wurden die Expressionslevel der Gene *dfl_005403*, *dfl_005405*, *dfl_005406* und *dfl_005408* während der saprotrophen und der biotrophen Lebensphase mittels einer qRT-PCR untersucht (Tabelle 4).

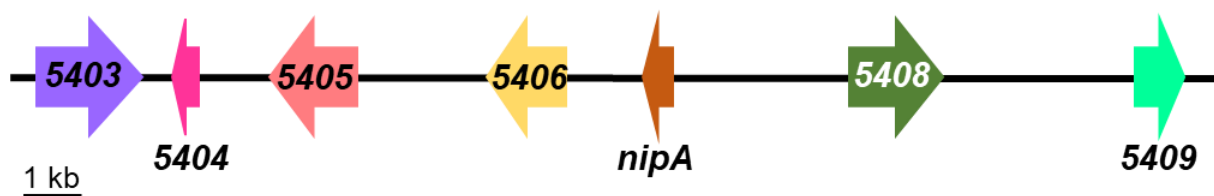


Abbildung 19: Schematische Darstellung des genetischen Kontextes von *nipA*.

Zur Isolierung der RNA wurden Sporen des *A. flagrans* Wildtyps auf mit Cellophan beschichteten LNA-Platten ausplattiert und für 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Für die induzierten Proben wurde nach 24 Stunden eine gemischte Population *C. elegans* N2 zu Induktion des biotrophen Lebensstils zu dem Pilz gegeben. Das Myzel wurde mit einem Spatel von dem Cellophan getrennt und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im flüssigen Stickstoff gemörsert. Die RNA wurde mittels der TRIzol Methode isoliert. Die DNA wurde mit dem TUBRO DNA-free KIT (Invitrogen) entfernt. Für die qRT-PCR wurde das Universal Luna One-Step qRT-PCR KIT mit spezifischen Oligonukleotiden für die zu untersuchenden Gene verwendet. Als Haushaltsgen wurde das *γ-aktin* Gen

(dfl_002353) verwendet. Zur ersten Analyse wurde die qRT-PCR zunächst nur mit einem biologischen Replikat und mit technischen Duplikaten durchgeführt. Die Untersuchung der resultierenden *fold changes* ergab, dass *dfl_005403* und *dfl_005406* mit *fold changes* von 0,42 und 0,68 während der Infektion herunter reguliert werden. *Dfl_005405* wird mit einem *fold change* von 1,07 nicht reguliert. Mit einem *fold change* von 97989,57 wird als einziges *dfl_005408* während der Infektion hochreguliert.

Tabelle 4: Analyse des genomischen Bereiches um *nipA*. Die Genprodukte von *dfl_005403* bis *dfl_005409* wurden auf Signalpeptide, Transmembrandomänen und konservierte Proteindomänen bioinformatisch untersucht. Die Expression von *dfl_005403*, *dfl_005405*, *dfl_005406* und *dfl_005408* wurde zusätzlich, während des biotrophen Lebensstils, mittels einer qRT-PCR analysiert.

Locus tag	bp	Sequenz ID	AS	BLAST/InterPro Annotationen	SP	TMHMM	Fold change
dfl_005403	1799	RVD87162.1	394	Cellobiose- Dehydrogenase ähnliches Protein	x	x	0,42
dfl_005404	450	RVD87163.1	107	-	x	x	-
dfl_005405	1494	RVD87164.1	401	Superfamilie der Cellulose- bindenden Domänen/Pektin- Lyase-ähnliches Protein	✓	x	1,07
dfl_005406	1347	RVD87165.1	434	putativer natriumabhängiger Gallensäuren Ko- Transporter	x	✓	0,68
dfl_005407	505	RVD87166.1	133	NipA – EGF- Domänen ähnliches Protein	✓	x	97989,57
dfl_005408	1602	RVD87167.1	483	Egh-16 ähnlicher Virulenzfaktor	✓	x	2736,59
dfl_005409	825	RVD87168.1	274	LEA- Domänenprotein	x	✓	-

Die Untersuchung des genomischen Umfeldes von *nipA* ergab die Identifizierung eines Egh-16 ähnlichen Virulenzfaktors in direkter genomischer Nachbarschaft zu *nipA*. Durch die vorhergesagte Egh-16 ähnliche Virulenzfaktordomäne, dem Signalpeptid und die erhöhte Genexpression während der Infektion, stellt DFL_005408 ein weiteres interessantes Protein zur Analyse der Wirt-Pathogeninteraktion von *A. flagrans* und *C. elegans* dar.

2.10.2 Bioinformatische Analyse und Untersuchung der Expression von *dfl_005408*

Egh-16 Virulenzfaktoren kommen hauptsächlich in pathogenen Pilzen wie dem Namensgebenden *Erysiphe graminis f. sp. Hordei* vor. Sie spielen womöglich eine wichtige Rolle während früher Infektionsstadien pathogener Pilze, wie bei den für die Bildung von Appressorien benötigten Proteinen GAS1/2 von *M. oryzae* (Grell *et al.* 2003; Jin *et al.* 2013; Xue *et al.* 2002).

Die bioinformatische Analyse von DFL_005408 mit InterproScan ergab eine Vorhersage für eine Egh-16 Virulenzfaktor Domäne in den AS 24-258 des insgesamt 483 AS großen Proteins. In dieser Domäne befinden sich alle 11 Cysteine der Sequenz. Die ungerade Anzahl der Cysteine lässt, wie bei NipA, auf ein freies Cystein schließen, welches womöglich für Interaktionen mit anderen Proteinen benötigt wird. Durch SignalP5.0 wurde ein Signalpeptid in den ersten 23 AS des N-terminus, mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,9, bestimmt (Abbildung 20) Die Bestätigung der Funktionalität des SP durch ein Laccase-Assay steht noch aus.

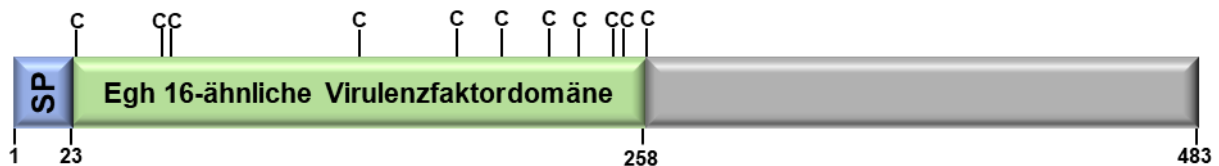


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von DFL_005408 mit Signalpeptid von AS1 bis AS23 und eingezeichneten Cysteinen. Durch InterProScan wird eine Egh-16 ähnliche Virulenzfaktordomäne von AS24 bis AS258 vorhergesagt.

Um die differenzielle Expression von *dfl_005408* während der Infektion zu bestätigen wurde die zuvor durchgeführte qRT-PCR in biologischen und technischen Replikaten wiederholt. Die relative Expression im induzierten Myzel wurde mit durchschnittlich 0,07 ($\pm 0,02$ SD) und im nicht-induzierten Myzel mit $1,4 \times 10^{-5}$ ($\pm 8,3 \times 10^{-6}$ SD) gemessen, was eine Induktion der Genexpression nach ko-inkubation mit *C. elegans* bedeutet. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten Student's t-Test berechnet (Abbildung 21A).

Zur Bestimmung des Expressionsortes im Myzel wurde eine Promotorfusions-Analyse durchgeführt. Dazu wurden 1,4 kb stromaufwärts des Gens, mit Überhängen in den pJM10 Vektor, von genomischer DNA mittels PCR amplifiziert und vor das *h2b-mCherry* Konstrukt in pJM10 kloniert. Das Plasmid erhielt den Namen pJM30 und

wurde in sVW10, zur Ko-Lokalisation mit konstitutiv exprimierten H2B-GFP, transformiert. Transformanten wurden auf Platten mit Hygromycin selektiert. Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass der Promotor von *dfl_005408* zur Expression von *h2b-mCherry* in den Fallennetzwerken führt. Im vegetativen Myzel konnte kein mCherry-Signal festgestellt werden (Abbildung 21B). Aufgrund seiner spezifischen Expression in den Fallennetzwerken wird *dfl_005408* weiter als *trsA* (*trap specific protein A*) bezeichnet.

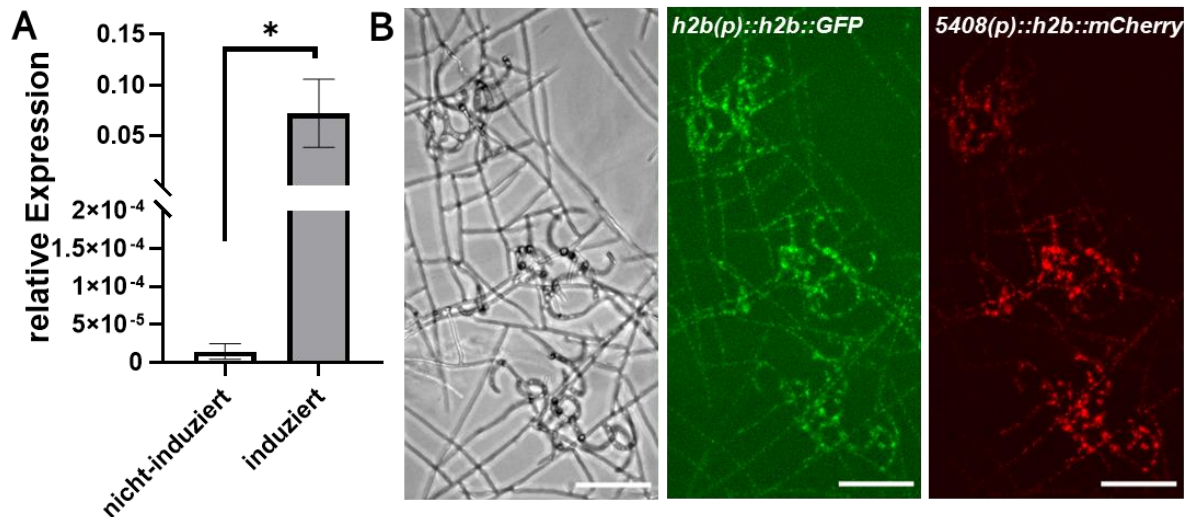


Abbildung 21: Expressionsanalyse von *dfl_005408*. (A) qRT-PCR von *dfl_005408* in biologischen und technischen Triplikaten durchgeführt. Die relative Expression im induzierten Myzel beträgt 0,07 ($\pm 0,02$ SD), während die Expression im nicht-induzierten Myzel bei $1,4 \times 10^{-5}$ ($\pm 8,3 \times 10^{-6}$ SD) liegt. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten Student's t-Test in GraphPad Prism berechnet (P-Wert = 0,02; ****, $P < 0,0001$ (sehr stark signifikanter Unterschied); ***, $P < 0,005$ (stark signifikanter Unterschied); **, $P < 0,01$ (sehr signifikanter Unterschied); *, $P < 0,05$ (signifikanter Unterschied); n.s., $P > 0,05$ (nicht signifikanter Unterschied)). (B) Promotorfusionsanalyse des *dfl_005408* Gens. Der 1,4 kb stromaufwärts Bereich von *dfl_005408* wurde vor ein *h2b-mCherry* Konstrukt kloniert, wodurch die Zellkerne, in denen der Promotor aktiv ist rot fluoreszieren. Das Konstrukt wurde in sVW10 transformiert, welcher H2B-GFP unter den Konstitutiven *h2b*-Promotor exprimiert. Das mCherry Signal beschränkt sich ausschließlich auf Fallennetzwerke, während das GFP-Signal in allen Zellkernen zu sehen ist (Maßstabsbalken = 100 μ m).

2.10.3 TrsA lokalisiert in Infektionsstrukturen

Um Aufschluss über die Funktion von TrsA zu erhalten, wurde die Lokalisierung des Proteins während der Fallenbildung und des Infektionsprozesses beobachtet. Hierzu wurde der offene Lesebereich (ORF) mit dem 1,4 kb Promotorbereich von *trsA*, durch spezifische Oligonukleotide mit Überhängen in den Vektor pJM01 und GFP, von genomischer DNA amplifiziert und zur C-terminalen Fusion an GFP in pJM01 mittels Gibson-Assembly kloniert. Das entstandene Plasmid pJM29 wurde in den *A. flagrans* Wildtyp transformiert. Positive Transformanten wurden auf PDA-Platten mit

Hygromycin selektiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Stamm erhielt die Bezeichnung sJM13.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Akkumulation des Fusionsproteins an den Innenseiten leerer Fallen in kleinen dynamischen Foci, vergleichbar mit der Lokalisation anderer Effektoren, wie NipA oder CyrA. Während des Infektionsprozesses wird eine Verschiebung der Lokalisation zu den Infektionsstellen beobachtet. Dabei reichert sich TrsA an den Bereichen an, die im direkten Kontakt mit dem Nematoden sind. Eine Lokalisation von TrsA in der Infektionsblase ist nicht zu beobachten (Abbildung 22A).

Die Lokalisation von TrsA während der Infektion ist ähnlich zu der beobachteten NipA-GFP Lokalisation in sJM05. Um die Ko-Lokalisation von TrsA und NipA untersuchen, wurde der Stamm sJM13 mit pJM16, zur Expression von NipA-mCherry unter Kontrolle des nativen *nipA*-Promotors, transformiert. Positive Transformanten wurden auf PDA-Platten mit Geneticin selektiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Aufnahmen zeigen, dass NipA-mCherry und TrsA-GFP in leeren Fallen in den dynamischen Vesikel-artigen Strukturen größtenteils ko-lokalisieren. Während der Infektion jedoch, lokalisiert NipA-mCherry, wie zuvor beschrieben, an den Penetrationsstellen, während TrsA-GFP hauptsächlich um NipA-mCherry herum lokalisiert (Abbildung 22B).

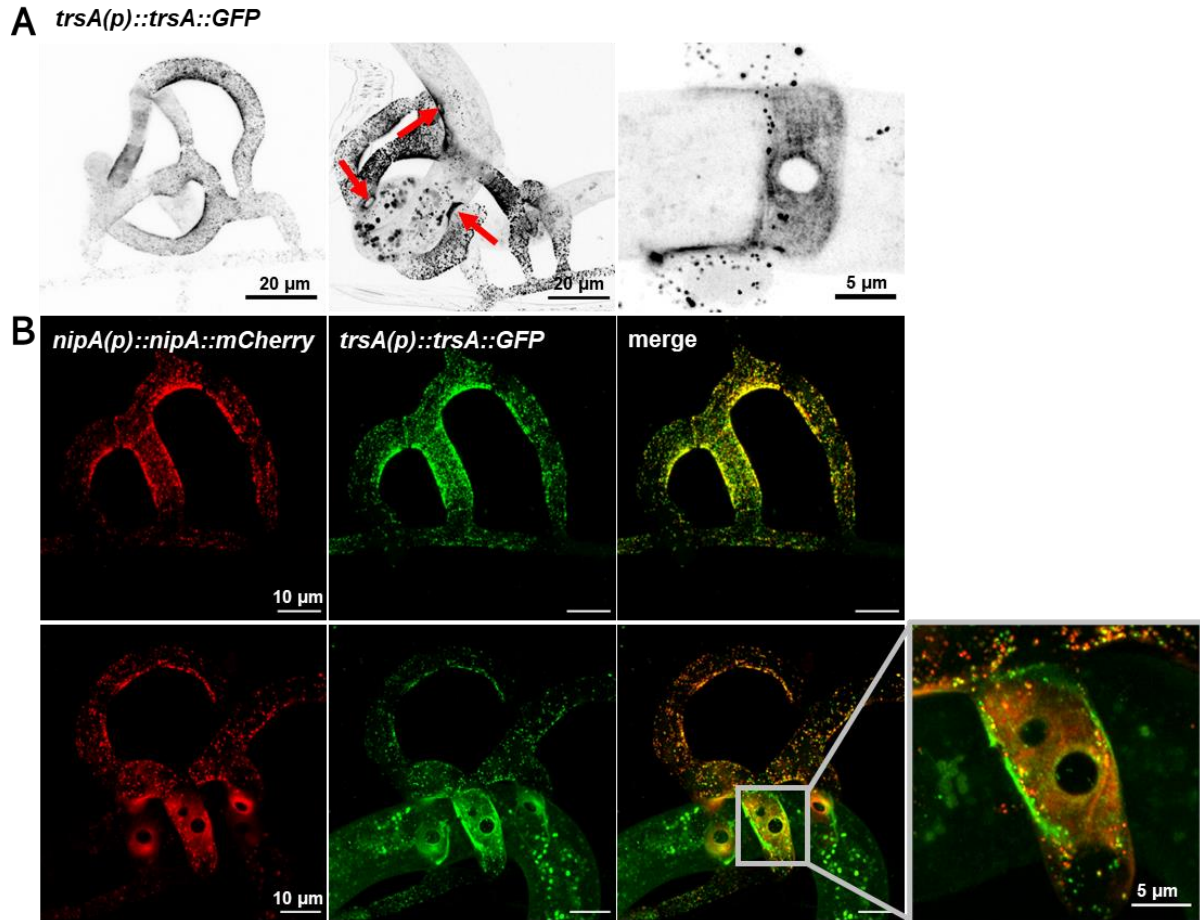


Abbildung 22: Lokalisierung von TrsA -GFP in Infektionsstrukturen. (A) TrsA-GFP bewegt sich in leeren Fällen in dynamischen Vesikel-artigen Strukturen und lagert sich an den Innenseiten der Fallen an. Während der Infektion eines Nematoden akkumuliert TrsA -GFP in der Nähe der Penetrationsstellen (Pfeile). Vergrößerung der Infektionsstelle zeigt, dass TrsA über den gesamten Kontaktbereich mit dem Nematoden lokalisiert. **(B)** Ko-Lokalisationsexperiment mit TrsA-GFP und NipA-mCherry. Die Konstrukte werden unter dem jeweiligen nativen Promotor exprimiert. In leeren Fällen ko-lokalisieren die Signale beider Proteine größtenteils. Während der Infektion lokalisiert NipA-mCherry mehr an der Penetrationsstelle, während TrsA-GFP eher am Kontaktbereich mit dem Nematoden lokalisiert. Eine Ansammlung des Signals ist hauptsächlich am Rand des Kontaktbereiches zu sehen.

2.10.4 Deletion von *trsA* und Doppeldeletion mit *nipA*

Zur Untersuchung der Bedeutung von *trsA* auf die Pathogenität von *A. flagrans* wurde der ORF mittels homologer Rekombination durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Hierzu wurden 1,4 kb stromaufwärts als 5'-Flanke (*left border*) und 1,2 kb stromabwärts des ORFs als 3'-Flanke (*right border*) von genomischer DNA mit Überhängen in die Hygromycin-Resistenzkassette und dem pJET-Vektor amplifiziert. Die Klonierung erfolgte mit der Gibson-Assembly Methode. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pJM28 und wurde in den *A. flagrans* Wildtyp transformiert. Transformanten wurden auf PDA-Platten mit Hygromycin selektiert. Die erfolgreiche Deletion von *trsA* wurde durch eine Southern-Hybridisierung überprüft. Hierzu wurde

die genomische DNA der Transformanten, sowie des Wildtyps, isoliert und über Nacht mit *EcoRV* verdaut. Zur Detektion wurde eine 1 kb große, mit Digoxigenin markierte PCR-Sonde der 5'-Flanke des *trsA*-Gens verwendet. Die bei einer Deletion erwarteten Bande liegt bei 4,7 kb, während im Wildtyp eine Bande bei 3,3 kb erwartet wird (Abbildung 23).

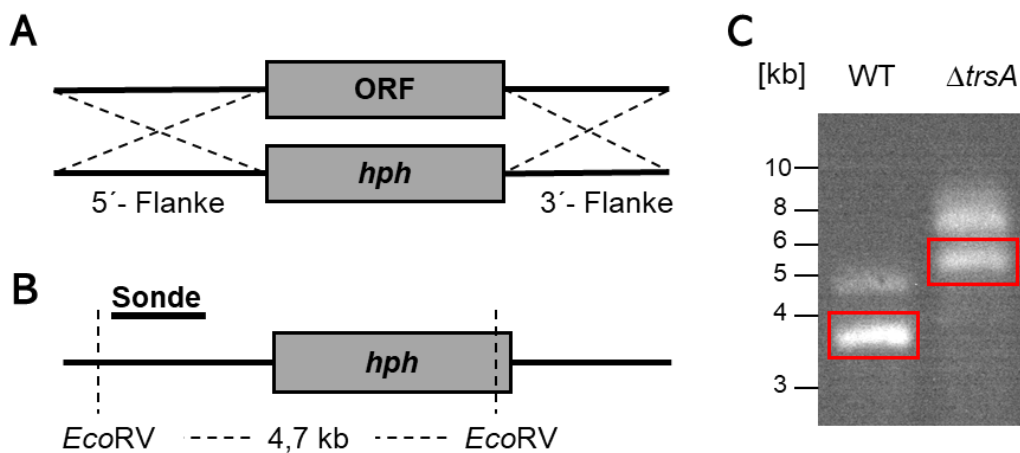


Abbildung 23: Gezielte Deletion von *trsA* in *A. flagrans* und Southern-Blot Analyse zum Nachweis der Deletion. (A) Schematische Darstellung der homologen Rekombination mittels des erstellten Deletionskonstrukts, mit 1,4 kb und 1,2 kb der flankierenden Bereiche für den Austausch des ORFs gegen die Hygromycin-Resistenzkassette. (B) Schema der Veränderung des Genoms im endogenen Locus von *trsA* und Bindestelle der DNA-Sonde in der 5'-Flanke für die Southern-Analyse. Nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* sollte ein 4,7 kb großes Fragment, bei erfolgreicher Deletion, detektiert werden. (C) Entwickelte Southern-Blot Membran. Die mit *EcoRV* verdauete gDNA des Transformanten und des Wildtyps wurde über ein Agarose-Gel aufgetrennt und mittels Kapillarkräften auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mittels einer Digoxigenin-markierten Sonde für die 5'-Flanke des *trsA*-Gens. Die erwarteten Banden liegen beim Wildtyp bei 3,3 kb und für die Deletion bei 4,7 kb (rote Kästen). Unspezifische Banden wurden etwa 1 kb über den erwarteten Banden detektiert.

Die Southern-Analyse zeigte, dass für eine erfolgreiche Deletion erwartete Bandenmuster des Transformanten im Vergleich zum Wildtyp, wodurch die Deletion des *trsA*-Gens bestätigt wird. Unspezifische Banden wurden jeweils etwa 1 kb über der dem erwarteten Fragment detektiert. Die Mutante erhielt die Bezeichnung sJM47. Die Mutante weist keinen offensichtlichen Phänotypen auf und ist weiterhin in der Lage Fallen auszubilden und Nematoden zu fangen. Um den Effekt der Deletion auf die Virulenz von *A. flagrans* besser untersuchen zu können sollte sJM47 zukünftig mit pNH94, zur Detektion von CyrA-mCherry, transformiert werden, um wie zuvor beschrieben, Penetrationsassays durchführen zu können.

Da *trsA* und *nipA* ein ähnliches Expressionsmuster, sowie die Proteine eine ähnliche Lokalisation während der Infektion aufweisen, sollten beide Gene im *A.*

flagrans Wildtyp deletiert werden, um einen womöglich stärkeren Effekt bei der Verzögerung der Penetration, wie bereits in der *nipA*-Deletionsmutante beobachtet wurde, zu erzielen. Durch die genetische Nähe beider Gene zueinander wurde ein Deletionskonstrukt erstellt, mit welchem beide Gene mit einem homologen Rekombinationsereignis deletiert werden können. Dazu wurden 1,2 kb der 5'-Flanke von *nipA* und 1,2 kb der 3'-Flanke von *trsA* von gDNA, mit Überhängen in die Hygromycin-Resistenzkassette und den pJET-Vektor, amplifiziert. Das Deletionskonstrukt wurde mittels Gibson-Assembly kloniert und erhielt die Bezeichnung pJM27. Das Plasmid wurde in Protoplasten des *A. flagrans* Wildtypstamms transformiert und positive Transformanten auf PDA-Platten mit Hygromycin selektiert. Die erfolgreiche Deletion wurde mittels einer Southern-Analyse überprüft. Dazu wurde die gDNA aus den Transformanten sowie dem Wildtyp isoliert und über Nacht mit *Agel* verdaut. Zur Detektion wurde eine 1 kb große, mit Digoxigenin markierte, DNA-Sonde von der 5'-Flanke von *nipA* erstellt. Die bei einer Deletion erwartete Bande liegt bei 5 kb, während im Wildtyp eine Bande bei 8,3 kb erwartet wird (Abbildung 24).

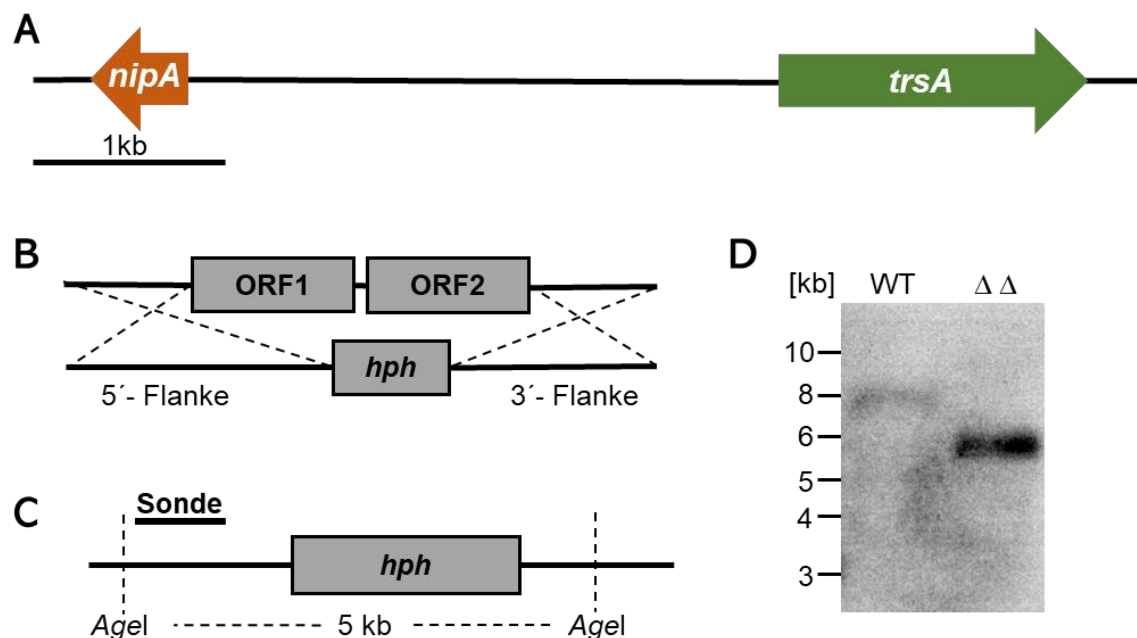


Abbildung 24: Deletionsstrategie von *nipA* und *trsA*. (A) Schematische Darstellung des genomischen Kontextes von *nipA* und *trsA*. Das *nipA*-Gen befindet sich auf dem revers komplementären Strang der Genomsequenz. Zwischen dem ORF von *nipA* und *trsA* befinden sich 3 kb nicht kodierende Sequenz, in welcher sowohl der Promotor von *nipA* als auch der Promotor von *trsA* liegen. (B) Schematische Darstellung der homologen Rekombination mittels des erstellten Deletionskonstrukts mit 1,2 kb der flankierenden Bereiche zum Austausch der ORFs durch eine Hygromycin-Resistenzkassette. (C) Genomische Veränderung des endogenen Locus von *nipA* und *trsA* mit Bindestelle der DNA-Sonde in der 5'-Flanke für die Southern-Hybridisierung. Nach Verdau der gDNA

mit dem Restriktionsenzym *Agel* werden in der Deletionsmutante Banden von der Größe von 5 kb und im Wildtyp der Größe 8,3 kb erwartet. **(D)** Entwickelte Membran der Southern-Blot Analyse. Die durch *Agel* geschnittene gDNA des Wildtyps und des Transformanten wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend mittels Kapillarkräften auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mittels einer Digoxigenin markierten DNA-Sonde für die 5'-Flanke des *nipA*-Gens. Die erwarteten Banden liegen beim Wildtyp bei 8,3 kb und bei 5 kb für eine erfolgreiche Deletion.

Die Southern-Hybridisierung zeigt die Bande für den Wildtyp bei 8,3 kb und die, für die erfolgreiche Deletion in der Transformante, bei 5 kb. Die Doppelmutante erhielt die Stammbezeichnung sJM16.

Um die Auswirkung der Doppeldeletion auf das Penetrationsverhalten von *A. flagrans* untersuchen zu können, wurde sJM16 zusätzlich mit pNH94, zur Lokalisation von CyrA-mCherry, transformiert. Transformanten wurden auf PDA-Platten mit Geneticin selektiert und fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Positive Transformanten erhielten die Bezeichnung sJM46. Zur Untersuchung der Virulenz von sJM46 wurde, wie zuvor beschrieben, ein Penetrationsassay durchgeführt. Als Kontrolle wurde sJM43 verwendet. Die Deletionsmutante benötigte durchschnittlich 126 Minuten (± 61 SD), um einen gefangenen Nematoden zu penetrieren, während der Wildtyp bereits nach 86 Minuten (± 27 SD) in den Nematoden eingewachsen war. Das Experiment wurde in einem biologischen Replikat durchgeführt. Durch die geringe Probenzahl im Wildtyp ($n = 7$) und in der Deletionsmutante ($n = 6$) konnte keine Signifikanz für eine Verzögerung der Penetration nachgewiesen werden, dennoch gibt dieses vorläufige Ergebnis einen Hinweis auf ein mögliches Zusammenspiel zweier Virulenzfaktoren zur Überwindung der äußeren Barrieren von Nematoden während der Infektion (Abbildung 25).

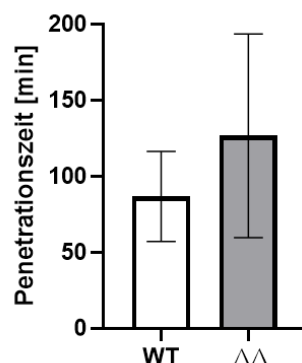


Abbildung 25: Penetrationsassay der Doppeldeletion von *nipA* und *trsA*. Der Deletionsstamm wurde mit pNH94, zur Lokalisation von CyrA-mCherry unter dem natürlichen *cyrA*-Promotor, ko-transformiert. Für das Penetrationsassay wurden Sporen auf einem dünnen LNA-Kissen zusammen mit *C. elegans* zur Falleninduktion ko-inkubiert. Nach 24 h bei 28 °C wurden nicht gefangene Nematoden abgewaschen und Bereiche mit leeren Fallen unter einem Konfokalmikroskop markiert. Die

Penetrationszeit wurde vom Fang eines Nematoden bis zur Akkumulation von CyrA-mCherry in der Infektionsblase gemessen. Als Kontrolle wurde die Zeit bis zur CyrA-mCherry Lokalisation im Wildtyp gemessen.

Die Untersuchung des genetischen Kontextes von *nipA* hat ergeben, dass in unmittelbarer Nachbarschaft ein weiteres Gen existiert, welches während der Infektion von Nematoden hochreguliert wird und im selben Muster lokalisiert wie NipA. Penetrations-Studien haben erste Hinweise ergeben, dass die Deletion beider Gene womöglich den Effekt der verzögerten Penetration von $\Delta nipA$ noch verstärkt. Weitere Experimente zur Bestätigung dieser Beobachtung sollten durchgeführt werden.

3 Diskussion

Virulenzfaktoren und Effektorproteine werden von pilzlichen Pathogenen sekretiert, um die Infektion zu etablieren und die Wirtsabwehr zu überwinden. In vielen pflanzenpathogenen Pilzen, wie zum Beispiel *M. oryzae* oder *U. maydis*, wurden bereits viele dieser Virulenzfaktoren identifiziert und ihre Funktionen analysiert (Lanver *et al.* 2018; Zhang und Xu 2014). Obwohl *C. elegans* als Modellorganismus eine wichtige Rolle zur Entwicklung von Schädlingsbekämpfungsmitteln und zur Untersuchung von menschlichen Krankheiten spielt, sind die Infektionsmechanismen Nematoden-fangender Pilze noch weitestgehend unerforscht. Daher bieten solche Analysen ein großes Lernpotential für zahlreiche Forschungsgebiete. Transkriptom- und Sekretomanalysen von NFP während der Interaktion mit dem Wirt zeigen, dass diese Pilze ein großes Arsenal pathogenitätsrelevanter Proteine besitzen (Youssar *et al.* 2019).

CyrA war der erste untersuchte Virulenzfaktor aus *A. flagrans*, dem eine Rolle während der Infektion zugewiesen werden konnte (Wernet *et al.* 2021a). Als weiteres Effektorprotein wurde NipA, in einer vorausgegangenen Masterarbeit, charakterisiert. Beide Proteine werden als kleine sekretierte Proteine (SSP) definiert. Diese Gruppe von Proteinen, die nicht größer als 300 AS sind und ein Signalpeptid besitzen, wird während der Infektion lebender Wirte häufig eine Rolle zugeschrieben. Sie unterdrücken beispielsweise das Immunsystem des Wirtes, um eine Kolonisierung zu erleichtern (Alfaro *et al.* 2014; Kim *et al.* 2016; Veneault-Fourrey und Martin 2011; Win *et al.* 2012).

In einer vorausgegangenen Studie wurde gezeigt, dass *nipA* während der Infektion hochreguliert ist und das Protein an der Infektionsstelle lokalisiert. Ko-Lokalisationsstudien mit CyrA ergaben, dass beide Proteine in leeren Fällen gemeinsam lokalisierten, während sie im Verlauf der Infektion distinkte Lokalisationsmuster aufwiesen. Ein signifikanter Effekt der Deletion auf die Virulenz, in Bezug auf die Paralyse der gefangenen Nematoden, konnte damals noch nicht festgestellt werden (Menzner 2020).

In dieser Arbeit wurden die Untersuchungen zu NipA erweitert, indem neue bioinformatische Werkzeuge zur Sequenzanalyse verwendet wurden. Dadurch wurden neue Sequenzähnlichkeiten zu EGF-Domänenenthaltenden Proteinen entdeckt. Darüber hinaus wurde ein Penetrations-Assay zur Untersuchung der

Virulenz der *nipA*-Mutante etabliert, wodurch ein signifikanter Unterschied zur Penetrationszeit im Wildtyp nachgewiesen werden konnte. Zudem wurden Expressionsstudien in heterolog *nipA*-exprimierenden Nematodenstämmen durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass *nipA*-exprimierende Nematoden eine reduzierte Kollagenbiosynthese besitzen und Gene für C-typ Lektine der Stressreaktion herunterreguliert sind, wobei zeitgleich Gene für die Pathogenabwehr und Entgiftung hochreguliert werden.

Die Untersuchung von TrsA, einem weiteren Virulenzfaktor-Kandidaten, sollte die Infektionsmechanismen von *A. flagrans* weiter entschlüsseln. Lokalisationsstudien zeigten eine ähnliche, aber doch unterscheidbare Lokalisation zu NipA. Die Durchführung von Penetrations-Assays in der TrsA und NipA-TrsA Doppeldelensionsmutante sollen zukünftig Aufschluss über eine Beteiligung am Infektionsmechanismus liefern.

3.1 Sekretionsmechanismen verschiedener Virulenzfaktoren in *A. flagrans*

Die Vorhersage eines Signalpeptids am N-terminus von NipA und die Überprüfung dessen Funktionalität zeigten bereits, dass NipA sekretiert wird (Menzner 2020). Allerdings können auch Proteine ohne klassisches N-terminales Signalpeptid, wie FGF-1 und Galectin, sekretiert werden. (Hughes 1999; Rubartelli und Sitia 1997). Das Laccase-Assay von NipA ohne Signalpeptid zeigte, dass die Sekretion von NipA ohne Signalpeptid nicht möglich ist. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass NipA über den konventionellen Sekretionsweg in Vesikeln aus dem Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert wird, wo die Vesikel mit Hilfe von SNARE-Proteinen mit der Membran fusionieren (Pantazopoulou 2016; Rothman 1994; Rothman und Wieland 1996). Obwohl die Sekretion in filamentösen Pilzen weitgehend gut charakterisiert ist, gibt es immer noch einige unbeantwortete Fragen im Zusammenhang mit der Sekretion und Translokation von Effektorproteinen und Virulenzfaktoren. In *M. oryzae* wurde nachgewiesen, dass es während der Infektion zwei verschiedene Sekretionsmechanismen für Effektoren gibt, wobei sich Cytoplasmatische und extrazelluläre Effektorproteine unterscheiden. Cytoplasmatische Effektoren, die im *biotrophic interfacial complex* (BIC) zu finden sind, werden auf unkonventionelle Weise ausgeschieden, während extrazelluläre,

apoplastische Effektoren dem herkömmlichen, vom Exocyst-Komplex abhängigen, Sekretionsweg folgen (Zhang und Xu 2014). Die Untersuchung der Sekretion von CyrA in einer Exocystmutante zeigte, dass die Lokalisation von CyrA-mCherry in der Infektionsblase von ExoA vermittelt wird (Wernet *et al.* 2021a). Die Analyse der Lokalisation von NipA in einer Exocystmutante könnte zeigen, ob dieser Proteinkomplex auch an der Sekretion früher Virulenzfaktoren beteiligt ist. Die Untersuchung des t-SNARES SsoA in *A. flagrans* zeigte eine Nematoden-abhängige Genregulation sowie eine Fallen-spezifische Lokalisation des SsoA-GFP Fusionsproteins. Deletion des *ssoA*-Gens führte zu einer verzögerten Paralyse gefangener Nematoden (Grünewald 2021). Obwohl SsoA in *A. flagrans* so mit der Virulenz des Pilzes in Verbindung gebracht wurde, blieb es unklar, inwiefern diese Rolle auf eine direkte Funktion bei der Sekretion von Virulenzfaktoren zurückzuführen ist. Es wurde bereits gezeigt, dass SNARE Komplexe in Pilzen eine große Variabilität in ihrer Lokalisation und Funktionsweise aufweisen. In Hefen wurden mindestens drei verschiedene Populationen von Sekretionsvesikeln beschrieben. Solche Analysen zeigen, dass es mehrere Wege für die Exocytose in filamentösen Pilzen gibt und dass SNARE Proteine in räumlich distinkten Stellen der Plasmamembran innerhalb der Pilz-Kolonie lokalisieren können (Adnan *et al.* 2023). Die Ko-Lokalisation von SsoA-GFP mit NipA-mCherry zeigt keine Akkumulation von SsoA-GFP, an den Stellen an denen NipA-mCherry vermutlich sekretiert wird. Dies deutet darauf hin, dass SsoA vermutlich keine Rolle bei der Sekretion früher Virulenzfaktoren wie NipA spielt. Die Ko-Lokalisation mit anderen SNARE-Proteinen, bzw. Proteinen der Sekretionsmaschinerie könnte in weiteren Analysen Aufschluss über die Funktionsweise der Sekretion von NipA geben. Neben der unkonventionellen Sekretion, wie sie beispielsweise bei der *U. maydis* Chitinase Cts1 beschrieben wurde, stellen extrazelluläre Vesikel (EV) eine weitere Möglichkeit der Sekretion dar (Reindl *et al.* 2019). Über die molekularen Mechanismen der Sekretion über EVs ist noch nicht viel bekannt, dennoch werden sie häufig mit Wirt-Pathogeninteraktionen in Verbindung gebracht. Sie bestehen aus Lipiddoppelschichten, haben eine Größe von 50-400 nm und setzen, nach der Fusion mit der Membran, ihren Inhalt in den Wirt frei (Oliveira *et al.* 2013; Rodrigues *et al.* 2008). Die Untersuchung von EVs in Wirt-Pathogeninteraktionen zeigten bereits, dass diese eine Rolle für intrazelluläre Intraspezieskommunikation sowie für die Pathogenität in *Cryptococcus neoformans* und *Sporothrix brasiliensis* spielen (Bitencourt *et al.* 2022; Huang *et al.* 2012; Ikeda *et*

al. 2018). Die Isolation extrazellulärer Vesikel aus *A. flagrans*, die beispielsweise bereits bei *Candida albicans* Biofilmen erfolgreich war, könnte zukünftig zeigen, ob diese Virulenzfaktoren wie NipA enthalten (Rizzo *et al.* 2020; Zarnowski *et al.* 2018). Kürzlich wurde zudem herausgefunden, dass die unkonventionelle Sekretion von Effektorproteinen in *M. oryzae* durch tRNA Modifizierung und Kontrolle der Codon Nutzung reguliert wird (Li *et al.* 2023). Ähnliche Prozesse könnten auch von Bedeutung für die Sekretion von Virulenzfaktoren in Nematoden-fangenden Pilzen sein.

Die Expression von NipA-GFP unter Verwendung eines konstitutiven Promotors führte zu einer Lokalisation in dynamischen Punkten, sowohl in Fallenstrukturen als auch im vegetativen Myzel. Die Expression von GFP, das mit dem NipA Signalpeptid fusioniert war und unter demselben Promotor exprimiert wurde, zeigte dasselbe Lokalisierungsmuster. Im Gegensatz dazu führte die Lokalisierung von NipA-GFP ohne Signalpeptid zu einer gleichmäßigen Cytoplasmatischen Verteilung. Eine Akkumulation der SP-GFP Fusion in ER-artigen Strukturen im vegetativen Myzel, wie es bei der SP-GFP Fusion von CyrA der Fall ist, konnte hier nicht beobachtet werden (Wernet 2021).

In neuroendokrinen Zellen von Säugetieren war zu beobachten, dass die Sekretion bestimmter Proteine erst durch einen Stimulus aktiviert wird (Loh *et al.* 2004). Ein solcher Stimulus könnte auch während des Fangens eines Nematoden induziert werden. Die Beobachtung der Translokation des NipA-GFP Signals von der Innenseite der Falle zu der tatsächlichen Penetrationsstelle könnte ein Indiz für einen solchen Stimulus darstellen. Zukünftige Studien könnten sich auf die Identifizierung von Proteinen zur Stimulusübertragung konzentrieren. Interessante Kandidaten könnten membranständige Rezeptoren wie die Zellwandstress-Rezeptoren WSC darstellen (Neeli-Venkata *et al.* 2021; Velez-Segarra *et al.* 2020).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Sekretionsmechanismen in *A. flagrans* vielfältig sind. Auch wenn die Effektoren NipA und CyrA in leeren Fallen ähnliche Lokalisationsmuster aufweisen, unterscheidet es sich während der Infektion stark. Signalpeptidstudien beider Proteine, weisen ebenfalls auf unterschiedliche Mechanismen hin. Distinkte Sekretionsmechanismen der einzelnen Effektorproteine sind hier wahrscheinlich. Es benötigt weitere Untersuchungen, um die Mechanismen hinter der Fallen-spezifischen Sekretion in *A. flagrans* zu entschlüsseln.

3.2 Die heterologe Expression von *nipA* in *C. elegans* gibt Hinweise auf dessen Funktion während der Infektion

Während der Infektion von Nematoden stellt die Kutikula die erste Barriere dar, auf die der Pilz trifft. Direkt nach der Kutikula erreicht er die Monoschicht der epidermalen Zellen, welche die Komponenten der Kutikula sekretieren (Singh und Sulston 1978). Durch die Lokalisation NipA-GFP wurde eine spezifische Akkumulation des Proteins an der Penetrationsstelle gezeigt. Zudem wurde durch die Etablierung eines geeigneten Virulenzassays gezeigt, dass die *nipA*-Mutante mehr Zeit benötigt, um in den Wirt einzudringen als der Wildtyp. Diese Beobachtung lassen auf eine Rolle von NipA während der Penetration von *C. elegans* schließen.

Zur Untersuchung eines Effekts von NipA in den äußeren Schichten von *C. elegans* wurden verschiedene Varianten von *nipA* in der Epidermis adulter Nematoden heterolog exprimiert. An einigen Nematoden war nach wenigen Tagen der *nipA* Expression die Bildung von Blasen in der Außenhülle zu beobachten. Blasenbildung ist eine morphologische Besonderheit, welche ausschließlich in adulten Nematoden beobachtet wird (Brenner 1974). Diese Beobachtung kann mit dem strukturellen Aufbau der adulten Kutikula erklärt werden, da diese als Einzige einen flüssigkeitsgefüllten Raum zwischen der kortikalen und der basalen Schicht besitzt (Peters *et al.* 1991). Trotz der Beschreibung des Phänotyps bereits im Jahr 1978 durch Sydney Brenner sind die zugrundeliegenden Ursachen noch nicht vollständig geklärt. Einige Blasenphänotypen sind auf mutierte Kollagene zurückzuführen, wie in BLI-1 und BLI-2 Mutanten (De Melo *et al.* 2002; Noble *et al.* 2020). Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch die inkorrekte Prozessierung der Kollagene durch die Mutation zuständiger Enzyme, wie BLI-3 oder BLI-4, zu dem entsprechenden Phänotypen führen kann (Thacker *et al.* 1995; Thein *et al.* 2009). In diesen Studien wurde zusätzlich ein Effekt der Mutationen auf die Entwicklung der Embryonen und Larven gezeigt. So entwickeln BLI-4 Mutanten im adulten Stadium Blasen die morphologisch vergleichbar mit den NipA induzierten Blasen sind. Einige Larven mit Mutation im *s90* Allel des *bli-4* Gens zeigten *dumpy* Phänotypen (Thacker *et al.* 1995). Die Tatsache, dass unter dem *col-19* Promotor, in adulten Tieren epidermal, exprimiertes *nipA* zur Blasenbildung, und die Expression von *nipA* in Embryonen und frühen Larvenstadien, unter den *eft-3* und *dpy-7* Promotoren, zu deformierten Larven führt, lässt demnach auf eine Wirkung von NipA auf kutikuläre Bestandteile schließen.

Die Genexpressionsanalyse *nipA* exprimierender Nematoden zeigte, dass Gene für die Stressreaktion, die eine Rolle in der Entgiftung spielen oder für die Pathogenerkennung benötigt werden, hochreguliert werden. Zusammen mit der Beobachtung der Lokalisation von ubiquitär exprimierten NipA-mCherry in den Vakuolen der Coelomocyten lässt auf einen aktiven Abbau schließen, welcher die Induktion der Transkription der Entgiftungsgene erklären könnte (Treusch *et al.* 2004). Unklar bleibt jedoch, warum die Expression der Kollagengene herunterreguliert wird. Medizinische Studien haben gezeigt, dass bei Verletzungen die Expression von Typ I und Typ III Kollagen hochreguliert wird, um die Wundheilung zu fördern (Singh *et al.* 2023). Die transkriptionelle Untersuchung anderer Blasen-Mutanten wie BLI-2 oder BLI-4 könnte Aufschluss darüber geben, ob auch hier eine solche Wundheilungsreaktion stattfindet, welche aber durch NipA unterdrückt werden könnte. Eine weitere interessante Beobachtung in der RNAseq Analyse *nipA* exprimierender Nematoden ist die Herunterregulierung einiger C-typ Lektine. C-typ Lektine stehen in Verbindung mit der Pathogenerkennung. In Vertebraten wird ihre Expression während inflammatorischer Prozesse hochreguliert. In *C. elegans* ist die Induktion der CLEC Expression Pathogen abhängig (Pees *et al.* 2021). Eine Möglichkeit für die Herunterregulierung in *nipA* exprimierenden Mutanten könnte eine aktive Vorbereitung auf die bevorstehende Infektion von *A. flagrans* sein. Allerdings ist noch nicht viel über die Regulierung der Expression der CLEC Gene in *C. elegans* bekannt, wodurch keine Aussage über einen möglichen Mechanismus von NipA in Bezug auf die Regulierung von Immunitätsgenen in *C. elegans* getroffen werden kann. Da es sich lediglich um die Genexpression von heterolog *nipA* exprimierenden Nematoden handelt, spiegelt diese nicht direkt die Situation im Interaktions-Kontext wider. Während der Interaktion von *C. elegans* und *A. flagrans* werden zahlreiche weitere Virulenzfaktoren sekretiert, die ebenfalls die Immunantwort beeinflussen können, so dass die isolierte Betrachtung eines Effekts von *nipA* nur begrenzte Informationen über die Signalweiterleitung im Wirt geben kann. Der Vergleich von Expressionsanalysen anderer Blasen-Mutanten mit den Daten der *nipA* exprimierenden Nematoden, kann Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss die Blasenbildung auf die Expression der CLEC Gene hat, um zu überprüfen, ob die beobachtete Regulation in *nipA*-Mutanten direkt von NipA beeinflusst wird, oder ob dies ein sekundärer Effekt durch die Veränderung der Kutikula ist.

Alles in allem deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Funktion von NipA während der Penetration von *C. elegans* durch *A. flagrans* hin. Zudem weisen heterologe Expressionsstudien darauf hin, dass die Kutikula das Zielgewebe von NipA ist. Zukünftige Analysen der Interaktion mit Bestandteilen der Kutikula und vergleichende RNAseq Analysen mit Nematoden Stämmen mit ähnlichen Phänotypen können dabei helfen, den Funktionsmechanismus von NipA vollständig aufzuklären und die Wirt-Pathogen Interaktion zwischen *A. flagrans* und *C. elegans* besser zu verstehen.

3.3 NipA besitzt Ähnlichkeiten zu EGF-Domänen enthaltenden Proteinen

Durch die Verbesserung bioinformatischer Werkzeuge und der Entwicklung neuer Algorithmen können Aminosäuresequenzen besser analysiert werden und so neue Erkenntnisse über das untersuchte Protein liefern. Durch das seit 2021 für die Allgemeinheit zugängliche, auf einem künstlichen neuronalen Netzwerk basierende Programm, AlphaFold zur Proteinstrukturmodellierung können Aussagen über Proteinstrukturen und die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Homo- oder Heterodimeren getroffen werden (Jumper *et al.* 2021). So wurde für den Virulenzfaktor ProA aus *Legionella pneumophila* zwar eine Interaktion mit monomeren Flaggelin (FlaA) berechnet, jedoch konnte auch gezeigt werden, dass im natürlich polymerisierten Zustand von FlaA die Spaltungsstellen für ProA nicht erreichbar sind, wodurch eine Interaktion ausgeschlossen werden konnte (Scheithauer *et al.* 2023). Dieses Beispiel zeigt sowohl die Vorzüge als auch die Limitierungen bioinformatischer Analysen, da die Vorhersagen immer noch experimentell bestätigt werden müssen.

Die Analyse der NipA-Sequenz mit AlphaFold ergab ein Modell mit einem Vertrauensmaß von 61,32. Die vorhergesagte Struktur ist demnach nur bedingt korrekt. Die durch ProtNLM bestimmte Ähnlichkeit zu EGF-Domänen enthaltenden Proteinen wurde dennoch anhand des AlphaFold Modells überprüft. Die für EGF-Domänen typischen doppelsträngigen beta-Faltblätter sind zweimal in der NipA-Sequenz zu finden, allerdings beinhalten sie nur zwei statt der typischen drei Disulfidbrücken. EGF-Domänen sind meist in den extrazellulären Bereichen membrangebundener Proteine zu finden (Appella *et al.* 1988; Doolittle *et al.* 1984; Engel 1989). In *C. elegans* sind ebenfalls viele EGF-Domänen enthaltende Proteine in der epidermalen Membran zu finden. MUP-4 und MUA-3 sind Proteine, welche die

ECM der Kutikula über die epidermalen Zellen mit den Muskeln, mit Hilfe von *fibrous organelles* (FOs) verbinden (Gatewood und Bucher 1997). FOs ähneln den Hemidesmosomen in Vertebraten, in welchen gezeigt wurde, dass deren Mutation zu blasenbildenden Krankheitsbildern führen können (Walko *et al.* 2015; Zhang und Labouesse 2010). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Mutation von MUA-3 oder MUP-4 zu einer Ablösung der Kutikula von den epidermalen Zellen führt, wobei die Verbindung zwischen Muskel und Epidermis bestehen bleibt (Bercher *et al.* 2001; Hong *et al.* 2001). MUP-4 wird zusätzlich eine Rolle als Rezeptor vorhergesagt, welcher für die Wahrnehmung von Verletzungen eine Rolle spielt. Zudem wurde gezeigt, dass RNA-Interferenz von MUP-4 zu einer Inaktivierung der Autophagie führt (Fu *et al.* 2022; Hong *et al.* 2001). Eine Bindung von NipA an MUA-3 oder MUP-4 könnte demnach die Integrität der Verbindung zwischen Kutikula und Epidermis stören, wodurch die Blasenbildung begünstigt wird. Während ein solcher Effekt von NipA in einem heterologen Expressions-Modell zur Blasenbildung führt, ist jedoch davon auszugehen, dass der Effekt bei der Interaktion zwischen Pilz und Nematode subtiler ist und sich auf eine bis zu wenigen Zellen beschränkt und daher nicht durch die Ausbildung von Blistern bemerkbar macht, sondern durch eine Erleichterung des Eindringens der Penetrationshyphe. Die Störung der Integrität der Kutikula wiederum kann sowohl in der heterologen Expression als auch bei der Interaktion die Aktivierung von Signalkaskaden des Immunsystems zur Folge haben. Eine solche, durch Überwachungsfunktionen des Wirts ausgelöste Immunantwort, wurde beispielsweise im Falle der Translationsinhibition durch Exotoxin A während *P. aeruginosa* Infektionen von *C. elegans* gezeigt (Dunbar *et al.* 2012). Eine weitere Möglichkeit interagierender Proteine stellen EGF-Rezeptoren (EGFR) selbst dar. Der EGFR Signalweg ist einer der wichtigsten Signalwege, welcher Wachstum, Zellteilung und Differenzierung in Säugetierzellen reguliert und die Überlebensrate steuern kann. (Wiley *et al.* 2003). Als EGFR in *C. elegans* wurde LET-23 identifiziert, welcher LET-3, ein EGF-ähnlicher Ligand, bindet, um LET-60/Ras/MAPK-Kaskade zu stimulieren. Die Ras/MAPK Kaskade wird für multiple Entwicklungsschritte benötigt, wie die Bildung der Vulva oder des Uterus (Aroian und Sternberg 1991; Chang *et al.* 1999). Außerdem wurde der EGF/EGFR Signalweg bereits mit *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen von *C. elegans* in Verbindung gebracht, wobei der EGFR Signalweg den *signal-regulated kinase* (ERK) Signalweg aktiviert. Dabei wirkt LIN-3 über LET-23, um die LET-60/MPK-1-Signalübertragung zu aktivieren. Dies zeigt, dass der EGFR-

Signalweg eine wichtige Rolle, sowohl in der Entwicklung von *C. elegans*, als auch bei dessen Immunantwort spielt und somit ein Ziel von NipA darstellen könnte (Zou *et al.* 2014). Ein Ziel, welches ebenfalls für die Entwicklung der Nematoden essenziell ist, würde die verringerte Schlüpftrate und deformierten Larven der *nipA* exprimierenden Nematoden erklären. In Krebszellen wurde gezeigt, dass beta-Catenin, aus dem Wnt-Signalweg, einen Komplex mit EGFR bildet, wodurch das Eindringen und die Metastasenbildung von Krebszellen verstärkt wird. Der EGFR-Signalweg kann in diesen Zellen auch über den Wnt-Rezeptor Frizzled aktiviert werden, während EGFR über den PI3k/Akt Signalweg das beta-Catenin aus dem Wnt-Signalweg aktiviert (Hu und Li 2010). BAR-1 ist eines der drei beta-Catenine, welches in *C. elegans* im kanonischen Wnt-Signalweg phosphoryliert wird und zu einer spezifischen Genregulation führt (Costa *et al.* 1998; Eisenmann *et al.* 1998). Während der späten Larvenentwicklung reguliert BAR-1 eine bestimmte Untergruppe von Kollagenen, welche für die Bildung der adulten Kutikula eine Rolle spielen, während es in älteren Nematoden zu einer Aktivierung von Immunitätsgenen gegen *Staphylococcus aureus* führt (Irazoqui *et al.* 2008; Jackson *et al.* 2014). Vergleichende Expressionsanalysen von BAR-1 Mutanten und den *nipA*-exprimierenden Nematoden dieser Arbeit mittels GeneMania zeigen eine gewisse Überschneidung in den regulierten Genen und finden sich in von WormBase vorhergesagten gemeinsamen Expressionsclustern wieder (Bond *et al.* 2014; Grove *et al.* 2018; Warde-Farley *et al.* 2010). Die Überschneidung mehrerer Signalwege, welche EGF und EGFR beinhalten, erschweren die Einordnung der Funktionsweise von NipA während der Infektion von *C. elegans*, jedoch stellen auch diese Gemeinsamkeiten in den regulierten Genen eine Verbindung zum Wnt-Signalweg und damit eine mögliche Hypothese für das Ziel von NipA her. In weiterführenden Analysen muss geklärt werden, ob die differenzielle Genregulierung ein primärer oder sekundärer Effekt der *nipA* Expression ist. Dafür könnte NipA beispielsweise unter einem induzierbaren Promotor, wie dem Hitzeschock induzierten *hsp-16.41* oder durch das chemisch induzierbare Q-System, exprimiert werden und die Genexpression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion gemessen werden (Bacaj und Shaham 2007; Monsalve *et al.* 2019). Bei einer primären Regulierung durch NipA sollten bereits früh eine Veränderung der Genregulation, von zum Beispiel den Kollagenen, zu beobachten sein, während ein sekundärer Einfluss von NipA später nach der Induktion zu einem regulatorischen Effekt führen würde.

Generell ist die Bildung der NipA induzierten Blasen eine artifizielle Beobachtung, da die Nematodenzellen deutlich mehr NipA produzieren, als es in der tatsächlichen Infektion zum Einsatz kommt. Zudem befindet sich NipA durch die heterologe Expression in einem deutlich größeren Bereich des Gewebes, als in den punktuellen Penetrationsstellen während der Infektion, wodurch eine größere Angriffsfläche für NipA entsteht. Dennoch kann eine Schwächung der Kutikula aufgrund von NipA postuliert werden, wobei die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind.

3.4 TrsA ist ein neuer putativer Virulenzfaktor

Die Untersuchung des genetischen Kontextes von NipA hatte zur Entdeckung eines Egh-16 ähnlichen Virulenzfaktors geführt. Die Expression von *trsA* wurde durch die Ko-Inkubation mit Nematoden induziert, wodurch auf eine Rolle während der Infektion geschlossen werden kann. Die bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz von TrsA ergab, neben einem Signalpeptid am N-terminus, eine Egh-16 ähnliche Virulenzfaktordomäne. Egh-16 ähnliche Proteine werden im Reisbrandpilz *M. oryzae* in Verbindung mit der Appressorienbildung gebracht. GAS1 und GAS2 Mutanten, homologe Proteine zu Egh-16 aus *E. graminis*, sind nicht mehr in der Lage Pflanzen zu penetrieren. Lokalisationsstudien der Proteine, zeigten eine Ansammlung im Cytoplasma der Appressorien (Xue *et al.* 2002). Appressorien sind Infektionsstrukturen pflanzenpathogener Pilze. Sie sekretieren verschiedene Proteine, mit welchen sie an der Wirtspflanze haften bleiben, um schließlich durch die Sekretion von lytischen Enzymen und unter Aufwendung von Druck in die Wirtszelle eindringen können (Cruz-Mireles *et al.* 2021). Dieser Mechanismus ist ähnlich zu dem der in *A. flagrans* beobachtet wird. Die Fallen sekretieren unter anderem klebrige Polymere, durch welche der Nematode in der Falle festgehalten wird. Nach einiger Zeit formt sich eine Penetrationshyphe, welche mittels Drucks und lytischer Enzyme in den Nematoden einwächst (Tunlid *et al.* 1991; Veenhuis *et al.* 1985). Die Lokalisation von TrsA-GFP war, wie bei GAS1 und GAS2, auf den Infektionsbereich beschränkt, wobei TrsA-GFP hauptsächlich über den gesamten Kontaktbereich mit dem Nematoden verteilt war, als an der spezifischen Penetrationsstelle. Im Falle der Egh-16 ähnlichen Proteine GAS1 und GAS2 ist noch nicht vollständig geklärt, ob sie sekretiert werden oder nicht (Xue *et al.* 2002). Im Bezug darauf sollte zukünftig die Funktionalität des Signalpeptids von TrsA mit Hilfe eines Laccase-Reporter-Assays untersucht werden.

Die Ko-Lokalisation von TrsA-GFP und NipA-mCherry zeigte eine ähnliche, aber doch distinkte Lokalisation während der Infektion von *C. elegans*. Während NipA-mCherry nah an der Penetrationsstelle akkumulierte, verteilte sich TrsA-GFP an dessen Rand. Da die hier beobachtete Lokalisation von TrsA etwas von der abweicht, die in der Einzellokalisierung beobachtet wurde, sollte in weiterführenden Studien eine mögliche Interaktion zwischen NipA und TrsA untersucht werden, welche womöglich durch die C-terminale Markierung beider Proteine beeinflusst wurde. Dazu eignen sich Methoden wie BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*), womit auch die unterschiedlichen Termini markiert werden können, um die Interaktionsseite zu identifizieren (Kudla und Bock 2016). Mit einer massenspektrometrischen Analyse könnten weitere potenziell an der Infektion beteiligten Proteine identifiziert werden. In *U. maydis* wurde so ein membranständiger Effektorcomplex entdeckt und dessen Funktionsweise entschlüsselt (Ludwig *et al.* 2021). Infektionsanalysen der *trsA*-Deletionsmutante und der *nipA-trsA*-Doppeldeletionsmutante können in weiterführenden Arbeiten Aufschluss über die Funktionsweise beider Proteine während der Infektion liefern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei TrsA um einen putativen Virulenzfaktor handelt. Durch die Größe von 483 AS kann er zwar nicht mehr zu den kleinen sekretierten Proteinen (SSPs) gezählt werden, dennoch weist er eine Vielzahl an Eigenschaften auf, welche ihn als Virulenzfaktor einstufen: ein Signalpeptid am N-terminus, eine bereits in anderen Virulenzfaktoren beschriebene Domäne, so wie eine spezifische Genregulierung während der Infektion. Zusätzlich besitzt TrsA, wie NipA, eine ungerade Anzahl an Cysteinen, welche ihn als potenziellen Interaktionspartner für NipA interessant machen.

3.5 Fazit und Modell

In dieser Studie wurde das kleine sekretierte Protein NipA aus *A. flagrans* weitreichend analysiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Protein an der Penetration von *C. elegans* durch *A. flagrans* beteiligt ist. Es wurde deutlich, dass die Expression und Sekretion verschiedener Effektoren fein aufeinander abgestimmt sind. Die Entschlüsselung dieser Abläufe bedarf weiterer Untersuchungen (Abbildung 26). Ebenso gilt es noch zu klären, ob genregulatorische Effekte im Wirt durch den Effektor direkt oder durch die zellbiologischen Veränderungen, die er verursacht, ausgelöst

werden. Zukünftig sollten Virulenzfaktoren nach ihrem Auftreten während der Infektion charakterisiert werden (früh = Penetration; mittel = Infektionsblase/Immunität; spät = trophische Hyphen/Verdauung). Dabei kann die Lokalisierung der Akkumulierungen verschiedener Virulenzfaktor-Fusionsproteine von Nutzen sein. Zur Untersuchung potenzieller transkriptionsverändernden Eigenschaften von Effektoren, können RNAseq Analysen verschiedener Infektionszeitpunkte mehr Aufschluss liefern.

Alles in allem hat diese Arbeit gezeigt, dass die Analyse von Virulenzfaktoren von *A. flagrans* großes Potential für die Untersuchung der Interaktion von pilzlichen Pathogenen mit eukaryotischen Wirten bietet. Die Mechanismen, welche die Pilze anwenden, um die epithelialen Barrieren des Wirts zu durchbrechen können aufgrund des hohen Konservierungsgrades zwischen Nematoden und Säugern auch Aufschluss über Pathogenitätsmechanismen relevanter Humanpathogene liefern (Chisholm und Hsiao 2012).

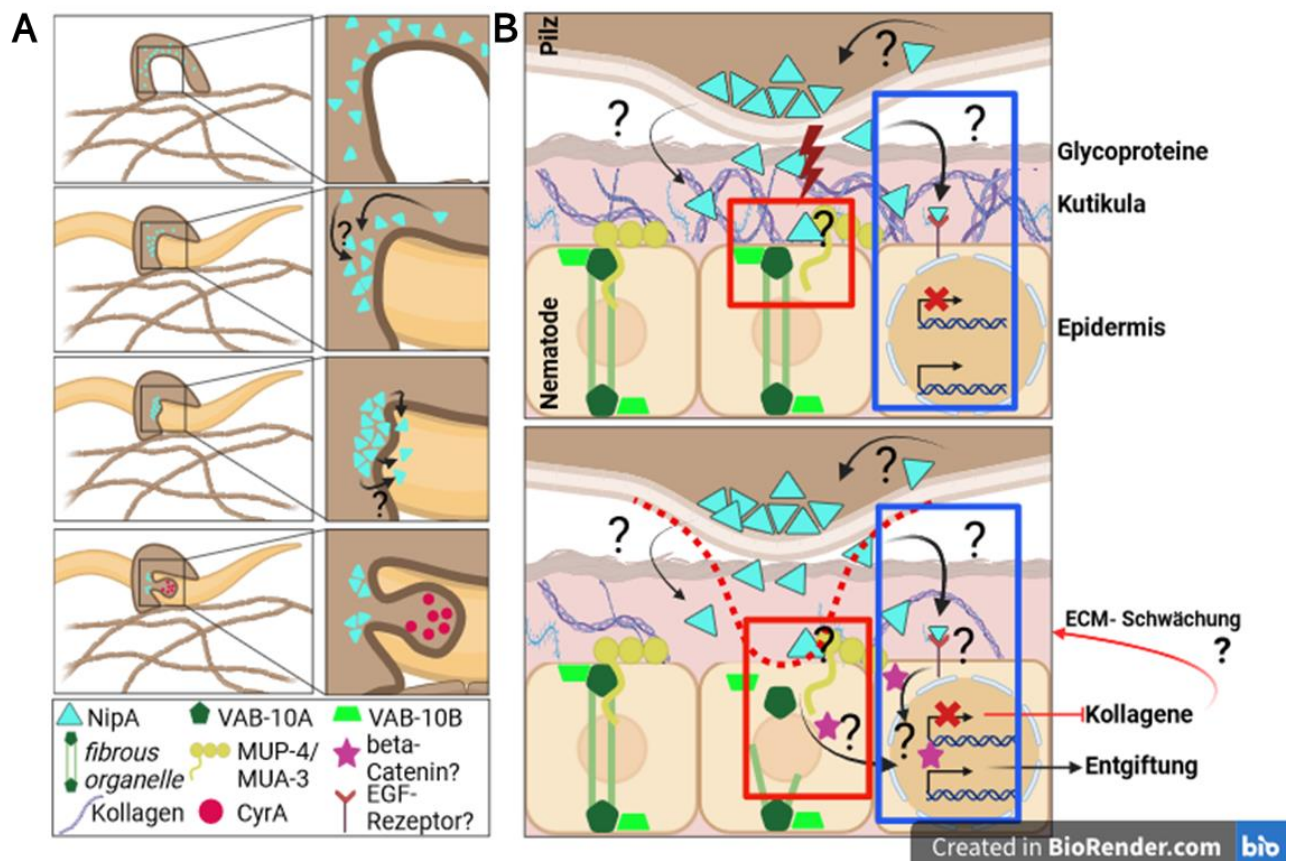


Abbildung 26: Modell der zeitlichen Abfolge der Infektion von *C. elegans* durch *A. flagrans*. (A)

Lokalisierungsveränderung von NipA während der Infektion. In leeren Fällen ist NipA an der Innenseite der Falle verteilt. Sobald ein Nematode gefangen ist sammelt sich NipA durch unbekannte Stimuli und Transportwege an einer bestimmten Stelle. An der Stelle an der NipA stark akkumuliert bildet sich eine Penetrationshyphse aus. Die Sekretionsmechanismen von NipA sind noch nicht bekannt. Nach

erfolgreicher Penetration bildet sich eine Infektionsblase, in welcher andere Effektorproteine wie CyrA, lokalisieren. NipA verbleibt jedoch an der Penetrationsstelle. **(B)** An einer Stelle mit erhöhter NipA Konzentration bildet sich die Penetrationshyphe aus. Sekretiertes NipA könnte hier beispielsweise in die Kutikula eindringen und an EGF-haltige membranassoziierte Proteine wie MUP-4 binden und so die Verbindung zu den *fibrous organelles* (FO) stören wodurch eine Schwächung der Zell-ECM Verbindung verursacht wird. Dabei könnten Risse oder Schwachstellen in der Kutikula entstehen, wodurch die Penetration durch den Pilz erleichtert wird. Als sekundärer Effekt könnte dadurch eine EGFR-ähnliche Signalkaskade aktiviert werden, welche möglicherweise beta-Catenin beinhaltet und so eine Veränderung der Genexpression des Nematoden auslöst (roter Kasten). Eine weitere Annahme ist, dass NipA primär die Genexpression des Wirtes, durch Bindung an EGF-ähnliche Rezeptoren, verändert. Als Regulator könnte auch hier beta-Catenin eine Rolle spielen (blauer Kasten). Die Herunterregulierung der Expression von Kollagenen könnte dadurch die ECM der Kutikula schwächen, wodurch der Pilz leichter in den Nematoden einwachsen kann (rote gestrichelte Linie). Das Schema wurde mit BioRender erstellt.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Organismen, Vektoren und Materialien

Stämme

Escherichia coli Stämme

Tabelle 5: In dieser Tabelle sind alle verwendeten *E. coli* Stämme aufgeführt. Für Klonierungen wurde der *E. coli* Stamm Top10 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
Top 10	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 ^R	Invitrogen, Karlsruhe
OP50	<i>ura-</i>		Institut für Biologie III, Bioinformatik und Molekulargenetik, Freiburg

Arthrobotrys flagrans Stämme

Tabelle 6: In folgender Tabelle werden alle verwendeten sowie in dieser Arbeit hergestellten *A. flagrans* Stämme aufgeführt.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Herkunft
sJM01	Δ <i>nipA</i> pJM06	Hyg ^R	(Menzner 2020)
sJM03	<i>oliC(p)::nipA::GFP</i> pJM08	Hyg ^R	(Menzner 2020)
sJM05	<i>nipA(p)::nipA::GFP</i> pJM01	Hyg ^R	(Menzner 2020)
sJM11	<i>oliC(p)::SPΔ<i>nipA</i>::GFP</i> pJM22	Hyg ^R	Diese Arbeit
sJM13	<i>trsA(p)::trsA::GFP</i> pJM29	Hyg ^R	Diese Arbeit
sJM14	sVW10 x <i>trsA(p)::h2b::mCherry</i> pJM30	Hyg ^R ; g418 ^R	Diese Arbeit
sJM15	sVW10 x <i>nipA(p)::h2b::mCherry</i> pJM10	Hyg ^R ; g418 ^R	Diese Arbeit
sJM16	Δ <i>nipA</i> + <i>trsA</i> pJM27	Hyg ^R	Diese Arbeit

sJM42	<i>gpdA(P)::nipA^{ΔSP}::lcc^{ΔSP}</i> pJM68	Hyg ^R	Diese Arbeit
sJM43	<i>cyrA(p)::cyrA::mCherry</i> pNH94	g418 ^R	Diese Arbeit
sJM44	sJM01 x <i>cyrA(p)::cyrA::mCherry</i> pNH94	Hyg ^R ; g418 ^R	Diese Arbeit
sJM45	<i>oliC(p)::nipA^{ΔSP}::GFP</i> pJM90	Hyg ^R	Diese Arbeit
sJM46	sJM16 x <i>cyrA(p)::cyrA::mCherry</i> pNH94	Hyg ^R ; g418 ^R	Diese Arbeit
sJM47	<i>ΔtrsA</i> pJM28	Hyg ^R	Diese Arbeit
sJM48	sJM13 x <i>nipA(p)::nipA::mCherry</i> pJM16	Hyg ^R ; g418 ^R	Diese Arbeit
sJM49	sTG14 x <i>nipA(p)::nipA::mCherry</i> pJM16	Hyg ^R ; g418 ^R	Diese Arbeit
sTG14	<i>ssoA(p)::ssoA::GFP</i> pTG21	Hyg ^R	(Grünewald 2021)
sVW10	<i>h2b(p)::h2b::GFP</i> pJW04	g418 ^R	(Wernet <i>et al.</i> 2021b)
Wildtyp	-	-	CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht

***Caenorhabditis elegans* Stämme**

Tabelle 7: In dieser Tabelle sind die verwendeten, so wie die in dieser Arbeit hergestellten *C. elegans* Stämme aufgeführt.

Stamm	Marker	Genotyp	Herkunft
GOU2043	-	<i>vab-10a(cas602[vab-10a::gfp]) I</i>	CGC
GS2478	-	<i>arls37 I; dpy-20(e1282) IV; cup-8(ar466)</i>	CGC
KIT39	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>eft-3(p)::scarlet</i> x N2	Diese Arbeit
KIT40	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>eft-3(p)::nipA::mScarlet</i> x N2	Diese Arbeit
KIT41	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>eft-3(P)::mScarlet</i> x GS2478	Diese Arbeit
KIT42	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>eft-3(p)::nipA::mScarlet</i> x GS2478	Diese Arbeit
KIT44	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>dpy-7(p)::nipA::mScarlet</i> x N2	Diese Arbeit
KIT45	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>col-19(P)::nipA::mScarlet</i> x N2	Diese Arbeit
KIT46	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>col-19(P)::mScarlet::</i> x N2	Diese Arbeit
KIT48	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>col-19(P)::nipA^{ΔSP}::mScarlet</i> x N2	Diese Arbeit
KIT49	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	<i>col-19(P)::nipA</i> x N2	Diese Arbeit

KIT50	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>col-19(p)::mScarlet</i>	x	Diese Arbeit GS2478
KIT51	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>col-19(P)::nipA::mScarlet</i>	x	Diese Arbeit GS2478
KIT52	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>dpy-7(p)::mScarlet</i>	x N2	Diese Arbeit
KIT53	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>dpy-7(p)::mScarlet</i>	<i>col-19(p)::nipA</i>	Diese Arbeit x N2
KIT54	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>col-19(p)::nipA::mScarlet</i>	x	Diese Arbeit GOU2043
KIT55	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	<i>col-19(P)::nipA</i>	x	Diese Arbeit GOU2043
KIT56	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>col-19(p)::trsA::mScarlet</i>	x	Diese Arbeit N2
KIT57	<i>myo-2(p)::GFP</i>	<i>col-19(p)::nipA^{ΔCys}::mScarlet</i>	x	Diese Arbeit x N2
KIT58	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	<i>eft-3(p)::nipA::mScarlet; unc-122(p)::GFP</i>	x	Diese Arbeit x N2
N2	-			Institut für Biologie III; Bioinformatik und Molekulargenetik, Freiburg

Plasmide

Tabelle 8: In dieser Tabelle sind die verwendeten, sowie die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide aufgeführt.

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
pJM01	<i>nipA(p)::nipA::GFP::gluC(T)</i>	ampR; HygR	(Menzner 2020)
pJM06	$\Delta nipA$ x <i>pJET1.2</i>	ampR; HygR	(Menzner 2020)
pJM10	<i>nipA(p)::h2b::mCherry</i>	ampR; HygR	(Menzner 2020)
pJM16	<i>nipA(p)::nipA::mCherry</i>	ampR; g418	(Menzner 2020)
pJM22	<i>oliC(P)::SP^{ΔnipA}::GFP</i>	ampR; HygR	Diese Arbeit
pJM27	$\Delta trsA$ x <i>pJET1.2</i>	ampR; HygR	Diese Arbeit
pJM28	$\Delta\Delta nipA+$ <i>trsA</i> x <i>pJET1.2</i>	ampR; HygR	Diese Arbeit
pJM29	<i>trsA(p)::trsA::GFP</i>	ampR; HygR	Diese Arbeit
pJM30	<i>trsA(p)::h2b::mCherry</i>	ampR; HygR	Diese Arbeit
pJM32	<i>col-19(P)::nipA</i>	ampR	Diese Arbeit
pJM36	<i>col-19(P)::nipA^{ΔSP}::mScarlet</i>	ampR	Diese Arbeit
pJM46	<i>col-19(P)::nipA::mScarlet</i>	ampR	Diese Arbeit
pJM68	<i>gpdA(P)::nipA^{ΔSP}::lcc^{ΔSP}</i>	ampR; HygR	Diese Arbeit
pJM72	<i>col-19(P)::mScarlet</i>	ampR	Diese Arbeit
pJM81	<i>dpy-7(p)::nipA::mScarlet</i>	ampR	Diese Arbeit
pJM85	<i>eft-3(p)::nipA::mScarlet</i>	ampR	Diese Arbeit
pJM86	<i>eft-3(p)::mScarlet</i>	ampR	Diese Arbeit

pJM90	<i>oliC(p)::nipA^{ΔSP}::GFP::gluCT</i>	ampR; HygR	Diese Arbeit
pJM91	<i>dpy-7(p)::mScarlet</i>	ampR	Diese Arbeit
pJM92	<i>col-19(p)::nipA^{ΔCys}::mScarlet</i>	ampR	Diese Arbeit
pJM94	<i>col-19(p)::trsA::mScarlet</i>	ampR	Diese Arbeit
pNH94	<i>cyrA(p)::cyrA::mCherry</i>	ampR; g418R	Nicole Wernet

Oligonukleotide

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide in 5' -> 3'- Richtung angegeben.

Name	Sequenz	Verwendung
5408_LB_trpCT _OL_fwd	TTAGAAAGACATCAGTTCATCAACA TGAAAGGCGCTATCCTCATTAT	TrsA-GFP Fusion
5408_LB_gfp_O L_rev	GTTGATGAACTGATGTCTTTCTAAAT G	TrsA-GFP Fusion
5408_down_rev	TTGTCTCGAATAATGGTACGTGGGC CCTGTGAAATTGTTATC	analytische PCR
5408_up_fwd	ACGTACCATTATTTCGAGACAACCTG	analytische PCR
5408_LB_fwd	GAAAGACATCAGTTCATCAACATGG TCAGCAAGGGAGAGG	analytische PCR
5408_LB_fwd	TAGAAAGACATCAGTTCATCAACAT GCATTTCTCCACTCTTTTGAC	analytische PCR
5408_RB_rev	GCGGCCGATGCGGAGCTCCTGCAG TTACTTGTAGAGCTCGTCCATTC	doppel KO PCR produkt von pJM27
nipA_SP_col- 19_OL_fwd	ATCCGTACATGAATTGTGGGG	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>col-19(p)</i>
col-19(P)_rev	ACCGGTATGGTCAGCAAGG	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>col-19(p)</i>
col- 19(P)_pPF37_O L_rev	CCTTGCTGACCATACCGGTGGCTTC CTCGTCGGGGAT	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>col-19(p)</i>
col-19(P)_fwd	GAAAGACATCAGTTCATCAACATGG TCAGCAAGGGAGAGG	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>col-19(p)</i>
scar_col- 19P_OL_fwd	ATGGTCAGCAAGGGAGAGG	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>col-19(p)</i>
nipB_col- 19P_OL_fwd	ACTGCCTCTCCCTTGCTGACCATGA GCAAAGTGTTCCTCAACTG	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>col-19(p)</i>
dpy- 7P_ppf37_OL_f wd	GCC TCT CCC TTG CTG ACC ATT TAT CTG GAA CAA AAT GTA AGA ATA TT	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>dpy-7(p)</i>
dpy- 7P_nipA_OL_re v	CTCCCTTGCTGACCATACCGGTTTC TCGATGAAATCTCAACTTATATG	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>dpy-7(p)</i>

peft-3_pPF37_OL_fwd	TACACACCTGTTACCCCACC	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>eft-3(p)</i>
peft-3_nipA_OL_rev	GAAGAGCCAAGACCCCTTCT	Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>eft-3(p)</i>
gfp_noATG_fwd	GATTCCAGCGGTTGTCCTTC	GFP-Fusion
scarlet_fwd	GAATAGCCATTGCCCTCGTG	mScarlet amplifikation
scar_Pst_unc54_3UTR_rev	AGAGCTTAACGACCCAGCTT	mScarlet Fusion in <i>C. elegans</i>
scarlet_mid_rev	ACTGCTACACCAACATCCCA	mScarlet Fusion in <i>C. elegans</i>
AgeI_scarlet_fwd	CCGCATACAAAGATCGGAGC	mScarlet Fusion in <i>C. elegans</i>
nipA_noStopp_scar_OL_rev	TCCGACGACGTTAAGTAGCA	mScarlet Fusion in <i>C. elegans</i>
nipB_scar_OL_rev	TTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATG GGTGGCTATATACACATTC	mScarlet Fusion in <i>C. elegans</i>
scar_col-19P_OL_fwd	AATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCC AAAGTCTTGGTGCACAAAAGT	mScarlet unter <i>col-19(p)</i>
dpy-7P_scar_OL_rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTT CTTGAAAGAGTGTCTCGGTTTT	mScarlet unter <i>dpy-7(p)</i>
peft-3_scarlet_OL_rev	CGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAG ATCTGCATATTTCCAACGCGCA	mScarlet unter <i>eft-3(p)</i>
nipA_SP_fwd	TTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATG GGTGGCTATATACACATTC	<i>nipA</i> amplifikation
nipA_noSP_oliC_P_OL_fwd	AATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCC AAAGTCTTGGTGCACAAAAGT	NipA-GFP Fusion unter <i>oliC(p)</i> ohne SP
LccC_tgluC_OL_rev	GGGTGGCTATATACACATTC	NipA-Laccase Fusion ohne SP
gpd_P_flagrans_fwd	AATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCC ACTGCATATTTCCAACGCGCA	NipA-Laccase Fusion ohne SP
nipA_noStopp_Lcc_OL_rev	CCTCACCTTGGAACTTAATTAATT CTCGATGAAATCTCAACTTATAT	NipA-Laccase Fusion ohne SP
nipA_noSP_gpdA(P)_OL_fwd	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTC GTCCTACAAATTACAGCAATGG	NipA-Laccase Fusion ohne SP
p5408_pJM10_OL_fwd	CTTTTCGGCGGCGGCTTTTGGTGG CATCTTGAAAGAGTGTCTCGGTTTT	Promoter-Fusion
p5408_h2B_OL_rev	GTGCCGATTCGAGTCGTC	Promoter-Fusion
5408_RT_fwd	TCACTCTACTGCACGGGC	qRT PCR genetischer Kontext <i>nipA</i>
5408_RT_rev	CATATTCCTAATGTGTGGCGG	qRT PCR genetischer Kontext <i>nipA</i>
5403_RT_fwd	AACTTCACAAGGAAACCTCGG	qRT PCR genetischer Kontext <i>nipA</i>
5403_RT_rev	TGTCGTGCGTTGTCGTGTG	qRT PCR genetischer Kontext <i>nipA</i>

5405_RT_fwd	CATACATCTTATCTACATACGCTAGA CACCCGAATCATACTG	qRT PCR genetischer Kontext <i>nipA</i>
5405_RT_rev	GGTATCTATTACATTGCATTGCG	qRT PCR genetischer Kontext <i>nipA</i>
5406_RT_fwd	TGCTCAAAGACCCAAGAACCGGTG GCTTCCTCGTCGGGGAT	qRT PCR genetischer Kontext <i>nipA</i>
5406_RT_rev	AGCAGACATCACAGGCGCGCCATG CCGACCGTAAGTGCCCAAG	qRT PCR genetischer Kontext <i>nipA</i>
Nlp- 29_Ce_RT_FW	CATCACATCACAATCGATCCAACCA TGCCGACCGTAAGTGCCCAAG	qRT PCR <i>nlp-29</i>
Nlp- 29_Ce_RT_RV	AATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCC ACTGCATATTTCCAACGCGCA	qRT PCR <i>nlp-29</i>
qpcr_hk_actin2_ fwd	CCTCACCCCTTGAAACTTAATTAATT CTCGATGAAATCTCAACTTATAT	qRT-PCR Haushaltsgen <i>A.</i> <i>flagrans</i>
qpcr_hk_actin2_ rev	CATATTCCTAATGTGTGGCGG	qRT-PCR Haushaltsgen <i>A.</i> <i>flagrans</i>
5408_SB_for	TACCTCACCCCTTGAAACCGGAGC GGCGGTTGCTAG	SouthernBlot analyse
5408_SB_rev	GTTTCCAAGGGTGAGGTAAG	SouthernBlot analyse
nipA_SP_gfp_n oATG_OL_rev	CATACATCTTATCTACATACGCTAAG CGGCCGCTTTGTAAAG	SP-GFP unter <i>oliC(p)</i>
gfp_noATG_fwd	TCACATCACAATCGATCCAACCATG AAAGGCGCTATCCTC	SP-GFP unter <i>oliC(p)</i>
gfp_tgluC_OL_r ev	CACATCACAATCGATCCAAGAATTC ATGAAAGGCGCTATCCTCATTAT	SP-GFP unter <i>oliC(p)</i>
nipA_SP_olic(P) _OL_fwd	ATGAAAGGCGCTATCCTCATTAT	SP-GFP unter <i>oliC(p)</i>
nipA- SP_EcoRI_Poli C_OL_fwd	CGGATAACAATTTACAGGGCCCTC GAAAGTCTCTCCGGTAG	SP-GFP unter <i>oliC(p)</i>
nipA_noStopp_g fp_OL_rev	TGAGGATAGCGCCTTTTCATTTATCT GGAACAAAATGTAAGAATATT	SP-GFP unter <i>oliC(p)</i>
RB_5408_pJet_ OL_rev	GGATAACAATTTACAGGGCCCGCA CCTTTGGTCTTTTATTGTCAAC	<i>trsA</i> Deletion
RB_5408_trpCT _OL_fwd	GATAATGAGGATAGCGCCTTTCATG AGCAAAGTGTTTCCCAACTG	<i>trsA</i> Deletion
LB_5408_trpCP _OL_rev	TCCAGACTGCCTCCCAGT	<i>trsA</i> Deletion
LB_5408_pJET_ OL_fwd	AGGTCTTTTCTGACGTCGAC	<i>trsA</i> Deletion
RB_5408_pJet_ OL_rev	CTCTTCAATTCTTGTTCTTGTCG	<i>trsA</i> Deletion
RB_5408_trpCT _OL_fwd	CCTCCATACATTCCGCGTC	<i>trsA</i> Deletion
5408_LB_trpCT _OL_fwd	TACTTACCTCACCCCTTGAAACGG CTTCCTCGTCGGGGATAC	TrsA-GFP Fusion
5408_LB_gfp_O L_rev	GTTTCCAAGGGTGAGGTAAG	TrsA-GFP Fusion

4.2 Verwendete Geräte und Chemikalien

Chemikalien und Enzyme

Sofern im Text nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Chemikalien von den folgenden Unternehmen bezogen: Roth (Karlsruhe), Biozym (Hamburg), AppliChem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Macherey-Nagel (Düren), Zymo Research (Freiburg), Invitrogen GmbH (Karlsruhe) und Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim). Die Enzyme und Größenmarker, die in der Studie verwendet wurden, stammten von New England Biolabs (Frankfurt) und Fermantas (St. Leon-Rot).

Kits

Tabelle 10: 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 DIGSonden 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 11: In dieser Tabelle sind alle verwendeten Geräte mit Hersteller aufgelistet.

Gerät	Typ	Hersteller
Autoclav	3870ELV	Tuttnauer, Breda
Inkubatoren	Mintron AL 72 Heraeus 6000 Incu-Line 250R	Infors HAT, Bottmingen-Basel Heraeus, Instruments Hanau VWR
Gel Doc	FAS-V	Nippon Genetics
Gelelektrophoresekammer	Mupid-exU Mini Set	Protean Advance, Tokyo Bio Rad, München

Gefrierschrank (-80°C)	Innova U101	New Brunswick Scientific, Hamburg
Hybridisierungssofen	HB-1000 Hybridizer	UVP, Cambridge
Vortex	Vortex-Genie2	Scientific Industry, Inc., New York
PCR-Cycler	Labcycler iCycler IQ	SensoQuest, Göttingen Bio-Rad, Kalifornien USA
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Photospektrometer	Nanodrop Nd 1000	Peqlab, Erlangen
Zentrifugen	Eppendorf 5415R AccuSpin Micro 17 Universal 320 R	Eppendorf, Hamburg Fisher Scientific, Schwerte Hettich, Tuttlingen
Mikroskope	Axio Imager Z1 LSM 900 Axio Observer Z1	Zeiss, Jena Zeiss, Jena Zeiss, Jena
Mikroinjektor	FemtoJet4i	Eppendorf, Hamburg
Stratalinker	BLX-E254	Peqlab Biotechnologie GmbH

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 aus *E. coli*-Transformanten durch alkalische Lyse isoliert. Zunächst wurde eine 1,5-ml-Übernachtskultur bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für eine Minute zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen, und das erhaltene Zellpellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer gelöst. Anschließend wurden 200 µl Lysis-Puffer hinzugefügt, und die Lösung wurde durch Invertieren vermischt. Um die Proteine zu fällen, wurde zu dieser Lösung 200 µl einer 1,5 M Kaliumacetatlösung (pH 4,8) gegeben, und die Mischung wurde dann 10 Minuten lang bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Für die Fällung der DNA wurde der Überstand in Reaktionsgefäße überführt und mit 500 µl

100 % Isopropanol versetzt und 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Die DNA wurde nach dieser Zeit 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das erhaltene DNA-Pellet bei 55 °C getrocknet und in 20 µl destilliertem Wasser (dH₂O) für 10 Minuten gelöst.

Tabelle 12: Lösungen für die Präparation von Plasmid-DNA.

Puffer	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCL pH 7,5 10 mM Na ₂ -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

Die Plasmid-DNA-Extraktion für bereits verifizierte Stämme, die für die Transformation von *A. flagrans* und *C. elegans* verwendet wurden, erfolgte unter Verwendung des Macherey Nagel NucleoSpin Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde schließlich in 50 µl destilliertem Wasser (dH₂O) eluiert.

Präparation von genomischer DNA aus *A. flagrans*

Die genomische DNA aus *A. flagrans* wurde in einem mehrstufigen Verfahren isoliert. Zunächst wurden Sporen von einer 7-tägigen PDA-Petrischale mithilfe einer Impföse in flüssiges PDM in eine 3,5 cm Petrischale übertragen und für einen Zeitraum von 48 Stunden bei einer Temperatur von 28 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Kahmhaut in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit 700 µl Lysispuffer versetzt. Die Proben wurden für 60 Minuten bei einer Temperatur von 68 °C auf einem Thermomixer geschüttelt, um den Zellaufschluss zu ermöglichen. Die Proteine wurden durch Zugabe von 200 µl 3 M Kaliumacetat-Puffer auf Eis gefällt, wobei das Reaktionsgefäß alle 5 Minuten invertiert wurde. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm für 15 Minuten wurde 500 µl des Überstands in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol für 20 Minuten bei -20 °C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C) wurde das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA für 5 Minuten bei 55 °C getrocknet und in 50 µl TE-Puffer

mit 50 µg/ml RNase A bei einer Temperatur von 68 °C unter Schütteln gelöst. Dieses Verfahren ermöglichte die Isolierung der genomischen DNA aus *A. flagrans*.

Tabelle 13: Puffer für die Isolation genomischer DNA aus *A. flagrans* Flüssigkulturen.

Puffer	Zusammensetzung
Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCL, pH 7,5 50 mM Na ₂ -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 ₂ -EDTA

Isolation von gDNA aus *A. flagrans* Kolonien

Zur Isolierung genomischer DNA (gDNA) von Transformanten direkt von der Agar-Platte wurde ein etwa 0,25 cm² großes Stück Agar aus dem äußeren Wachstumsbereich der Hyphen ausgeschnitten und in 700 µl Lysis-Puffer überführt. Der Agar-Block wurde mit Hilfe eines Mikropistills zerkleinert, und die Proben wurden dann für 60 Minuten bei 65 °C auf einem Thermoschüttler schüttelnd inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurde 300 µl KAc-Puffer hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer und Agar durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml 100 % Ethanol überführt und invertiert. Die DNA wurde für 15 Minuten auf Eis gefällt und anschließend durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 Minuten pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, 5 Minuten lang getrocknet und schließlich in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A bei einer Temperatur von 68 °C unter Schütteln gelöst.

Tabelle 14: Puffer für die Isolation von gDNA aus *A. flagrans* Kolonien.

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

RNA Isolation aus *A. flagrans*

Zur Isolation von RNA aus Myzel von *A. flagrans* wurden 2 Millionen Sporen auf mit Cellophan-Folie belegten LNA-Platten ausgestrichen und für 24 Stunden bei einer

Temperatur von 28 °C inkubiert. Zur Induktion der Fallen wurde eine gemischte Population von *C. elegans* N2 hinzugegeben, der Kontrollgruppe wurden keine Würmer zugeführt. Nach weiteren 24 Stunden Ko-Inkubation bei 28 °C wurde das Myzel von der Cellophan-Folie mit einem Spatel abgeschabt, wobei das Material von jeweils 5 Platten zu einer Probe zusammengefügt wurde. Die Myzel-Pellets wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mikropistill zerkleinert. Im nächsten Schritt wurde zu den Proben 1 ml Trizol (Invitrogen) hinzugefügt. Nach einem kurzen Vortex-Vorgang (15 Sekunden) wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation von 10 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde dann mit 200 µl Chloroform vermischt und erneut für 15 Sekunden gevortext. Nach einer 3-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte eine weitere Zentrifugation von 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm. Die wässrige Phase wurde danach in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt und invertiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA für 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 U/min pelletiert. Anschließend wurde sie mit 500 µl 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 4 °C und 9.000 rpm wurde das verbliebene Ethanol entfernt, das RNA-Pellet getrocknet und schließlich in 30 µl DEPC-H₂O eluiert.

RNA Extraktion aus *C. elegans*

Für die RNA-Extraktion aus *C. elegans* wurde eine NGM-Platte mit der gewünschten Population von *C. elegans* mit destilliertem Wasser (dH₂O) abgespült und gründlich gewaschen. Das gesammelte Wurm-Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mikropistill zerkleinert. Anschließend wurden 500 µl Trizol (Invitrogen) zu den Proben hinzugefügt und gründlich auf einem Vortex geschüttelt. Die Proben wurden nun dreimal abwechselnd in flüssigem Stickstoff gefroren, bei 37 °C aufgetaut und erneut 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 für drei Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 Volumen 100 % Isopropanol versetzt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die RNA wurde dann

für 15 Minuten bei 13.000 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 anschließend bei 60 °C schüttelnd in 50 µl DEPC-H₂O gelöst.

Polymerase-Kettenreaktion

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

10 µl	5x HF-Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
2,5 µl	5'-Primer (10 mM)
2,5 µl	3'-Primer (10 mM)
100 ng	Matrizen-DNA
2,5 U	DNA-Polymerase
H ₂ O	ad 50 µl

Es wurde das folgende Standard Programm verwendet:

5 min 95 °C (initiale Denaturierung)	
1 min 95 °C (Denaturierung)	
1 min 40-65 °C (Annealing, abhängig von Primern)	} 35 x
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 Vektoren zu linearisieren, wurden Enzyme von New England Biolabs (NEB) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet.

Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe, wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet (Sharp *et al.* 1973). Hierbei wurde eine Suspension von 0,8 % Agarose in einem 0,5 x TAE-Puffer aufgekocht. Zur Visualisierung der DNA wurde Midori Green Advance (Biozym) gemäß den Herstellerangaben zugefügt. Nach gründlichem Vermischen wurde das Gel in eine Gelkammer mit einem Schlitten und einem eingesetzten Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt, und das Gel wurde mithilfe des Schlittens in eine Gelkammer mit 0,5 x TAE-Puffer überführt. Die zu trennende DNA wurde zuvor mit einem 6 x Ladepuffer im Verhältnis 1:10 versetzt und in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 80-130 V. Als Größenstandard wurde der 1 kb DNA-Marker (New England Biolabs) verwendet. Zur Dokumentation wurden die DNA-Banden mithilfe von Blaulicht detektiert.

Tabelle 15: 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 ₂ O

Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um spezifische DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren, wurden die entsprechenden Banden zunächst mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA gemäß den Anweisungen des Herstellers (Zymo

Research) mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit. Die isolierte DNA wurde schließlich in dH₂O gelöst.

Klonierung mittels Gibson-Assembly

Für die Klonierung mittels Gibson-Assembly wurden zunächst die DNA-Fragmente und die Vektoren mithilfe von Oligonukleotiden amplifiziert, die überlappende (15-30 bp) und komplementäre Bereiche für die spätere Ligation aufwiesen. Nach der Amplifikation wurden die Fragmente aufgereinigt und in einem Verhältnis von 1:2 in die Klonierungsreaktion eingesetzt. Hierbei wurden 15 µl Gibson-Assembly-Enzym-Mix hinzugefügt, um auf ein Gesamtvolumen von 20 µl zu kommen. Die Reaktion wurde bei 50 °C für 30 bis 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der Reaktionsmischung zur Transformation in *E. coli* verwendet.

Tabelle 16: 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
H ₂ O	58.3 % v/v

DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten erfolgte durch Eurofins MWG unter Verwendung der Kettenabbruchmethode.

qRT PCR

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 DNaseTurbo DNA free kit (Thermo Fischer) behandelt. Als Haushaltsgen für Expressionsanalysen in *A. flagrans* wurde das putative *aktin*-Gen *dfl_002353* verwendet. Für Expressionsanalysen in *C. elegans* wurde *aktin-1* als Haushaltsgen 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

Die Synthese von kodierender DNA (cDNA) erfolgte unter Verwendung des SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kits von Thermo Fisher Scientific gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Southern-Hybridisierung

Für die Überprüfung von genetisch veränderten *A. flagrans* Stämmen wurden Southern-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde die maximale Menge der zuvor isolierten genomischen DNA über Nacht in einem Ansatz von 30 μl mit einem passenden Restriktionsenzym verdaut, wodurch ein Bandenmuster entstand, das sich vom Wildtyp unterscheidet. Die verdaute DNA wurde anschließend auf einem 0,8 %igen Agarosegel bei 100 V für 2 Stunden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion der DNA im Gel wurde ein Midori Green Advance verwendet und sein Bandenmuster mit Einstichen auf dem Gel markiert. Das Gel wurde in 0,25 M HCl für 30 Minuten zur Depurinierung der DNA behandelt, gefolgt von 30 Minuten in Denaturierungspuffer und weiteren 30 Minuten in Renaturierungspuffer. Die Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran (Roti-Nylon plus von Roth) erfolgte mittels Kapillarkräften. Hierfür wurde aus einem Tank mit 20x SSC Puffer mit Whatmen-Papier und Papierhandtüchern ein Sog durch Gel und Membran erzeugt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Anschließend wurden Größenmarker und Gelpositionen auf der Membran mit einem Bleistift markiert. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte mit UV-Licht im Stratalinker. Anschließend wurde die Membran in Southern-Hybridisierungspuffer für 30 Minuten bei 65 °C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Für die Detektion der DNA-Banden auf der Membran wurden Digoxigenin-markierte DNA-Sonden verwendet. Diese Sonde wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem DIG Probe Synthesis Kit (Roche) hergestellt. Zur Linearisierung der Sonde wurde sie für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt und dann in 15 ml

Southern-Hybridisierungspuffer gelöst und auf die Membran aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C. Anschließend wurde die Membran mit SSPE-Puffer gewaschen, und zwar 15 Minuten jeweils mit 2x SSPE + 0,1% SDS, 1x SSPE + 0,1% SDS und 0,1x SSPE + 0,1% SDS bei 65 °C. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde für 5 Minuten mit DIG Wash gewaschen und die DNA-freien Stellen der Membran durch 30-minütige Inkubation in 25 ml DIG2 blockiert. Die Antikörperlösung wurde im DIG2 Puffer 1:10.000 verdünnt und die Membran für 30 Minuten damit inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit je 40 ml DIG Wash gewaschen und mit 40 ml DIG3 für 5 Minuten äquilibriert. Zur Entwicklung der Membran wurde sie mit 2 ml CDP-Star Lösung inkubiert und mit Hilfe des Chemi-Smart Chemilumineszenz-Systems von Peqlab entwickelt. Bei Bedarf wurde die Sonde durch Zugabe von Stripping Puffer und Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten entfernt. Anschließend wurde die Membran erneut prähybridisiert.

Tabelle 17: Puffer für die Southern-Blot Analyse.

Puffer	Zusammensetzung
0,25 M HCl	20,7 ml HCl (37 %) in dH ₂ 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)
SSC (20x)	175,3 g/l NaCl (3 M) 88,2 g/l Na-Citrat x 2H ₂ O (0,3 M); pH 7,0
Southern Hybridisierungspuffer	500 ml 1 M Na-Phosphat Puffer (0,5 M); pH 7,0 70 g SDS (7 %) Autoklavieren
1 M Natriumphosphatpuffer	Lösung 1: 177,99 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (1 M) Lösung 2: 156,01 g/l NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O (1 M) pH der Lösung 1 durch Zugabe von Lösung 2 auf 7,0 einstellen
20x SSPE	175,3 g/l NaCl 26,6 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 7,4 g/l Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O pH 7,4 mit NaOH einstellen
DIG1	11,61 g/l Maleinsäure 8,77 g/l NaCl pH 7,5 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 ₂ x 6H ₂ 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. Diese Kassette enthielt die Hygromycin-Resistenzkassette (hph), die von ca. 1 kb großen Regionen flankiert wurde. Diese Regionen lagen sowohl stromaufwärts (*upstream*) als auch stromabwärts (*downstream*) von der zu verändernden Region im *A. flagrans*-Genom. Die Fragmente wurden mithilfe der Gibson-Assembly-Methode in den pJET1.2-Vektor kloniert. Anschließend wurden *E. coli* mit den so erhaltenen Vektoren transformiert, die Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigt. Für die Transformation von *A. flagrans* wurden 7 µg der Plasmid-DNA verwendet.

4.4 Mikrobiologische Methoden

Kultivierung von Mikroorganismen

Sämtliche Puffer und Nährmedien für die Kultivierung von Mikroorganismen wurden, falls erforderlich, vor der Anwendung für 20 Minuten bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Falls es sich um hitzeempfindliche Lösungen handelte, wurden sie mittels eines Sterilfilteraufsatzes (Porengröße 0,2 µm; Merck, Darmstadt) filtriert, um die Sterilität sicherzustellen.

Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurden für Flüssigkulturen in sterilisiertem Luria-Bertani (LB)-Medium schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Für die Anzucht auf fest Medium in Petrischalen, wurde dem LB-Medium 1,5 % Agar hinzugefügt. Zur Selektion wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugefügt. Für die Langzeitlagerung wurden Glycerinstocks erstellt,

indem eine Mischung der Flüssigkultur mit Glycerin bis zu einer Konzentration von 15 % (v/v) hergestellt wurde. Die Glycerinstocks wurden bei -80 °C gelagert.

Tabelle 18: 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 *A. flagrans*

Für Flüssigkulturen wurde *A. flagrans* in sterilisiertem Kartoffel-Dextrose-Medium (PDM) bei 28 °C und 180 rpm kultiviert. Zur Selektion wurden dem Medium entweder 100 µg/ml Hygromycin oder 150 µg/ml Geneticin hinzugefügt. Für das Wachstum auf festem Medium wurde dem Medium 1,5 % Agar zugesetzt, und zur Selektion von positiven Transformanten wurde Hygromycin oder Geneticin in den oben genannten Konzentrationen zugegeben.

Tabelle 19:Medien für die Kultivierung von *A. 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
Low nutrient agar (LNA)	1 g KCL 0,2 g MgSO ₄ - 7 H ₂ O 0,4 mg MnSO ₄ - 4 H ₂ O 0,88 mg ZnSO ₄ - 7 H ₂ O 3 mg FeCl ₃ - 6 H ₂ O 10 g Agar

Kultivierung von *C. elegans*

Die Kultivierung von *C. elegans* erfolgte gemäß den Anleitungen auf Wormbook (Stiernagle 2006). Zur Anzucht in Petrischalen wurden die Nematoden auf NGM-Agar (*nematode growth medium*) mit *E. coli* OP50 als Nahrungsquelle bei 20 °C inkubiert. Hierbei wurde eine Menge von 800 µl einer *E. coli* OP50 Übernachtskultur auf die NGM-Platten aufgetragen und über Nacht getrocknet. Zur Subkultivierung wurde ein Stück Agar steril von einer älteren Platte mit *C. elegans* ausgeschnitten und auf eine neue Platte übertragen (Evans 2006). Alternativ wurden einzelne Nematoden mit einem Platindraht auf frische Platten überführt. Für die Verwendung in Experimenten wurden die Nematoden von den Platten mit dH₂O oder M9-Puffer gespült und anschließend durch Zentrifugation bei 2500 rpm für 3 Minuten gewaschen.

Tabelle 20: Medien für die Kultivierung von *C. elegans*.

Medium	Zusammensetzung für 1 L
Nematode growth medium (NGM)	3 g NaCl 2,5 g Pepton 17 g Agar Nach dem Autoklavieren steril hinzugeben: 1 ml CaCl ₂ (1 M) 1 ml MgSO ₄ (1 M) 25 ml KPO ₄ Puffer (1 M) 1 ml Cholesterol (5 mg/ml in Ethanol)
M9-Puffer	3 g KH ₂ PO ₄ 6 g Na ₂ HPO ₄ 5 g NaCl 1 ml MgSO ₄ (1 M)

Synchronisation von *C. elegans*

Die Methode der Behandlung mit einer alkalischen Hypochlorit-Lösung wird verwendet, um *C. elegans*-Kulturen im ersten Larvenstadium (L1) zu synchronisieren.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Kutikula der Würmer empfindlich auf Hypochlorid reagiert, während die Eihülle die Embryonen schützt. Nach der Behandlung mit der alkalischen Hypochlorit-Lösung werden die Embryonen in M9-Puffer ohne Nahrung inkubiert, was das Schlüpfen ermöglicht, aber die weitere Entwicklung verhindert und die Population so im synchronisierten L1-Larvenstadium hält.

Für die Synchronisation wird eine Petrischale mit adulten Nematoden mit dH₂O gespült, dann in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit dH₂O aufgefüllt und abzentrifugiert (2500 rpm, 1 Minute, Raumtemperatur). Die Würmer wurden mindestens einmal gründlich mit Wasser gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, und auf das Wurm-Pellet wurde eine Lösung aus 0,5 ml 5 M NaOH, 3,5 ml dH₂O und 1 ml Chlorix gegeben, die für 6 Minuten geschüttelt wurde. Das Zentrifugenröhrchen wurde sofort mit dH₂O aufgefüllt und bei 2500 rpm für 1 Minute zentrifugiert, um die Reaktion zu stoppen. Die Eier wurden zweimal mit dH₂O und einmal mit M9-Puffer gewaschen und schließlich in 2 ml M9-Puffer resuspendiert. Diese wurden in 35 mm Petrischalen überführt und für 24 Stunden bei 20 °C inkubiert, bevor sie auf eine NGM-Platte mit OP50 übertragen wurden.

Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen wurde entweder die Plasmid-DNA oder 10 µl eines Gibson-Assembly-Ansatzes mit 50 µl chemokompetenten Zellen gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock von 1,5 Minuten bei 42 °C. Die Zellen wurden anschließend für 2 Minuten auf Eis inkubiert und dann auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Protoplastierung von *A. flagrans*

In Erlenmeyerkolben wurden 150 ml PDM mit Sporen von einer dicht bewachsenen *A. flagrans*-PDA-Platte beimpft und anschließend 24 Stunden bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Das entstandene Myzel wurde durch eine Schicht steriles Miracloth gefiltert und mit 50 ml MN-Puffer gewaschen. Eine Lösung bestehend aus 5 mg/ml Kitalase und 20 mg/ml GlucanX (Novozyme) in 6 ml MN-Puffer wurde hergestellt und steril

filtriert. Etwa 0,5 g des Myzels wurden in dieser Enzymlösung bei 28 °C und 70 U/min für 2 Stunden in einem Zentrifugenröhrchen inkubiert. Die Bildung von Protoplasten wurde unter dem Mikroskop überwacht. Anschließend wurden die Protoplasten durch zwei Lagen Miracloth in ein neues Zentrifugenröhrchen gefiltert, um unverdautes Myzel zu entfernen. Das Filtrat wurde mit MN-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und für 20 Minuten bei 5.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die Protoplasten wurden anschließend zweimal mit 50 ml KTC-Puffer gewaschen. Das Pellet der Protoplasten wurde in 1 ml KTC-Puffer resuspendiert. Die Anzahl der Protoplasten wurde unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Transformation von *A. flagrans* Protoplasten

Für die Transformation wurden 6×10^6 *A. flagrans* Protoplasten in einem Volumen von 100 µl mit 6 - 8 µg der zu transformierenden DNA vermischt. Die Mischung wurde 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1 ml einer PTC6000-Lösung hinzugefügt, sanft vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 10 ml handwarmem PDASS vermischt, 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 21: Puffer für die Transformation von *A. flagrans*.

Puffer	Zusammensetzung
MN Puffer	0,3 mol/l MgSO ₄ 0,3 mol/l NaCl
KTC Puffer	1,2 mol/l KCL 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5 50 mmol/l CaCl ₂
PTC6000	10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5 50 mmol/l CaCl ₂ 60 % (w/v) Polyethylenglykol-6000

Transformation von *C. elegans* mittels Injektion

Die Transformation von *C. elegans* erfolgte durch Mikroinjektion. Hierbei wurde die DNA in den distalen Arm der Gonade injiziert, wodurch ein extrachromosomales Array erzeugt wurde, das an die Nachkommen weitervererbt werden kann. Zuvor wurden die für die Injektion verwendeten Vektoren durch Restriktionsverdau linearisiert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit gereinigt. Anschließend wurde ein Injektionsmix hergestellt, bestehend aus der jeweiligen Plasmid-DNA (5 ng/μl) und dem Ko-Marker (5 ng/μl), der mit 150 ng/μl der 1 kb DNA-Leiter als Füll-DNA aufgefüllt wurde. Vor der Verwendung der Injektionsmischung wurde das Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert, um mögliche Fragmente zu entfernen, die die Injektionsnadel eventuell verstopfen könnten. Für die Injektion wurden junge adulte, trüchtige Würmer ausgewählt, die nur wenige Eier enthielten. Diese wurden einzeln auf einen Glasobjektträger übertragen, der mit einem dünnen Gelkissen (3 g/l Agarose in Wasser gelöst) 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 aufgrund der unterschiedlichen Öffnungsflächen der Nadelspitzen. Einzelne injizierte Nematoden wurden dann auf eine frische NGM-OP50-Platte übertragen. Auf diese Würmer wurden 2 μl M9-Puffer für die Regeneration gegeben. Die Platten wurden bei 20 °C inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Platten auf positive Transformanten der F1-Generation überprüft, die anhand der Fluoreszenz im Pharynx erkennbar waren. Diese transgenen Nematoden wurden anschließend erneut vereinzelt, um die verschiedenen transgenen Linien voneinander zu trennen.

Herstellung von *A. flagrans* Sporensuspensionen

Die Sporen einer 7-Tage alten *A. flagrans*-Platte wurden zusammen mit dem Myzel vorsichtig mit einer Impföse abgeschabt. Anschließend wurden sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 50 ml dH₂O aufgespült. Nach einem kurzen Vortex-Vorgang wurde die Suspension durch eine Lage Miracloth in ein frisches Zentrifugenröhrchen filtriert. Die Sporen wurden anschließend durch Zentrifugation mit

5000 rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Das Pellet wurde sorgfältig gewaschen. Nach Entfernen des Überstands wurden die Sporen in 3-5 ml sterilem dH₂O gelöst. Die Konzentration der Sporen wurde mithilfe einer Zählkammer bestimmt.

Induktion der Fallenbildung

Um die Fallenbildung von *A. flagrans* auf festem Medium zu initiieren, wurden ungefähr 1 Millionen Sporen auf 60 mm LNA-Platten ausgestrichen und anschließend für 24 Stunden zusammen mit einer gemischten Population von *C. elegans* N2 inkubiert. Für mikroskopische Untersuchungen wurde LNA zwischen zwei sterile, quer liegende Objektträger pipettiert. Auf diese LNA-Kissen wurden entweder eine Sporensuspension (10.000-50.000 Sporen) aufgebracht oder die Sporen wurden mithilfe eines Zahnstochers auf das LNA übertragen. Die Objektträger wurden dann für 24 Stunden in einer feuchten Kammer, bestehend aus einer Petrischale gefüllt mit sterilem Wasser und zwei 1 ml Pipettenspitzen, bei 28 °C im Dunkeln inkubiert.

Mikroskopie

Für Epi-Fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen, sowie für Bilder mit differentiellm Interferenzkontrast (DIC) wurde ein Zeiss AxioImager Z.1 mit den Objektiven: PlanApochromat 63x/1.4 Ölimmersion, EC Plan-Neofluor 40x/0.75, 20x/0.50, EC PlanNeofluar 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 OPAL Laser) und einem Spinning Disk Modul CSU-X1M 5000 und Evolve 512 Kamera (Photometrics) verwendet.

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. Die Annotation der RNAseq Daten erfolgte mit WormCat (Holdorf *et al.* 2020). Venn-Diagramme wurden mit dem Online-Tool von Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) erstellt. Protein-Protein Interaktionsnetzwerke wurden mit STRING-DB erstellt (Szklarczyk *et al.* 2019). DNA-Sequenzen wurden mit dem ApE PlasmidEditor visualisiert.

Literatur

- Adnan, M., Islam, W., Waheed, A., Hussain, Q., Shen, L., Wang, J. und Liu, G., 2023** SNARE protein Snc1 is essential for vesicle trafficking, membrane fusion and protein secretion in fungi. *Cells* 12: 1547.
- Ahren, 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 (Read)* 151: 789-803.
- Alfaro, M., Oguiza, J. A., Ramirez, L. und Pisabarro, A. G., 2014** Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *J Proteomics* 102: 28-43.
- Anderson, R. G., Deb, D., Fedkenheuer, K. und McDowell, J. M., 2015** Recent progress in RXLR effector research. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 28: 1063-1072.
- Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Demangeat, G., Komar, V. und Fuchs, M., 2004** The specific transmission of grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology* 320: 12-22.
- Appella, E., Weber, I. T. und Blasi, F., 1988** Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett* 231: 1-4.
- Aroian, R. V., und Sternberg, P. W., 1991** Multiple functions of let-23, a *Caenorhabditis elegans* receptor tyrosine kinase gene required for vulval induction. *Genetics* 128: 251-267.
- Bacaj, T., und Shaham, S., 2007** Temporal control of cell-specific transgene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 176: 2651-2655.
- Bachinger, H. P., 1987** The influence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the in vitro folding of type III collagen. *J Biol Chem* 262: 17144-17148.
- Barker, K. R., und Koening, S. R., 1998** Developing sustainable systems for nematode management. *Annu Rev Phytopathol* 36: 165-205.
- Barron, G. L., 2003** Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. *Biodiversity* 4: 3-9.
- Bell, J., 1989** The polymerase chain reaction. *Immunol Today* 10: 351-355.
- Bercher, M., Wahl, J., Vogel, B. E., Lu, C., Hedgecock, E. M., Hall, D. H. und Plenefisch, J. D., 2001** mua-3, a gene required for mechanical tissue integrity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a novel transmembrane protein of epithelial attachment complexes. *J Cell Biol* 154: 415-426.
- Berks, M., 1995** The *C. elegans* genome sequencing project. *C. elegans* genome mapping and sequencing consortium. *Genome Res* 5: 99-104.
- Bird, A. F., und Bird, J., 1991** *The structure of nematodes, 2nd edn*. Academic Press, London.
- Bitencourt, T. A., Hatanaka, O., Pessoni, A. M., Freitas, M. S., Trentin, G., Santos, P., Rossi, A., Martinez-Rossi, N. M., Alves, L. L., Casadevall, A. et al., 2022** Fungal extracellular vesicles are involved in intraspecies intracellular communication. *mBio* 13: e0327221.
- Blaxter, M. L., 2003** Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism. *Adv Parasitol* 54: 101-195.
- Blaxter, M. L., Page, A. P., Rudin, W. und Maizels, R. M., 1992** Nematode surface coats: actively evading immunity. *Parasitol Today* 8: 243-247.
- Bond, M. R., Ghosh, S. K., Wang, P. und Hanover, J. A., 2014** Conserved nutrient sensor O-GlcNAc transferase is integral to *C. elegans* pathogen-specific immunity. *PLoS One* 9: e113231.
- Bongers, T., und Ferris, H., 1999** Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends Ecol Evol* 14: 224-228.
- Bosher, J. M., Hahn, B. S., Legouis, R., Sookhareea, S., Weimer, R. M., Gansmuller, A., Chisholm, A. D., Rose, A. M., Bessereau, J. L. und Labouesse, M., 2003** The *Caenorhabditis elegans* vab-10 spectraplakins isoforms protect the epidermis against internal and external forces. *J Cell Biol* 161: 757-768.

- Boulin, T., Etchberger, J. F. und Hobert, O., 2006** Reporter gene fusions, pp. 1-23 in *WormBook*.
- Brenner, S., 1974** The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.
- Bridge, J., 1996** Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. *Annu Rev Phytopathol* 34: 201-225.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C., 1994** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chang, C., Newman, A. P. und Sternberg, P. W., 1999** Reciprocal EGF signaling back to the uterus from the induced *C. elegans* vulva coordinates morphogenesis of epithelia. *Curr Biol* 9: 237-246.
- Chen, S.-A., Lin, H.-C., Schroeder, F. C. und Hsueh, Y.-P., 2020** 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.
- Chisholm, A. D., und Hsiao, T. I., 2012** The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. I: development, patterning, and growth. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1: 861-878.
- Corsi, A. K., Wightman, B. und Chalfie, M., 2015** A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*, pp. 1-31 in *WormBook*.
- Costa, M., Draper, B. W. und Priess, J. R., 1997** The role of actin filaments in patterning the *Caenorhabditis elegans* cuticle. *Dev Biol* 184: 373-384.
- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J. und Priess, J. R., 1998** A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol* 141: 297-308.
- Couillault, C., und Ewbank, J. J., 2002** Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun* 70: 4705-4707.
- Cox, G. N., Kusch, M., DeNevi, K. und Edgar, R. S., 1981a** Temporal regulation of cuticle synthesis during development of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 84: 277-285.
- Cox, G. N., Staprans, S. und Edgar, R. S., 1981b** The cuticle of *Caenorhabditis elegans*. II. Stage-specific changes in ultrastructure and protein composition during postembryonic development. *Dev Biol* 86: 456-470.
- Cruz-Mireles, N., Eseola, A. B., Oses-Ruiz, M., Ryder, L. S. und Talbot, N. J., 2021** From appressorium to transpressorium-defining the morphogenetic basis of host cell invasion by the rice blast fungus. *PLoS Pathog* 17: e1009779.
- Culetto, E., und Sattelle, D. B., 2000** A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* 9: 869-877.
- Davies, K. G., Rowe, J. A. und Williamson, V. M., 2008** Inter- and intra-specific cuticle variation between amphimictic and parthenogenetic species of root-knot nematode (*Meloidogyne spp.*) as revealed by a bacterial parasite (*Pasteuria penetrans*). *Int J Parasitol* 38: 851-859.
- De Gregorio, E., Han, S. J., Lee, W. J., Baek, M. J., Osaki, T., Kawabata, S., Lee, B. L., Iwanaga, S., Lemaitre, B. und Brey, P. T., 2002** An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev Cell* 3: 581-592.
- De Melo, J. V., De Souza, W. und Peixoto, C. A., 2002** Ultrastructural analyses of the *Caenorhabditis elegans* DR 847 bli-1(n361) mutant which produces abnormal cuticle blisters. *J Submicrosc Cytol Pathol* 34: 291-297.
- de Silva, H. D., Saleh, S., Kovacevic, S., Wang, L., Black, C. G., Plebanski, M. und Coppel, R. L., 2011** The antibody response to *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 4: comparative assessment of specificity and growth inhibitory antibody activity to infection-acquired and immunization-induced epitopes. *Malar J* 10: 266.
- Dierking, K., Polanowska, J., Omi, S., Engelmann, I., Gut, M., Lembo, F., Ewbank, J. J. und Pujol, N., 2011** Unusual regulation of a STAT protein by an SLC6 family transporter in *C. elegans* epidermal innate immunity. *Cell Host Microbe* 9: 425-435.

- Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., Harder, W. und Nordbring-Hertz, B., 1994** Nematophagous fungi: physiological aspects and structure-function relationships. *Adv Microb Physiol* 36: 111-143.
- 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: 395-398.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, 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.
- Dold, C., und Holland, C. V., 2014** Helminth-Nematode: *Ascaris*, pp. 83-89 in *Encyclopedia of Food Safety*.
- Doolittle, R. F., Feng, D. F. und Johnson, M. S., 1984** Computer-based characterization of epidermal growth factor precursor. *Nature* 307: 558-560.
- 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.
- Edens, W. A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J. M., Lee, T., Edens, H. A., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, D. B. et al., 2001** Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol* 154: 879-891.
- Eisenmann, D. M., Maloof, J. N., Simske, J. S., Kenyon, C. und Kim, S. K., 1998** The beta-catenin homolog BAR-1 and LET-60 Ras coordinately regulate the Hox gene *lin-39* during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Development* 125: 3667-3680.
- Engel, J., 1989** EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett* 251: 1-7.
- Engelmann, I., Griffon, A., Tichit, L., Montanana-Sanchis, F., Wang, G., Reinke, V., Waterston, R. H., Hillier, L. W. und Ewbank, J. J., 2011** A comprehensive analysis of gene expression changes provoked by bacterial and fungal infection in *C. elegans*. *PLoS One* 6: e19055.
- Evans, T., 2006** Transformation and microinjection, pp. in *WormBook*.
- Ewald, C. Y., Castillo-Quan, J. I. und Blackwell, T. K., 2018** Untangling longevity, dauer, and healthspan in *Caenorhabditis elegans* insulin/IGF-1-signalling. *Gerontology* 64: 96-104.
- Ewbank, J. J., 2002** Tackling both sides of the host-pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. *Microbes Infect* 4: 247-256.
- 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 Grant, B., 2002** Deciphering endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Traffic* 3: 11-19.
- Fares, H., und Greenwald, I., 2001** Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics* 159: 133-145.
- Flor, H. H., 1956** The complementary genic systems in flax and flax rust, pp. 29-54 in *Adv Genet*, edited by M. Demerec. Academic Press.
- Francis, G. R., und Waterston, R. H., 1985** Muscle organization in *Caenorhabditis elegans*: localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. *J Cell Biol* 101: 1532-1549.
- Francis, R., und Waterston, R. H., 1991** Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 114: 465-479.
- Friedman, L., Higgin, J. J., Moulder, G., Barstead, R., Raines, R. T. und Kimble, J., 2000** Prolyl 4-hydroxylase is required for viability and morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4736-4741.
- Fu, R., Jiang, X., Yang, Y., Wang, C., Zhang, Y., Zhu, Y. und Zhang, H., 2022** Bidirectional regulation of structural damage on autophagy in the *C. elegans* epidermis. *Autophagy* 18: 2731-2745.

- Gatewood, B. K., und Bucher, E. A., 1997** The *mup-4* locus in *Caenorhabditis elegans* is essential for hypodermal integrity, organismal morphogenesis and embryonic body wall muscle position. *Genetics* 146: 165-183.
- 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.
- Grell, M. N., Mouritzen, P. und Giese, H., 2003** A *Blumeria graminis* gene family encoding proteins with a C-terminal variable region with homologues in pathogenic fungi. *Gene* 311: 181-192.
- Grove, C., Cain, S., Chen, W. J., Davis, P., Harris, T., Howe, K. L., Kishore, R., Lee, R., Paulini, M., Raciti, D. et al., 2018** Using WormBase: a genome biology resource for *Caenorhabditis elegans* and related nematodes, pp. 399-470 in *Eukaryotic Genomic Databases: Methods and Protocols*, edited by M. Kollmar. Springer New York, New York, NY.
- Grünewald, T., 2021** Etablierung des CRISPR/Cas12a-Systems im Nematoden-fangenden Pilz *Duddingtonia flagrans* und Charakterisierung des t-SNAREs SsoA, pp. in *Microbiology*. Karlsruher Institut für Technologie.
- Gumienny, T. L., und Savage-Dunn, C., 2013** TGF-beta signaling in *C. elegans*. *WormBook*: 1-34.
- Harlow, P. H., Perry, S. J., Widdison, S., Daniels, S., Bondo, E., Lamberth, C., Currie, R. A. und Flemming, A. J., 2016** The nematode *Caenorhabditis elegans* as a tool to predict chemical activity on mammalian development and identify mechanisms influencing toxicological outcome. *Sci Rep* 6: 22965.
- Hoflich, J., Berninsone, P., Gobel, C., Gravato-Nobre, M. J., Libby, B. J., Darby, C., Politz, S. M., Hodgkin, J., Hirschberg, C. B. und Baumeister, R., 2004** Loss of *srf-3*-encoded nucleotide sugar transporter activity in *Caenorhabditis elegans* alters surface antigenicity and prevents bacterial adherence. *J Biol Chem* 279: 30440-30448.
- Holdorf, A. D., Higgins, D. P., Hart, A. C., Boag, P. R., Pazour, G. J., Walhout, A. J. M. und Walker, A. K., 2020** WormCat: an online tool for annotation and visualization of *Caenorhabditis elegans* genome-scale data. *Genetics* 214: 279-294.
- Hong, L., Elbl, T., Ward, J., Franzini-Armstrong, C., Rybicka, K. K., Gatewood, B. K., Baillie, D. L. und Bucher, E. A., 2001** MUP-4 is a novel transmembrane protein with functions in epithelial cell adhesion in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 154: 403-414.
- Hresko, M. C., Schriefer, L. A., Shrimankar, P. und Waterston, R. H., 1999** Myotactin, a novel hypodermal protein involved in muscle-cell adhesion in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 146: 659-672.
- Hresko, M. C., Williams, B. D. und Waterston, R. H., 1994** Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 124: 491-506.
- Hu, T., und Li, C., 2010** Convergence between Wnt-beta-catenin and EGFR signaling in cancer. *Mol Cancer* 9: 236.
- Huang, S. H., Wu, C. H., Chang, Y. C., Kwon-Chung, K. J., Brown, R. J. und Jong, A., 2012** *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *PLoS One* 7: e48570.
- Huang, T. Y., Lee, Y. Y., Vidal-Diez de Ulzurrun, G. und Hsueh, Y. P., 2020** Forward genetic screens identified mutants with defects in trap morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *G3* 11.
- Hughes, R. C., 1999** Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1473: 172-185.
- Hugot, J. P., Baujard, P. und Morand, S., 2001** Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology* 3(3): 199-208.

- Hyde, K., Swe, A. und Zhang, K.-Q., 2014 Nematode-trapping fungi, pp. 1-12 in *Nematode-Trapping Fungi*, edited by K.-Q. Zhang und K. D. Hyde. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Ikeda, M. A. K., de Almeida, J. R. F., Jannuzzi, G. P., Cronemberger-Andrade, A., Torrecilhas, A. C. T., Moretti, N. S., da Cunha, J. P. C., de Almeida, S. R. und Ferreira, K. S., 2018 Extracellular vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis. *Front Microbiol* 9: 2286.
- Irazoqui, J. E., Ng, A., Xavier, R. J. und Ausubel, F. M., 2008 Role for beta-catenin and HOX transcription factors in *Caenorhabditis elegans* and mammalian host epithelial-pathogen interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17469-17474.
- Jackson, B. M., Abete-Luzi, P., Krause, M. W. und Eisenmann, D. M., 2014 Use of an activated beta-catenin to identify Wnt pathway target genes in *Caenorhabditis elegans*, including a subset of collagen genes expressed in late larval development. *G3* 4: 733-747.
- Jarrar, Y., und Lee, S. J., 2021 The functionality of UDP-glucuronosyltransferase genetic variants and their association with drug responses and human diseases. *J Pers Med* 11.
- Jesudoss Chelladurai, J., Derscheid, R. und Brewer, M. T., 2018 Respiratory disease associated with migrating *Ascaris* larvae in a beef calf. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 12: 9-12.
- Jin, Q., Li, C., Li, Y., Shang, J., Li, D., Chen, B. und Dong, H., 2013 Complexity of roles and regulation of the PMK1-MAPK pathway in mycelium development, conidiation and appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*. *Gene Expr Patterns* 13: 133-141.
- Johnstone, I. L., 2000 Cuticle collagen genes. Expression in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet* 16: 21-27.
- Johnstone, I. L., und Barry, J. D., 1996 Temporal reiteration of a precise gene expression pattern during nematode development. *EMBO J* 15: 3633-3639.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Zidek, A., Potapenko, A. et al., 2021 Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596: 583-589.
- Kaletta, T., und Hengartner, M. O., 2006 Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* 5: 387-398.
- 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.
- Kimble, J., und Hirsh, D., 1979 The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 70: 396-417.
- Kudla, J., und Bock, R., 2016 Lighting the way to protein-protein interactions: recommendations on best practices for bimolecular fluorescence complementation analyses. *Plant Cell* 28: 1002-1008.
- 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* 6.
- Lanver, D., Muller, A. N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F. B., Franitza, M., Pellegrin, C., Reissmann, S., Altmüller, J., Rensing, S. A. et al., 2018 The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNA-Seq analysis. *Plant Cell* 30: 300-323.
- 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.
- Lebrigand, K., He, L. D., Thakur, N., Arguel, M. J., Polanowska, J., Henrissat, B., Record, E., Magdelenat, G., Barbe, V., Raffaele, S. et al., 2016 Comparative genomic analysis of *Drechmeria coniospora* reveals core and specific genetic requirements for fungal endoparasitism of nematodes. *PLoS Genet* 12: e1006017.

- Li, G., Dulal, N., Gong, Z. und Wilson, R. A., 2023** Unconventional secretion of *Magnaporthe oryzae* effectors in rice cells is regulated by tRNA modification and codon usage control. *Nat. Microbiol.* 8: 1706-1716.
- 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. *Annu 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.
- Liu, X., Xiang, M. und Che, Y., 2009** The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience* 50: 20-25.
- 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* 22: 63-71.
- 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.*
- Ma, Y., Yang, X., Xie, M., Zhang, G., Yang, L., Bai, N., Zhao, Y., Li, D., Zhang, K. Q. und Yang, J., 2020** The Arf-GAP AoGlo3 regulates conidiation, endocytosis, and pathogenicity in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Fungal Genet Biol* 138: 103352.
- Mallo, G. V., Kurz, C. L., Couillault, C., Pujol, N., Granjeaud, S., Kohara, Y. und Ewbank, J. J., 2002** Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr Biol* 12: 1209-1214.
- Meerupati, T., Andersson, K. M., Friman, E., Kumar, D., Tunlid, A. und Ahren, D., 2013** Genomic mechanisms accounting for the adaptation to parasitism in nematode-trapping fungi. *PLoS Genet* 9: e1003909.
- Menzner, J., 2020** Charakterisierung eines putativen Virulenzfaktors von *Duddingtonia flagrans* und Adaption eines optogenetischen Systems in *Caenorhabditis elegans*, pp. in *Microbiology*. Karlsruher Institut für Technologie.
- Monsalve, G. C., Yamamoto, K. R. und Ward, J. D., 2019** A new tool for inducible gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 211: 419-430.
- Moribe, H., Konakawa, R., Koga, D., Ushiki, T., Nakamura, K. und Mekada, E., 2012** Tetraspanin is required for generation of reactive oxygen species by the dual oxidase system in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 8: e1002957.
- Moribe, H., Yochem, J., Yamada, H., Tabuse, Y., Fujimoto, T. und Mekada, E., 2004** Tetraspanin protein (TSP-15) is required for epidermal integrity in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 117: 5209-5220.
- 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.
- Muller, H. G., 1958** The constricting ring mechanism of two predacious hyphomycetes. *TBMS* 41: 341-364.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H., 1986** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Myllyharju, J., und Kivirikko, K. I., 2001** Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 33: 7-21.
- Neeli-Venkata, R., Diaz, C. M., Celador, R., Sanchez, Y. und Minc, N., 2021** Detection of surface forces by the cell-wall mechanosensor Wsc1 in yeast. *Dev Cell* 56: 2856-2870 e2857.
- Nielsen, H., Petsalaki, E. I., Zhao, L. und Stuhler, K., 2019** Predicting eukaryotic protein secretion without signals. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1867: 140174.
- Nievers, M. G., Schaapveld, R. Q. und Sonnenberg, A., 1999** Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol* 18: 5-17.

- 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.
- Noble, L. M., Miah, A., Kaur, T. und Rockman, M. V., 2020** The ancestral *Caenorhabditis elegans* cuticle suppresses rol-1. *G3* 10: 2385-2395.
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H. B. und Tunlid, A., 2006** Nematophagous Fungi in *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley Sons, eLS.
- Nordbring-Hertz, B., und Stålhammar-Carlemalm, M., 1978** Capture of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*, an electron microscope study. *Canad. J. Bot.* 56: 1297-1307.
- Novelli, J., Ahmed, S. und Hodgkin, J., 2004** Gene interactions in *Caenorhabditis elegans* define DPY-31 as a candidate procollagen C-proteinase and SQT-3/ROL-4 as its predicted major target. *Genetics* 168: 1259-1273.
- Oliveira, D. L., Rizzo, J., Joffe, L. S., Godinho, R. M. 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.
- Page, A. P., Hamilton, A. J. und Maizels, R. M., 1992** *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to carbohydrate epitopes of secreted (TES) antigens localize to different secretion-related structures in infective larvae. *Exp Parasitol* 75: 56-71.
- Pantazopoulou, A., 2016** The Golgi apparatus: insights from filamentous fungi. *Mycologia* 108: 603-622.
- Park, E. C., und Horvitz, H. R., 1986** Mutations with dominant effects on the behavior and morphology of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 113: 821-852.
- Patterson, R. A., Juarez, M. T., Hermann, A., Sasik, R., Hardiman, G. und McGinnis, W., 2013** Serine proteolytic pathway activation reveals an expanded ensemble of wound response genes in *Drosophila*. *PLoS One* 8: e61773.
- Pees, B., Yang, W., Kloock, A., Petersen, C., Peters, L., Fan, L., Friedrichsen, M., Butze, S., Zarate-Potes, A., Schulenburg, H. et al., 2021** Effector and regulator: Diverse functions of *C. elegans* C-type lectin-like domain proteins. *PLoS Pathog* 17: e1009454.
- Peixoto, C. A., und De Souza, W., 1995** Freeze-fracture and deep-etched view of the cuticle of *Caenorhabditis elegans*. *Tissue Cell* 27: 561-568.
- Peixoto, C. A., Kramer, J. M. und de Souza, W., 1997** *Caenorhabditis elegans* cuticle: a description of new elements of the fibrous layer. *J Parasitol* 83: 368-372.
- Perry, R. N., und Moens, M., 2013** *Plant Nematology*, CAB International.
- Peters, K., McDowall, J. und Rose, A. M., 1991** Mutations in the bli-4 (I) locus of *Caenorhabditis elegans* disrupt both adult cuticle and early larval development. *Genetics* 129: 95-102.
- Pramer, D., 1964** Nematode- trapping fungi. An intriguing group of carnivorous plants inhabit the microbial world. *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., Cypowyj, S., Ziegler, K., Millet, A., Astrain, A., Goncharov, A., Jin, Y., Chisholm, A. D. und Ewbank, J. J., 2008a** Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr Biol* 18: 481-489.
- Pujol, N., Zugasti, O., Wong, D., Couillault, C., Kurz, C. L., Schulenburg, H. und Ewbank, J. J., 2008b** Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* 4: e1000105.
- Reindl, M., Hänsch, S., Weidtkamp-Peters, S. und Schipper, K., 2019** A potential lock-type mechanism for unconventional secretion in fungi. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 460.
- Rizzo, J., Rodrigues, M. L. und Janbon, G., 2020** Extracellular vesicles in fungi: past, present, and future perspectives. *Front. cell. infect. microbiol.* 10.
- Roberts, B., Clucas, C. und Johnstone, I. L., 2003** Loss of SEC-23 in *Caenorhabditis elegans* causes defects in oogenesis, morphogenesis, and extracellular matrix secretion. *Mol Biol Cell* 14: 4414-4426.
- 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.

- 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.
- Rubartelli, A., und Sitia, R., 1997** Secretion of mammalian proteins that lack a signal sequence, pp. 87-114 in *Unusual Secretory Pathways: From Bacteria to Man*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Sapio, M. R., Hilliard, M. A., Cermola, M., Favre, R. und Bazzicalupo, P., 2005** The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 282: 231-245.
- Scheithauer, L., Karagoz, M. S., Mayer, B. E. und Steinert, M., 2023** Protein sociology of ProA, Mip and other secreted virulence factors at the *Legionella pneumophila* surface. *Front Cell Infect Microbiol* 13: 1140688.
- Schmidt, A. R., Dorfelt, H. und Perrichot, V., 2007** Carnivorous fungi from cretaceous amber. *Science* 318: 1743.
- Schumacher, L. A., Grabau, Z. J., Wright, D. L., Small, I. M. und Liao, H. L., 2022** Effects of grass-based crop rotation, nematicide, and irrigation on the nematode community in cotton. *J Nematol* 54: 20220046.
- Sharp, P. A., Sugden, B. und Sambrook, J., 1973** Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063.
- Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A. M., Kuijk, E., van den Berghe, P. V., Kamath, R. S., Fraser, A. G., Ahringer, J. und Plasterk, R. H., 2003** Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* 1: E12.
- Singh, D., Rai, V. und Agrawal, D. K., 2023** Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiol Cardiovasc Med* 7: 5-16.
- Singh, R. N., und Sulston, J. E., 1978** Some observations on moulting in *Caenorhabditis elegans*. *Nematologica* 24: 63-71.
- Singh, S., Awasthi, L. P., Jangre, A. und Nirmalkar, V. K., 2020** Transmission of plant viruses through soil-inhabiting nematode vectors, pp. 291-300 in *Applied Plant Virology*.
- Sørensen, O. E., Thapa, D. R., Roupe, K. M., Valore, E. V., Sjobring, U., Roberts, A. A., Schmidtchen, A. und Ganz, T., 2006** Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 116: 1878-1885.
- 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., 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.
- Steinmann, B., Bruckner, P. und Superti-Furga, A., 1991** Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase. *J Biol Chem* 266: 1299-1303.
- Stergiopoulos, I., und de Wit, P. J., 2009** Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* 47: 233-263.
- Stiernagle, T., 2006** Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*: 1-11.
- Sulston, J. E., und Horvitz, H. R., 1977** Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56: 110-156.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. und Thomson, J. N., 1983** The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100: 64-119.
- Swe, A., Li, J., Zhang, K., Pointing, S., Jeewon, R. und Hyde, K. D., 2011** Nematode-trapping fungi. *CREAM* 1: 1-26.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P. et al., 2019** STRING v11: protein-protein

- association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47: D607-D613.
- Taffoni, C., und Pujol, N., 2015** Mechanisms of innate immunity in *C. elegans* epidermis. *Tiss Barriers* 3: e1078432.
- Teclé, E., Chhan, C. B., Franklin, L., Underwood, R. S., Hanna-Rose, W. und Troemel, E. R., 2021** The purine nucleoside phosphorylase *pnp-1* regulates epithelial cell resistance to infection in *C. elegans*. *PLoS Pathog* 17: e1009350.
- Teuscher, A. C., Statzer, C., Goyala, A., Domenig, S. A., Schoen, I., Hess, M., Hofer, A. M., Fossati, A., Vogel, V., Goksel, O. et al., 2022** Mechanotransduction coordinates extracellular matrix protein homeostasis promoting longevity in *C. elegans*. *bioRxiv*: 2022.2008.2030.505802.
- Thacker, C., Peters, K., Srayko, M. und Rose, A. M., 1995** The *bli-4* locus of *Caenorhabditis elegans* encodes structurally distinct *kex2*/subtilisin-like endoproteases essential for early development and adult morphology. *Genes Dev* 9: 956-971.
- Thein, M. C., Winter, A. D., Stepek, G., McCormack, G., Stapleton, G., Johnstone, I. L. und Page, A. P., 2009** Combined extracellular matrix cross-linking activity of the peroxidase *MLT-7* and the dual oxidase *BLI-3* is critical for post-embryonic viability in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 284: 17549-17563.
- 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.
- Toruno, T. Y., Stergiopoulos, I. und Coaker, G., 2016** Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annu Rev Phytopathol* 54: 419-441.
- Treusch, S., Knuth, S., Slaugenhaupt, S. A., Goldin, E., Grant, B. D. und Fares, H., 2004** *Caenorhabditis elegans* functional orthologue of human protein h-mucopolipin-1 is required for lysosome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4483-4488.
- Tunlid, A., Jansson, H. B. und Nordbring-Hertz, B., 1992** Fungal attachment to nematodes. *Mycol Res* 96: 401-412.
- 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*. *J Gen Microbiol* 137: 1231-1240.
- Tunlid, A., Rosen, S., Ek, B. und Rask, L., 1994** Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology (Read)* 140 (Pt 7): 1687-1695.
- van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D. A., de Goede, R. G. M., Adams, B. J., Ahmad, W., Andriuzzi, W. S. et al., 2019** Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* 572: 194-198.
- van der Does, H. C., und Rep, M., 2007** Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 20: 1175-1182.
- van Megen, H., van den Elsen, S., Holterman, M., Karssen, 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.
- Veenhuis, M., Nordbring-Hertz, B. und Harder, W., 1985** An electron-microscopical analysis of capture and initial stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. *Anton Leeuw* 51: 385-398.
- Velez-Segarra, V., Gonzalez-Crespo, S., Santiago-Cartagena, E., Vazquez-Quinones, L. E., Martinez-Matias, N., Otero, Y., Zayas, J. J., Siaca, R., Del Rosario, J., Mejias, I. et al., 2020** Protein interactions of the mechanosensory proteins *Wsc2* and *Wsc3* for stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3* 10: 3121-3135.
- Veneault-Fourrey, C., und Martin, F., 2011** Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 14: 444-450.

- Visscher, H., Brinkhuis, H., Dilcher, D. L., Elsik, W. C., Eshet, Y., Looy, C. V., Rampino, M. R. und Traverse, A., 1996 The terminal paleozoic fungal event: evidence of terrestrial ecosystem destabilization and collapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2155-2158.
- Walko, G., Castanon, M. J. und Wiche, G., 2015 Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res* 360: 363-378.
- 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.
- Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., Franz, M., Grouios, C., Kazi, F., Lopes, C. T. et al., 2010 The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* 38: W214-220.
- Wernet, N., 2021 Charakterisierung des cysteinereichen Virulenzfaktors CyrA im Nematodenfangenden Pilz *Duddingtonia flagrans*, pp. in *Microbiology*. Karlsruher Institut für Technologie.
- Wernet, N., Wernet, V. und Fischer, R., 2021a The small-secreted cysteine-rich protein CyrA is a virulence factor participating in the attack of *Caenorhabditis elegans* by *Duddingtonia flagrans*. *PLoS Pathog* 17: e1010028.
- Wernet, V., Wackerle, J. und Fischer, R., 2021b The STRIPAK component SipC is involved in morphology and cell-fate determination in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *Genetics*.
- 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.
- Wiley, H. S., Shvartsman, S. Y. und Lauffenburger, D. A., 2003 Computational modeling of the EGF-receptor system: a paradigm for systems biology. *Trends Cell Biol* 13: 43-50.
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D. G., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S. A. et al., 2012 Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 77: 235-247.
- Winter, A. D., und Page, A. P., 2000 Prolyl 4-hydroxylase is an essential procollagen-modifying enzyme required for exoskeleton formation and the maintenance of body shape in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 20: 4084-4093.
- Xie, M., Zhou, X., Xia, Y. und Cao, Y., 2019 Mid1 affects ion transport, cell wall integrity, and host penetration of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 103: 1801-1810.
- Xue, C., Park, G., Choi, W., Zheng, L., Dean, R. A. und Xu, J. R., 2002 Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus. *Plant Cell* 14: 2107-2119.
- Yang, C. T., Vidal-Diez de Ulzurrun, G., Goncalves, 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 U S A* 117: 6762-6770.
- Yang, J., und Kramer, J. M., 1994 In vitro mutagenesis of *Caenorhabditis elegans* cuticle collagens identifies a potential subtilisin-like protease cleavage site and demonstrates that carboxyl domain disulfide bonding is required for normal function but not assembly. *Mol Cell Biol* 14: 2722-2730.
- Yang, J., Wang, L., Ji, X., Feng, Y., Li, X., Zou, C., Xu, J., Ren, Y., Mi, Q., Wu, J. et al., 2011 Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PLoS Pathog* 7: e1002179.
- 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 U S A* 104: 8379-8384.
- 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 Genet 15: e1008029.
- Yu, X., Hu, X., Pop, M., Wernet, N., Kirschhofer, F., Brenner-Weiss, G., Keller, J., Bunzel, M. und Fischer, R., 2021** Fatal attraction of *Caenorhabditis elegans* to predatory fungi through 6-methyl-salicylic acid. Nat Commun 12: 5462.
- Zarnowski, R., Sanchez, H., Covelli, A. S., Dominguez, E., Jaromin, A., Bernhardt, J., Mitchell, K. F., Heiss, C., Azadi, P., Mitchell, A. et al., 2018** *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. PLoS Biol 16: e2006872.
- Zhang, G., Zheng, Y., Ma, Y., Yang, L., 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, H., und Labouesse, M., 2010** The making of hemidesmosome structures in vivo. Dev Dyn 239: 1465-1476.
- Zhang, S., und Xu, J. R., 2014** Effectors and effector delivery in *Magnaporthe oryzae*. PLoS Pathog 10: e1003826.
- Zhang, Y., Li, W., Li, L., Li, Y., Fu, R., Zhu, Y., Li, J., Zhou, Y., Xiong, S. und Zhang, H., 2015** Structural damage in the *C. elegans* epidermis causes release of STA-2 and induction of an innate immune response. Immunity 42: 309-320.
- Zou, C. G., Ma, Y. C., Dai, L. L. und Zhang, K. Q., 2014** Autophagy protects *C. elegans* against necrosis during *Pseudomonas aeruginosa* infection. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 12480-12485.
- 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., und Ewbank, J. J., 2009** Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF-beta signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* epidermis. Nat Immunol 10: 249-256.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Professor Reinhard Fischer bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Thema zu forschen. Er half bei vielen schwierigen Fragestellungen und hat mich bei vielem unterstützt.

Außerdem möchte ich mich bei Professor Dr. Sylvia Erhardt für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Danke auch an das Erhardt und Requena-Lab für den Austausch und die Unterstützung.

Vielen Lieben Dank an Elke, die einfach alles möglich macht, und auch den kurzfristigsten Injektions-Bitten nachgeht. Ohne dich hätte ich diese Arbeit nicht schreiben können!

Tausend Dank an die gesamte Wurm-Gruppe! Marius, Anna-Lena und Maria S. für die Unterstützung im Labor und die schönen Diskussionen. Danke an „die alte Truppe“ Theresa, Maria, Valentin und Nicole. Wir waren ein tolles Team! Danke für die tollen Diskussionen und für eure Freundschaft!

Nicole, dir gehört mit der größte Dank! Danke, dass du mich damals nochmal gefragt hast, ob ich die MA bei dir machen möchte. Ein Teil dieser Arbeit gehört auch dir. Ohne dich wäre ich heute nicht hier!

Danke an die ganze Fischer-Gruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre und den Austausch.

Der größte Dank geht an meine Familie, die mich bei allem unterstützt hat, was ich gemacht habe. Ohne euch hätte ich diese Möglichkeit nie gehabt. Danke an meine Schwester, die sich immer um mich gesorgt hat und meine Mama, meinen Ruhepol. Natürlich auch an meine Oma, Papa, Matthias und Elena. Ihr wart die beste Ablenkung in stressigen Zeiten.

Mein aller größter Dank geht an Kevin. Danke, dass du immer für mich da bist, egal wie ich manchmal bin. Wir verstehen uns blind! Ich freue mich auf weitere Abenteuer mit dir!