



Funktionelle Charakterisierung des Virulenzfaktors PefD  
im Nematoden-fangenden Pilz *Arthrobotrys flagrans*  
und seine Rolle bei der Infektion des Wirtes  
*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. Anna-Lena Klemke**

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

2. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2026

## Desiderata

Gehe ruhig und gelassen durch Lärm und Hast und sei des Friedens eingedenk, den die Stille bergen kann. Stehe, soweit ohne Selbstaufgabe möglich, in freundlicher Beziehung zu allen Menschen. Äußere deine Wahrheit ruhig und klar und höre anderen zu, auch den Geistlosen und Unwissenden; auch sie haben ihre Geschichte. Meide laute und aggressive Menschen, sie sind eine Qual für den Geist. Wenn du dich mit anderen vergleichst, könntest du bitter werden und dir nichtig vorkommen; denn immer wird es jemanden geben, größer oder geringer als du. Freue dich deiner eigenen Leistungen wie auch deiner Pläne. Bleibe weiter an deiner Laufbahn interessiert, wie bescheiden auch immer. Sie ist ein echter Besitz im wechselnden Glück der Zeiten. In deinen geschäftlichen Dingen lass Vorsicht walten; denn die Welt ist voller Betrug. Aber dies soll dich nicht blind machen gegen gleichermaßen vorhandene Rechtschaffenheit. Viele Menschen ringen um hohe Ideale; und überall ist das Leben voller Heldentum. Sei du selbst, vor allem heuchle keine Zuneigung. Noch sei zynisch was die Liebe betrifft, denn auch im Angesicht aller Dürre und Enttäuschung ist sie doch immerwährend wie das Gras. Ertrage freundlich-gelassen den Ratschluss der Jahre, gib die Dinge der Jugend mit Grazie auf. Stärke die Kraft des Geistes, damit sie dich in plötzlich hereinbrechendem Unglück schütze. Aber beunruhige dich nicht mit Einbildungen. Viele Befürchtungen sind Folge von Erschöpfung und Einsamkeit. Bei einem heilsamen Maß an Selbstdisziplin sei gut zu dir selbst. Du bist ein Kind des Universums, nicht weniger als die Bäume und die Sterne; du hast ein Recht hier zu sein. Und ob es dir nun bewusst ist oder nicht: Darum lebe in Frieden mit Gott, was für eine Vorstellung du auch von ihm hast und was immer dein Mühen und Sehnen ist. In der lärmenden Wirrnis des Lebens erhalte dir den Frieden deiner Seele. Trotz all ihrem Schein, der Plackerei und den zerbrochenen Träumen ist diese Welt doch wunderschön. Sei vorsichtig. Strebe danach, glücklich zu sein.

Max Ehrmann (Terre Haute, Indiana,USA) 1927

## **Eidesstattliche Erklärung**

Die Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation wurden von 2023 bis 2026 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 09.03.2026

---

Anna-Lena Klemke

## Publikationsliste

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

Pop, M., **Klemke, A.-L.**, Seidler, L., Wernet, N., Steudel, P. L., Baust, V., Wohlmann, E. und Fischer, R. (2024) *Caenorhabditis elegans* neuropeptide NLP-27 enhances neurodegeneration and paralysis in an opioid-like manner during fungal infection. *iScience* 27, 109484.

**Klemke, A.-L.**, Hu, X., Wernet, N., Wernet, V., Wohlmann, E. und Fischer, R. (2026) The fungal virulence factor PefD activates sleep neurons of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.*, in Review

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Nematoden-fangende Pilze (NFP).....	1
1.1.1 Ökologische Bedeutung und Lebensweise.....	1
1.1.2 Lebenszyklus und Fallenbildung.....	3
1.2 Modellorganismus <i>C. elegans</i> .....	5
1.2.1 Biologie und Lebenszyklus.....	5
1.2.2 Schlaf in <i>C. elegans</i> .....	8
1.3 Interaktion zwischen NFP und Nematoden.....	10
1.4 Virulenzfaktoren.....	12
1.4.1 Das putative Effektorprotein D (PefD).....	15
1.5 Proteindisulfidisomerasen.....	16
1.6 Ziele der Arbeit.....	18
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>19</b>
2.1 Bioinformatische Analyse von PefD.....	19
2.2 PefD ist ein kleines sekretiertes Protein.....	20
2.3 Expression von <i>pefD</i> ist während der Infektion hochreguliert.....	21
2.4 PefD lokalisiert in Infektionsstrukturen.....	26
2.5 Deletion von <i>pefD</i> führt zu verringerter Virulenz.....	30
2.6 Heterolog exprimiertes PefD in <i>C. elegans</i> akkumuliert in den Coelomocyten.....	33
2.7 Neuronal exprimiertes <i>pefD</i> führt zu verlangsamter Bewegung und allgemein höherer Aktivität des RIS-Neurons in <i>C. elegans</i> .....	36
2.8 Proteindisulfid-Isomerasen in <i>A. flagrans</i> .....	43
2.8.1 Expression von PDI1 (DFL_002885) ist während der Infektion hochreguliert.....	45
2.8.2 PDI1 lokalisiert im ER.....	49
2.8.3 Deletion von PDI1 beeinflusst Pathogenität von <i>A. flagrans</i> .....	50
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>53</b>
3.1 Verschiedene Sekretionsmechanismen für Virulenzfaktoren in <i>A. flagrans</i> ....	54
3.2 Expression von <i>pefD</i> ist abhängig vom Lebensstil von <i>A. flagrans</i> .....	55
3.3 Die Lokalisation gibt Hinweise, dass PefD ein Effektor der mittleren Phase des Infektionsprozesses ist.....	56
3.4 PefD ist an der Paralyse gefangener Nematoden beteiligt.....	57
3.5 Heterologe Expression von PefD in <i>C. elegans</i> führt zu einer Lokalisation in den Coelomocyten.....	58
3.6 PefD beeinflusst das schlafaktive Neuron RIS und moduliert die Lokomotion von <i>C. elegans</i> .....	59

3.7 Die Rolle des PDI1 Homologs in <i>A. flagrans</i> .....	62
3.8 Fazit und Ausblick.....	65
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>66</b>
4.1 Verwendete Materialien, Geräte und Chemikalien .....	66
4.2 Verwendete Organismen und Vektoren.....	69
4.3 Molekularbiologische Methoden .....	79
4.2 Mikrobiologische Methoden .....	86
4.3 Mikroskopische Methoden .....	95
4.4 Software und Datenbanken .....	97
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>109</b>

## Zusammenfassung

Nematoden-fangende Pilze (NFP), wie *Arthrobotrys flagrans*, sind eine besondere Gruppe an räuberischen Pilzen. Unter Nährstoffmangel können sie von einem saprotrophen Lebensstil in einen prädatorischen Lebensstil wechseln. Der Indikator für diesen Wechsel stellt das Ausbilden von spezialisierten dreidimensionalen Fangstrukturen dar. Mit diesen Fallen werden Nematoden, wie *Caenorhabditis elegans*, gefangen und als Nährstoffquelle benutzt. Mit dieser Eigenschaft eignen sich NFP als biologisches Bekämpfungsmittel pflanzen- und tierparasitärer Nematoden. Der Pilz produziert volatile Moleküle, die die Nematoden in die Fallen locken. Wenn der Nematode in der Falle ist, penetriert der Pilz den Nematoden, die Paralyse setzt ein und der Pilz bildet einen Infektionsbulbus, von dem dann die trophischen Hyphen den Nematoden kolonisieren. Während dieser interspezies-Kommunikation produziert und sekretiert der Pilz Virulenzfaktoren, die dem Pilz bei der Kolonisation der Nematoden helfen.

Trotz der ökologischen Anwendung und angewandten Bedeutung sind viele molekulare Mechanismen des Infektionsprozesses noch unzureichend untersucht. Insbesondere die Rolle von Effektorproteinen während der Infektion wie sie den Wirt beeinflussen, ist bislang nur teilweise aufgeklärt. Die ersten dieser Virulenzfaktoren wurden in *A. flagrans* charakterisiert, wobei andere noch in Bearbeitung sind.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des putativen Effektorproteins PefD aus *A. flagrans*, mit Augenmerk auf die Funktion während der Infektion von *C. elegans*. Zusätzlich sollten Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) in *A. flagrans* identifiziert und ihre Rolle während der Infektion untersucht werden.

Bioinformatische Analysen zeigten, dass PefD ein kleines cysteinreiches Protein mit einer Länge von 72 Aminosäuren ist und ein N-terminales Signalpeptid besitzt. Mittels eines Laccase-Assays wurde die Funktionalität des Signalpeptids bestätigt. Expressionsanalysen zeigten, dass *pefD* im induzierten Zustand hochreguliert ist. PefD lokalisierte während der mittleren Phase der Infektion im Infektionsbulbus. Eine Deletion des *pefD* Gens im Pilz führte zu einer verlangsamten Paralyse, was auf eine mögliche Rolle während der Infektion hindeutet. Darüber hinaus wurde *pefD* heterolog in *C. elegans* exprimiert, um mögliche Effekte auf den Wirt zu untersuchen. Dabei wurde gezeigt, dass neuronal exprimiertes *pefD* in einen verlangsamten Bewegungsphänotyp und eine erhöhte Aktivität des schlaf-aktiven Ring-Interneurons S (RIS) resultiert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass PefD

möglicherweise gezielt neuronale Prozesse im Wirt manipuliert, um die Paralyse zu fördern und so die Kolonisierung des Nematoden zu erleichtern. Dabei sind in nachfolgenden Arbeiten, die molekularen Mechanismen, die für die Funktion von PefD und seine möglichen Interaktionspartner noch zu identifizieren.

Neben der Untersuchung von PefD wurde auch die Rolle eines PDI1-Homologs in *A. flagrans* analysiert. PDIs sind wichtige Enzyme im ER, die bei der Proteinfaltung die Bildung, Reduktion und Umlagerung der Disulfidbrücken katalysieren. Da viele der sekretierten kleinen Proteine während des Infektionsprozesses cysteinreich sind, wurde eine mögliche Rolle von PDI an der Faltung der Effektorproteine während der Infektion hypothetisiert. Expressionsanalysen zeigten, dass *pdi1* im induzierten Zustand leicht hochreguliert ist und Fluoreszenzstudien bestätigten die Lokalisation im ER. Eine Deletion von *pdi1* zeigte einen langsameren Wachstumsphänotyp und eine reduzierte Virulenz, die auf der Tatsache beruht, dass der Deletionsstamm nicht mehr in der Lage ist Fallen zu bilden. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass PDI1 virulenzfördernd wirkt und eventuell zur Faltung der während der Infektion sekretierten kleinen Proteine beiträgt.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit neue Einblicke in die molekularen Mechanismen des Infektionsprozesses. und erweitert zudem das Verständnis der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt.

## Abstract

Nematode-trapping fungi (NTFs), such as *Arthrobotrys flagrans*, are a special group of predatory fungi. Under nutrient starvation, they can switch from a saprotrophic lifestyle to a predatory one. The indicator for this change is the formation of specialized three-dimensional trapping structures. These traps are used to capture nematodes, such as *Caenorhabditis elegans*, and use them as a source of nutrients. This feature makes NTF suitable as a biological control agent for plant and animal parasitic nematodes. The fungus produces volatile molecules that lure the nematodes into the traps. Once the nematode is in the trap, the fungus penetrates it, paralysis sets in, and the fungus forms an infection bulb, from which the trophic hyphae then colonize the nematode. During this interspecies communication, the fungus produces and secretes virulence factors that help with the colonization of the nematode.

Despite its ecological application and practical significance, many molecular mechanisms of the infection process remain poorly understood. In particular, the role of effector proteins during infection and how they influence the host has only been partially investigated. The first of these virulence factors were characterized in *A. flagrans*, while others are still being investigated.

The aim of this work is to characterize the putative effector protein PefD from *A. flagrans*, with a focus on its function during infection of *C. elegans*. In addition, protein disulfide isomerases (PDIs) in *A. flagrans* were to be identified and their role during infection investigated.

Bioinformatic analyses showed that PefD is a small cysteine-rich protein with a length of 72 amino acids and possesses an N-terminal signal peptide. The functionality of the signal peptide was confirmed using a laccase assay. Expression analyses showed that *pefD* is upregulated in the induced state. PefD localized in the infection bulb during the middle phase of infection. Deletion of the *pefD* gene in the fungus led to a slower paralysis, suggesting a possible role during infection. In addition, *pefD* was heterologously expressed in *C. elegans* to investigate possible effects on the host. It was shown that neuronally expressed *pefD* results in a slowed movement phenotype and increased activity of the sleep-active ring interneuron S (RIS). These results suggest that PefD may specifically manipulate neuronal processes in the host to promote paralysis and thus facilitate colonization of the nematode. In future work, the molecular mechanisms responsible for the function of PefD and its possible interaction partners still need to be identified.

In addition to investigating PefD, the role of a PDI1 homologue in *A. flagrans* was also analyzed. PDIs are important enzymes in the ER that catalyze the formation, reduction, and rearrangement of disulfide bridges during protein folding. Since many of the secreted small proteins are rich in cysteine during the infection process, a possible role of PDI in the folding of effector proteins during infection was hypothesized. Expression analyses showed that *pdi1* is slightly upregulated in the induced state, and fluorescence studies confirmed its localization in the ER. Deletion of *pdi1* resulted in a slower growth phenotype and reduced virulence, which is due to the fact that the deletion strain is no longer able to form traps. These results support the hypothesis that PDI1 promotes virulence and may contribute to the folding of small proteins secreted during infection.

In summary, this work provides new insights into the molecular mechanisms of the infection process and also expands our understanding of the interaction between pathogen and host.

# 1. Einleitung

## 1.1 Nematoden-fangende Pilze (NFP)

### 1.1.1 Ökologische Bedeutung und Lebensweise

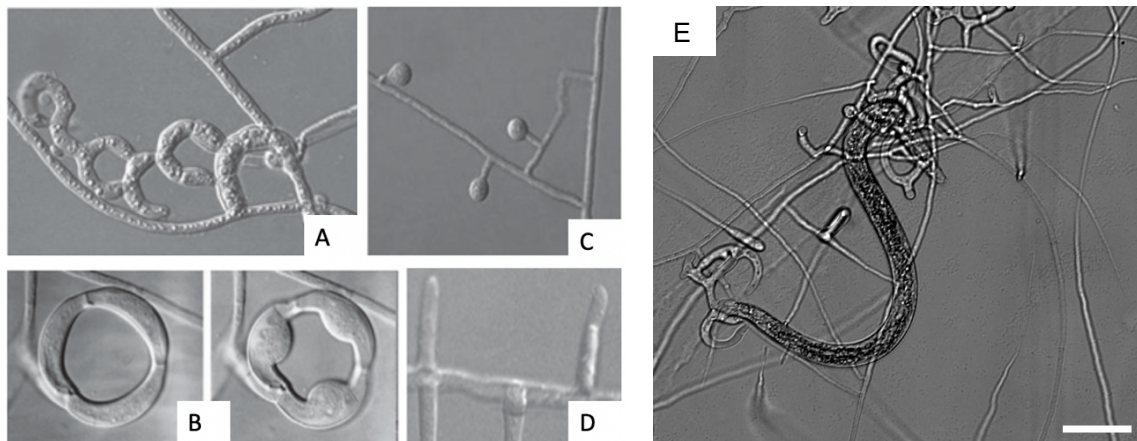
Prädation ist ein weit verbreiteter ökologischer Bestandteil der Nahrungskette. Typische Prädatoren sind Wolf oder Löwe, es gibt aber auch unscheinbarere wie Spinnen und Nematoden, oder aber auch prädatorische Pflanzen, wie die Venusfliegenfalle. Prädatoren gibt es in vielen Lebensräumen, da sie sehr gut angepasst sind an ihre jeweilige Lebenssituation. Auch im Reich der Pilze gibt es prädatorische Arten. Eine spezielle Gruppe sind die nematophagen Pilze, welche von ihrem saprotrophen Lebensstil in einen prädatorischen wechseln können. Diese Gruppe an karnivoren Pilzen weist ein ubiquitäres Vorkommen auf. Sie sind sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Ökosystemen vertreten und ihr Vorkommen erstreckt sich von der Antarktis bis zu den Tropen (Jiang *et al.*, 2017). Entstanden ist die Gruppe der nematophagen Pilze durch evolutionäre Anpassung von cellulolytischen und ligninabbauenden Pilzen, die in einer stickstoffarmen Umgebung überleben mussten. Durch das Fangen von Nematoden haben sie sich einen Vorteil gegenüber rein saprotroph lebenden Pilzen in diesen stickstofflimitierenden Lebensumständen erschaffen (Barron, 2003). Während fossile Funde belegen, dass Nematoden schon vor 500 bis 600 Millionen Jahren existierten, fand man Hinweise auf Pilze, die Nematoden fangen erst vor 100 Millionen Jahren anhand von Bernsteinfossilien (Megen *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2007).

Nematophage Pilze lassen sich anhand ihres Fangmechanismus in vier Gruppen aufteilen: die Nematoden-fangenden Pilze (NFP), welche spezialisierte Fangnetzwerke ausbilden, die endoparasitischen Pilze, die eiparasitären Pilze und die toxinbildenden Pilze. Dabei sind die NFP eine zellbiologisch interessante Gruppe, da sich durch die Ausbildung spezialisierter Fangstrukturen die Morphologie der Pilze verändert (Zhang and Hyde, 2014).

NFP gehören zur Gruppe der Ascomycota, den Schlauchpilzen, darunter gehören circa 380 Arten zur Gattung der *Orbiliiales*. Anhand ihrer Fangstrukturen lassen sich die verschiedenen Gattungen unterscheiden. Es werden kontraktile Ringe, adhäsive Säulen und Kugeln und dreidimensionale adhäsive Ringstrukturen gebildet (**Abbildung 1A-D**) (Yang *et al.*, 2007b).

Die Gattung *Arthrobotrys* wurde 1839 gefunden und *Arthrobotrys oligospora* wurde als erster Vertreter dieser Gattung 1852 von Fresenius beschrieben (Fresenius,

1852). *A. oligospora* bildet dreidimensionale Fallennetzwerke aus, mit denen er Nematoden fängt. Ein naher Verwandter ist *Arthrobotrys flagrans*. Auch dieser Pilz bildet genau wie *A. oligospora* dreidimensionale Fangstrukturen zum Fangen der Nematoden aus (**Abbildung 1E**). Er spielt außerdem eine große Rolle in der Anwendung als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel gegen pflanzen- und tierparasitäre Nematoden (Liang *et al.*, 2019).



**Abbildung 1: Verschiedene Fallenmorphologien von NFP. [A]** adhäsive Ringstrukturen, **[B]** kontraktile Ringe, **[C]** adhäsive Kugeln, **[D]** adhäsive Säulen (verändert nach (Zhang and Hyde, 2014)) **[E]** Ein Nematode wurde mit dem adhäsiven dreidimensionalen Fallennetzwerk von *A. flagrans* gefangen. Maßstab 100 µm

Nematoden stellen für die Landwirtschaft und Viehzucht ein großes Problem dar (Liang *et al.*, 2019). Pflanzenparasitäre Nematoden können mithilfe eines Odontostylet Wurzelzellen penetrieren, was dann zu physiologischen Schäden führen kann, welche wiederum zum Absterben der Pflanzen führen können (Ahmad *et al.*, 2021). Auch können sie Überträger von Viruserkrankungen sein. Der Weinreben befallende Nematode *Xiphinema index* überführt durch das Penetrieren der Wurzelzellen die Viren für die Reisingkrankheit und führt dadurch zu großen Verlusten in der Ernte (Jones *et al.*, 2013). Pflanzenparasitäre Nematoden sind schätzungsweise für 15 % der Ernteauffälle weltweit verantwortlich und sorgen dadurch für erhebliche finanzielle Verluste in der globalen Landwirtschaftsindustrie (Vidal-Diez de Ulzurrun and Hsueh, 2018).

Auch Weidetiere, wie Schafe, werden von Nematoden befallen. Die Tiere nehmen die Nematoden vom Boden beim Fressen auf. Dadurch landen sie im Gastrointestinaltrakt, wo sie im Darm parasitieren. Auch ist die Gefahr der Reinfektion sehr groß, da die Eier der Nematoden mit dem Kot ausgeschieden werden und dann die Larven wieder durch das Gras aufgenommen werden (Healey *et al.*, 2018).

Die immer steigende Bevölkerung, welche die Landwirtschaft und Viehzucht als Nahrungsgrundlage nutzt, leidet an den Verlusten der Ernte oder der Produktgewinnung aus Tieren, welche durch Nematoden verursacht wurden. Früher wurden chemische Nematizide wie 1,2-Dibrom-3-Chlorpropan benutzt, welche aber aufgrund ihrer Umweltschädlichkeit nicht mehr zugelassen sind (Erickson, 2010). Als weitere Methoden wurden die Methode des heißen Dampfes benutzt, welche aber nur bedingt Erfolg aufwies (Barker and Koenning, 1998). Daher mussten andere Möglichkeiten gefunden werden, die Nematoden zu bekämpfen. Eine dieser Möglichkeiten ist der Einsatz der biologischen Schädlingsbekämpfung. Dabei werden NFP, wie *A. flagrans*, welche die Nematoden fangen und zersetzen im Boden eingesetzt. Ein Vorteil von *A. flagrans* ist die Bildung von Chlamyosporen unter Laborbedingungen. Diese Sporen sind resistent gegen viele Umwelteinflüsse und sind die Überdauerungsorgane des Pilzes (Wernet et al., 2021). Diese Eigenschaft wird sich bei Anti-Wurmmitteln für Tiere zu Nutzen gemacht. Ein Beispiel dafür ist BioWorma® (International Animal Health Products Pty Ltd, Australien). Die Chlamyosporen werden in Pelletform den Weidetieren wie Schafen verfüttert. Dabei überstehen die Chlamyosporen den Gastrointestinaltrakt und werden mit dem Kot ausgeschieden. Im Boden keimen die Pilzsporen aus und fangen mit den gebildeten Fangstrukturen die Nematoden im Boden (Healey et al., 2018). Auch die Ausbringung der Sporen auf Feldern ist möglich. Frühere Studien zeigten, dass *A. flagrans* auch in der Lage ist größere pflanzenparasitäre Nematoden wie *X. index* zu fangen (Wernet and Fischer, 2022). Damit sind die NFP ein aussichtsreiches Werkzeug zur Bekämpfung von Nematoden in der Landwirtschaft.

Da auf landwirtschaftlichen Feldern oft suboptimale Bedingungen, wie schwankende Nährstoffverfügbarkeit und andere Umweltstressoren vorliegen, ist es schwierig NFP als dauerhafte Methode zu etablieren. Im Labor können die optimalen Bedingungen zur Fallenbildung leicht hergestellt werden. Allerdings können genetische Optimierungsansätze helfen, die Pilze effizienter und anpassungsfähiger für den Einsatz als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel machen (Åhman et al., 2002; Yang et al., 2020).

### **1.1.2 Lebenszyklus und Fallenbildung**

Pilze sind sessile Lebewesen, wobei Nematoden mobile schnell bewegliche Tiere sind. Um diese als Beute nutzen zu können, haben NFP spezialisierte Fangmechanismen

entwickelt. NFP leben unter nährstoffreichen Bedingungen saprotroph im Boden und nutzen abgestorbenes organisches Material als Nährstoffquelle. Nur unter Nährstoffmangel und bei Kontakt mit Nematoden werden die Fallennetzwerke ausgebildet. Da dieser Prozess sehr energieaufwendig ist, benötigt der Wechsel zum räuberischen Lebensstil gewisse abiotische und biotische Faktoren. Die Fallenbildung ist der stärkste Indikator für den Wechsel vom saprotrophen zum räuberischen Lebensstil (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006; Pramer, 1964; Yang *et al.*, 2011).

Die Ausbildung der Fallen stellt den ersten Schritt beim Beutefang dar. Meist werden die spezialisierten Fallen erst durch direkten Kontakt mit den Nematoden ausgebildet (Tunlid *et al.*, 1992). Die Fallen haben eine spezifische Struktur und lassen sich morphologisch sehr gut von anderem vegetativem Myzel unterscheiden. Ein Unterschied ist dabei, dass Fallen bestimmte zytosolische Organellen, die *electron dense bodies*, besitzen, deren Funktion aber noch nicht verstanden ist (Veenhuis *et al.*, 1985). Der Modellorganismus der NFP; *A. oligospora*, ist oft Gegenstand für Studien, wie die Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen, wie sie auch *A. flagrans* ausbildet (Niu and Zhang, 2011). In einer Vorwärts-Genetik-Studie wurden 15 Mutanten von *A. oligospora* mit Defekten in der Fallenmorphogenese gefunden. Dabei konnten drei Gene mit Mutationen identifiziert werden. Die Proteine besitzen entweder eine Proteinkinasedomäne, eine Domäne mit unbekannter Funktion oder eine YAP-binding/ALF4/Glomulin Domäne (Huang *et al.*, 2021). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Deletion der G-Protein-beta-Untereinheit die Fallenbildung drastisch reduziert (Yang *et al.*, 2020). Auch die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Fus3 ist bei der Fallenbildung beteiligt. Durch Deletion kommt es nicht mehr zur Bildung von dreidimensionalen Fallennetzwerken, sondern zu spiralförmigen Hyphenknäulen (Xie *et al.*, 2023).

Während der Fallenbildung muss die Zellwand und auch das Zytoskelett der vegetativen Hyphen umprogrammiert werden. Aus einer vegetativen Hyphe bildet sich eine Verzweigung aus. Diese krümmt sich und fusioniert anschließend wieder mit der vegetativen Hyphe. Dabei bestehen diese ringförmigen Fallen aus drei Zellen. Dieser Prozess wird Anastomose genannt. Zwischen der vegetativen Hyphe und der Fallenhyphe muss eine Kommunikation stattfinden. Ein Signalaustausch findet statt beim Entgegenwachsen der beiden Hyphen. Das SO-Protein (SoFT) von *A. flagrans* ist bei diesem Zusammenspiel der beiden Hyphen beteiligt. Wenn es deletiert ist, findet keine Fusion der Fallenhyphe mit der vegetativen Hyphe statt und es entstehen keine

ringförmigen Fallen mehr (Youssar *et al.*, 2019). Ebenso führt die Deletion der STRIPAK Komponente SipC in *A. flagrans* zum Verlust der Fallenzellfusion (Wernet *et al.*, 2022).

Nach der Ausbildung der Fallen erfolgt das Fangen der Nematoden. Dabei verfügen die NFP über unterschiedliche Fallentypen, die sich in ihrer Funktion unterscheiden. Bei der aktiven Methode, wie sie bei kontraktilem Ringen der Fall ist, bestehen die Fallen aus drei Zellen, die bei Kontakt mit dem Nematoden anschwellen und diesen so in der Falle halten. Dieses Phänomen wird durch eine Signalkaskade aktiviert, die zu Wassereinstrom in die Zellen führt, wodurch diese anschwellen (Liu *et al.*, 2012). Bei den meisten anderen Fallen bleibt der Nematode beim Berühren der Falle an dieser kleben. Dabei sind die Fallen von einer extrazellulären Matrix umgeben. Der Kontakt mit den Nematoden führt dabei zu einer strukturellen Änderung dieser Haftsicht. Infolgedessen bleibt der Nematode an dieser Falle haften und ist fixiert (Tunlid *et al.*, 1991). Eine neue Studie zeigt, dass auch die Kollagene der Kutikula der Würmer eine Rolle bei der Adhäsion spielen (Chang *et al.*, 2025). Dieser Schritt ist ein wichtiges Ereignis für den Infektionsprozess.

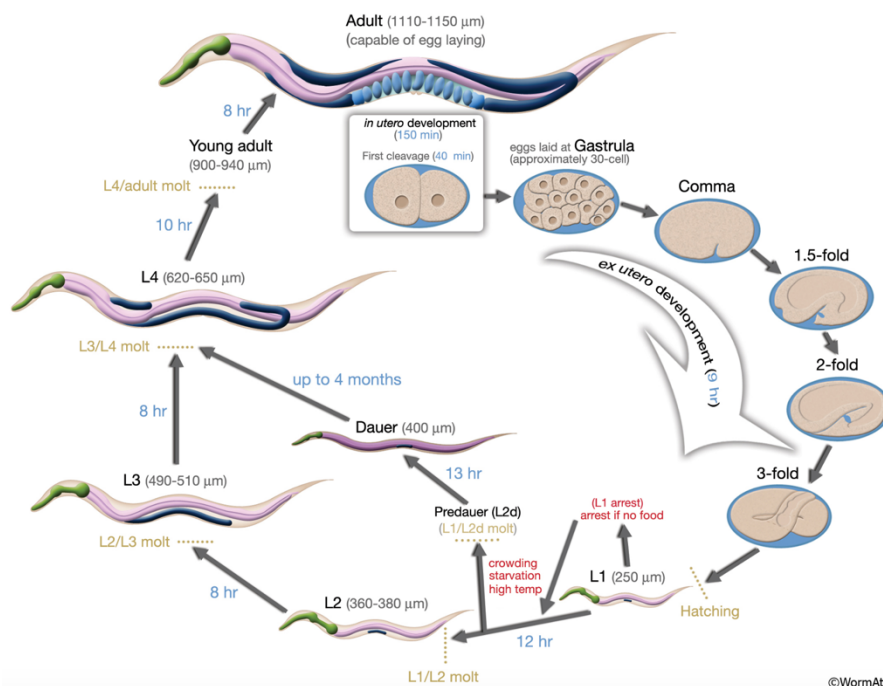
## **1.2 Modellorganismus *C. elegans***

### **1.2.1 Biologie und Lebenszyklus**

Der Fadenwurm *C. elegans* gehört zum Stamm der Nematoden und der Familie der Rhabditidae, in welcher auch pflanzen- und tierparasitäre Arten zu finden sind. Im Jahr 1974 wurde *C. elegans* erstmalig von Sydney Brenner als Modellsystem für Entwicklungsbiologie und Neurobiologie im Labor etabliert (Brenner, 1974; Corsi *et al.*, 2015). Seither hat sich *C. elegans* zu einem wichtigen Modellorganismus in der molekularbiologischen Forschung zur Untersuchung von Interaktionen eukaryotischer Zellen, allgemeinen Prozessen, aber auch zur Erforschung menschlicher Krankheiten entwickelt. Sydney Brenner wurde 2002 zusammen mit Robert Horvitz und John Sulston für ihre Arbeiten mit *C. elegans* mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.

Einer der Punkte warum *C. elegans* ein ausgezeichneter Modellorganismus ist, ist sein kurzer gut erforschter Lebenszyklus. Bei einer Umgebungstemperatur von 25 °C braucht die Entwicklung vom Ei zum adulten Tier nur drei Tage. Die Tiere durchlaufen nach dem Schlüpfen vier Larvenstadien (L1 - L4) und haben eine Lebensspanne von bis zu drei Wochen. Dabei können sie im zweiten Larvenstadium

bei Stress, wie Nahrungsmangel oder Überpopulation auch in ein Dauerstadium wechseln, in welchem sie Monate ausharren können, bevor sie bei besseren Bedingungen dieses Stadium wieder verlassen (**Abbildung 2**). In einer Population von *C. elegans* befinden sich hauptsächlich Hermaphroditen, selbstbefruchtende Zwitter, welche je 200 - 300 Eier legen können. Mit einer Häufigkeit von 0,2 % sind Männchen in der Unterzahl, können jedoch durch Stresssituationen vermehrt aufkommen, um für genetische Variabilität zu sorgen (Corsi *et al.*, 2015). Außerdem besitzen sie eine konstante somatische Zellzahl, welche es erlaubt, jede Zelle von der Befruchtung bis zum adulten Tier nachzuverfolgen. Dabei besitzen Männchen 1031 und Hermaphroditen 959 somatische Zellen. Damit ist *C. elegans* ideal für Studien über Zellteilung, Apoptose oder auch Zelldifferenzierung (Sulston *et al.*, 1983; Sulston and Horvitz, 1977).



**Abbildung 2: Der Lebenszyklus von *C. elegans*.** Die befruchteten Eier werden von Hermaphroditen gelegt und durchlaufen mehrere Zellteilungen bevor sie schlüpfen. Die geschlüpften Nematoden durchlaufen vier Larvenstadien (L1, L2, L3, L4). Auf jedes Larvenstadium folgt eine Häutung. Nach drei Tagen sind die Nematoden adult. Wenn die Bedingungen sich verschlechtern, zum Beispiel Nahrungsknappheit oder Überpopulation, können die L1 Larven einen alternativen Entwicklungsweg nehmen. Sie treten dann ins Dauerstadium ein. Dieses Larvenstadium dient der Überdauerung schlechter Bedingungen. Man erkennt es anhand des dünneren Körperbaus, der dickeren dreilagigen Kutikula und der kleineren Mundöffnung. Wenn sich die Bedingungen wieder verbessern, entwickelt sich die Dauerlarve ins L4 Stadium und geht den normalen Entwicklungsweg weiter ((Corsi *et al.*, 2015), wormatlas.org).

Ein weiterer Punkt weshalb er im Labor gerne benutzt wird, ist seine Größe, welche im adulten Stadium 1 mm beträgt. Dadurch kann man sie perfekt auf Petrischalen kultivieren und benötigt nicht viel Platz. Zudem kann die Beobachtung mit einem Stereomikroskop erfolgen (Corsi *et al.*, 2015). Hervorzuheben ist auch der transparente Körper, der es erlaubt Entwicklungsprozesse und innere Studien zu beobachten. Die Verwendung von fluoreszenten Proteinen zur Proteinlokalisierung oder Analyse von Expressionsmustern ist aufgrund des transparenten Körpers möglich (Chalfie *et al.*, 1994).

Durch seine einfache Handhabung im Labor konnten viele molekularbiologische Werkzeuge in *C. elegans* etabliert werden. Durch *forward* und *reverse* Genetik können viele biologische Fragestellungen auf Zellebene analysiert werden. Methoden wie CRISPR-Cas9 (Kim and Colaiácovo, 2019) oder RNA-Interferenz (RNAi) (Fire *et al.*, 1998) erlauben es Genexpression gezielt zu steuern und auch gezielt Mutationen im Genom zu erzeugen. Transgene, die nicht ins Genom integrieren sollen, können als extrachromosomale Arrays exprimiert werden.

1998 wurde das Genom von *C. elegans* als erstes Genom eines vielzelligen Organismus vollständig sequenziert. Es wurde festgestellt, dass 60-80 % der Gene menschliche Orthologe haben und 40 % der Gene, welche an menschlichen Krankheiten beteiligt sind, Homologe im Wurmgenom haben (Corsi *et al.*, 2015). Dies unterstreicht die Bedeutung von *C. elegans* als Modellorganismus für die Forschung von menschlichen Krankheiten. Das Verständnis an menschlichen Erkrankungen, wie Ischämie, Schlaganfälle oder neurodegenerative Erkrankungen, konnte durch Forschung an *C. elegans* erweitert werden (Markaki and Tavernarakis, 2020).

Auch zur Untersuchung von Wirt-Pathogen Interaktionen wird *C. elegans* verwendet. Dabei spielen die oben genannten Eigenschaften, wie die Größe, einfache Kultivierung im Labor und die Möglichkeit Verhalten auf molekularer Ebene zu untersuchen eine wichtige Rolle. Die Untersuchung der Interaktion zwischen NFP und *C. elegans* gibt Einblicke in evolutionäre Anpassungsstrategien der Räuber-Beute-Interaktion (Ermolaeva and Schumacher, 2014). Zudem besitzt der Nematode kein adaptives Immunsystem, sondern muss im Falle eines Pathogens auf die angeborene Immunantwort zurückgreifen (Pujol *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Schlaf in *C. elegans*

In den 1960er Jahren gewann die ontogenetische Hypothese des Schlafes an Bedeutung. Sie besagt, dass Schlaf eine wichtige Rolle während der Entwicklung des Nervensystems spielt. In jüngerer Zeit wurde festgestellt, dass Schlaf sowohl durch zirkadiane als auch nicht-zirkadiane Faktoren, wie bakterielle Infektionen, ausgelöst werden kann und dabei teilweise unterschiedliche neuronale Signalwege eine Rolle spielen (Trojanowski and Raizen, 2016).

In den letzten Jahren wurden immer mehr nicht zu den Säugetieren gehörende Modellorganismen, wie *Drosophila melanogaster*, die Fruchtfliege, oder *Danio rerio*, der Zebrafisch, im Labor für die Erforschung des Schlafes verwendet (Shaw *et al.*, 2000; Zhdanova *et al.*, 2001). Da es bei diesen Organismen nicht die Möglichkeit einer Elektroenzephalographie (EEG) gibt, wurde hier der Schlaf anhand von Verhaltenskriterien definiert. Diese Definition dient dazu den Schlaf von ruhigem Wachsein oder pathologischen Stillstand zu unterscheiden. Diese Verhaltenskriterien sind der Bewegungs- und Essensaufnahmestillstand, die Reversibilität, die reduzierte Wahrnehmung von sensorischen Reizen, die Körperform und die homöostatische Antwort. All diese Kriterien für Schlaf konnten auch in *C. elegans* gefunden werden. Bei *C. elegans* wurden zwei Stadien gefunden, welche die Kriterien für Schlaf erfüllen, den entwicklungsbedingten Schlaf (DTS – *developmentally-timed sleep*) und den Stress-induzierten Schlaf (SIS – *stress induced sleep*) (Trojanowski *et al.*, 2015; Trojanowski and Raizen, 2016).

DTS tritt nur für 2 - 3 Stunden nach den vier Larvenstadien auf. Dieser Schlaf ist nicht an den 24 - Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gebunden, wie bei Säugetieren, sondern orientiert sich an dem Häutungszyklus. *C. elegans* häutet sich nach jedem Larvenstadium, daher tritt DTS nach jedem Larvenstadium auf. Er zeichnet sich durch Bewegungseinstellung, die Einstellung von Nahrungsaufnahme, die verminderte Reaktion auf sensorische Reize und eine bestimmte Körperhaltung aus. Die Verbindung zwischen DTS in *C. elegans* und dem zirkadianen Schlaf in *Drosophila* ist das Gen *lin-42*, wessen Genprodukt das Homolog zum PERIOD Protein in *Drosophila* ist. PERIOD Expression passt sich dem zirkadianen Rhythmus an, wohingegen das *lin-42* Genprodukt mit der Häutungsphase und damit dem DTS zyklisiert (Trojanowski and Raizen, 2016).

SIS hingegen tritt nur nach Umweltreizen auf, welche für Zellstress sorgen. Die Länge dieses Schlafes ist hierbei abhängig vom Stressauslöser. Wie auch bei DTS

zeigen Würmer in SIS eine Einstellung der Fortbewegung und Nahrungsaufnahme. DTS tritt nur viermal im Lebenszyklus eines Nematoden auf, wobei SIS in jedem Entwicklungsstadium auftreten kann (Hill *et al.*, 2014). Dennoch werden sie durch dieselben konservierten Signalwege gesteuert, die auch in Säugetieren bekannt sind. Fünf Beispiele sind der Pigmentdispersionsfaktor (PDF), der Proteinkinase A und zyklisches Adenosinmonophosphat (PKA/cAMP) Signalweg, der Epidermalewachstumsrezeptor (EGFR), Dopamin und der Proteinkinase G (PKG) Signalweg. Dies zeigt, dass die Regulation des Schlafes breitflächig konserviert ist (Trojanowski and Raizen, 2016).

Für beide Schlaftypen wurde ein einzelnes Neuron gefunden, was an der Aktivierung des Schlafes eine wichtige Rolle spielt. Das mechanosensorische Anterior Lateral Neuron ALA wird für den stress-bedingten Schlaf benötigt, wobei seine Aktivierung durch den konservierten EGF/EGFR Signalweg gesteuert wird. Im ALA-Neuron werden drei Neuropeptide, *nlp-8*, *flp-13* und *flp-24*, exprimiert, die, wenn sie gemeinsam deletiert werden, den stress-induzierten Schlaf inhibieren (Nath *et al.*, 2016).

Das *single ring* Interneuron RIS ist wichtig für den Entwicklungsschlaf. Es wird durch den Transkriptionsfaktor Aptf-1 gesteuert, welche die Neuropeptidexpression in RIS beeinflusst. Das von RIS RFamid Neuropeptid FLP-11 induziert Schlaf nach RIS-Aktivierung (Turek *et al.*, 2013; Turek *et al.*, 2016).

Es wurde festgestellt, dass Schlaf nicht nur durch ein einzelnes Neuron, sondern durch neuronale Netzwerke gesteuert wird. Man ging immer davon aus, dass ALA und RIS parallel arbeiten, um den jeweiligen Schlaf zu aktivieren. Es gibt aber eine Studie, die zeigt, dass durch Stress der EGF/EGFR Signalweg angeschaltet wird, wodurch sowohl RIS als auch ALA aktiviert werden. Beide Interneuronen besitzen den EGFR Let-23, welcher durch EGFs wie Lin-3 aktiviert werden kann. Beide Neuronen geben Neuropeptide ab. ALA könnte *upstream* von RIS wirken, in dem es zu Schläfrigkeit führt und RIS aktiviert, was dann zum Schlaf führt (Konietzka *et al.*, 2020). RIS ist allerdings nicht nur für Schlaf notwendig, sondern kann auch auf Stress reagieren. Wenn RIS depolarisiert wird, kommt es zu einer Veränderung der Genexpression, in der Stress- und Schutzgene hochreguliert werden. Somit wirkt sich die RIS-Aktivität nicht nur auf den Schlaf aus, sondern schaltet auch Schutzmechanismen von *C. elegans* an (Busack and Bringmann, 2023).

Aufgrund seiner guten Eigenschaften als Modellorganismus und seines komplett entschlüsselten Nervensystems mit 302 Neuronen eignet sich *C. elegans* perfekt zur Untersuchung des Schlafes. Auch die Transparenz von *C. elegans* eignet sich gut für funktionelles neuronales Imaging. Auch andere Organismen wie *Drosophila* oder Säugetiere besitzen schlafinduzierende Neuronen. Dabei wird unterschieden, wie die Neuronen Schlaf fördern, die einen wirken direkt, die anderen indirekt. Bei den ersten depolarisiert das Neuron, es öffnen sich spannungsgeladene  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle. Dadurch fließen  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen in das Axon. Das Signal (Aktionspotential) wird entlang des Neurons weitergeleitet und führt zur Ausschüttung von Neurotransmittern wie Neuropeptiden an den Axonendigungen, welche direkt auf den Wach-fördernden Zyklus eingreifen. Dieser Typ von Schlaf-fördernden Neuronen wird schlafaktive Neuronen genannt, da die Depolarisation direkt den Schlaf induziert. Die zweite Gruppe an Schlaf-fördernden Neuronen wirkt indirekt auf den Schlaf bei Aktivierung oder Erhöhung der Aktivität der Schlaf-aktiven Neuronen (Bringmann, 2018). RIS und ALA von *C. elegans* gehören zur Gruppe der schlafaktiven Neuronen.

### 1.3 Interaktion zwischen NFP und Nematoden

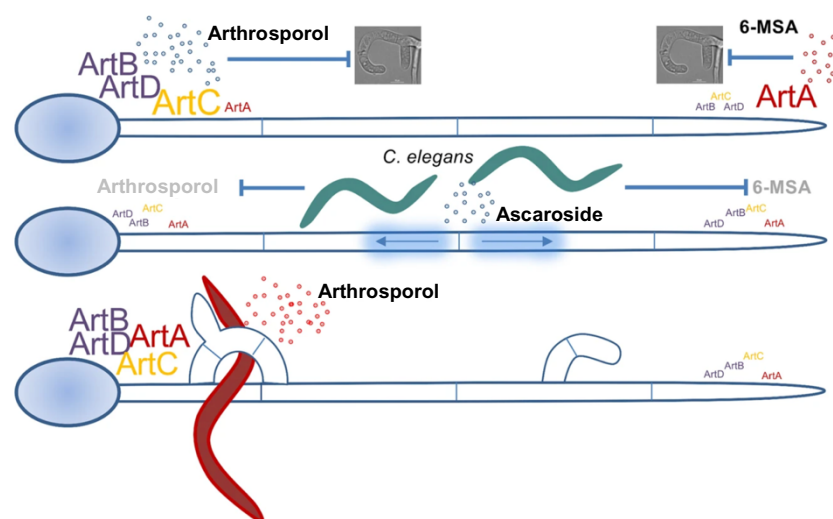
Für die Fallenbildung benötigt *A. flagrans* Nematoden in seiner unmittelbaren Nähe. Da die Fallenbildung energieaufwendig ist, sollte sie nur eingesetzt werden, wenn bei Nährstoffmangel auch Nematoden in der Nähe sind. Dazu muss eine interspezifische Kommunikation zwischen Nematoden, wie *C. elegans* und den NFP, wie *A. flagrans* stattfinden (Vidal-Diez de Ulzurrun and Hsueh, 2018).

Es wurde herausgefunden, dass NFP Ascaroside wahrnehmen können und dadurch die Würmer erkennen. Ascaroside sind Glykoproteine, die aus dem Didesoxyzucker Ascarose bestehen, welcher glykosidisch mit Fettsäuren verbunden ist. Sie sind hochkonservierte Proteine von den Nematoden und dienen als Pheromone (Hsueh *et al.*, 2013). In den Nematoden steuern sie viele wichtige Prozesse, wie das Altern, die Entwicklung und das Verhalten und andere Prozesse, die zum Überleben in Stressbedingungen notwendig sind. Außerdem beeinflussen sie das Dauerlarvenstadium und sorgen damit für das verlängerte Überleben der Nematoden in Stresssituationen (Park *et al.*, 2019). Der Pilz erkennt die Ascaroside mit denen die Würmer untereinander kommunizieren mittels G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Kuo *et al.*, 2024). Die wichtigen Funktionen der Ascaroside in den Nematoden

sorgen dafür, dass sie nicht aufgrund des Selektionsdruckes während der Evolution verloren gegangen sind.

Da die Pilze sessile Organismen sind und die Fallen energieaufwendig sind, produzieren die NFP verschiedene volatile Moleküle als Lockstoffe, um die Nematoden in die Fallen zu locken. *A. oligospora* produziert 2-Methyl-1-Butanol (MB), 2,4-Dithiapentan, Methyl-3-Methyl-2-Butanoat (MMB) und S-Methylthioacetat, welche an die Umgebung abgegeben werden (Hsueh *et al.*, 2017). Die Nematoden erkennen diese Stoffe anhand olfaktorischer Neuronen und G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese Stoffe ahmen den Geruch von verfaultem Obst und Sexualpheromonen nach, um anziehend für die Nematoden zu wirken und sie in die Fallen zu locken (Hsueh *et al.*, 2017).

Einer der Stoffe, der anziehend auf Nematoden wirkt, ist 6-Methylsalicylsäure (6-MSA). 6-MSA wird an der Hyphenspitze durch die Polyketidsynthase ArtA gebildet. Zusammen mit Arthrosporol, was in weiter von der Hyphenspitze entfernten Bereichen der Hyphe aus 6-MSA gebildet wird, wird die Fallenbildung gehemmt. Da 6-MSA aber anziehend auf die Nematoden wirkt, steigt die Ascarosidkonzentration um den Pilz herum an. Dadurch wird die Produktion von 6-MSA und Arthrosporol gehemmt und die Fallenbildung dadurch induziert. Wenn genügend Würmer gefangen und verdaut wurden und die Konzentration an Ascarosiden unter den Schwellenwert sinkt, wird die Produktion von 6-MSA und Arthrosporol durch das *artA*-Gencluster wieder erhöht. Dadurch wird unnötige Fallenbildung verhindert und Energie gespart (**Abbildung 3**) (Yu *et al.*, 2021).



**Abbildung 3: Regelung der Fallenbildung in *A. flagrans*.** *A. flagrans* produziert und sekretiert Arthrosporol und 6-MSA. Dabei wird 6-MSA an der Hyphenspitze produziert und sekretiert, während 6-MSA weiter hinten in der Hyphe in Arthrosporol umgewandelt wird. Beide Komponenten hemmen die Fallenbildung. Allerdings wirkt 6-MSA anziehend für die Nematoden und lockt diese an. Wenn genug

Nematoden in der Nähe sind, steigt die Konzentration an Ascarosiden. Ascaroside sind von Nematoden produzierte Pheromone. Das führt zur Runterregulierung des *artA*-Genclusters, sodass die Menge an Arthrosporol und 6-MSA im Pilz verringert wird. Dadurch können Fallen gebildet werden, um die Nematoden zu fangen. Nachdem die gefangenen Nematoden verdaut wurden und die Anzahl an Nematoden sinkt, sinkt auch die Konzentration an Ascarosiden. Dadurch wird das *artA*-Gencluster wieder aktiviert und Arthrosporol produziert. Dadurch wird die Fallenbildung wieder verhindert, sodass keine Energie verschwendet wird (verändert nach (Yu et al., 2021)).

Nach dem Anlocken und dem Fangen des Nematoden, startet der eigentliche Infektionsprozess. Dieser lässt sich in drei Phasen einteilen: frühe Phase vor der Penetration, mittlerer Phase mit der Penetration und direkt danach, und die späte Phase, in der der Nematode vom Pilz kolonisiert und verdaut wird. In den Fallen werden die Nematoden für die Penetration fixiert. Für den Pilz ist die Kutikula der Nematoden die erste Hürde, die es zu überwinden gibt. Um diesen Schutz der Nematoden zu überwinden, bildet der Pilz Penetrationshyphen aus, die aktiv in den Nematoden eindringen. Die Kutikula wird mittels mechanischen Druckes und/oder durch hydrolytische Enzyme, welche die Kutikula schwächen, vom Pilz penetriert. Kurz nach der Penetration wird eine runde Infektionsstruktur aus der Penetrationshyphne ausgebildet, der Infektionsbulbus. Aus dem Infektionsbulbus wachsen die trophischen Hyphen, die den Nematoden besiedeln und mit der Verdauung helfen. Nach erfolgreicher Verdauung verwandeln sich die Infektionsstrukturen wieder in vegetative Hyphen zurück (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006; Veenhuis *et al.*, 1985).

Die genauen Gene, die während des Infektionsprozesses eine Rolle spielen, sind noch nicht bekannt. Dennoch konnte eine differenzielle Genexpression während der Interaktion von *Monacrosporium haptotylum* mit *C. elegans* gezeigt werden (Andersson *et al.*, 2014; Fekete *et al.*, 2008).

#### **1.4 Virulenzfaktoren**

Die Interaktion zwischen Wirt und Pathogen ist ein komplexes dynamisches System, welches sich stetig weiterentwickelt. In diesen Wechselwirkungen nutzen Pathogene Effektorproteine und Virulenzfaktoren, um den Wirt zu beeinflussen und die Infektion zu ermöglichen. Auf den Wirt wird ein evolutionärer Druck ausgeübt. Wenn er überleben will, muss er Abwehrmechanismen gegen das Pathogen entwickeln. Hat der Wirt erfolgreiche Abwehrmechanismen entwickelt, so muss das Pathogen erneut eine

Strategie entwickeln, um die Pathogenität aufrecht zu erhalten (Van Der Does and Rep, 2007).

Dieses kontinuierliche evolutionäre Wettrüsten zwischen Wirt und Pathogen wird in der *Red-Queen*-Hypothese beschrieben. Die miteinander interagierenden Organismen wie Wirt und Pathogen stehen unter ständigem evolutionärem Druck und müssen sich kontinuierlich weiterentwickeln, um nicht unterzugehen. Diese Hypothese wurde erstmals 1973 von van Valen formuliert, der sie aus dem Roman „*Through the Looking-Glass, and What Alice Found There*“ von Lewis Carroll (1871) ableitete. Darin sagt die Rote Königin zu Alice: „Hierzulande musst du so schnell rennen, wie du kannst, wenn du am gleichen Fleck bleiben willst.“ (Van Valen, 1973). Dies bedeutet, dass sich Wirt und Pathogen nicht nur weiterentwickeln müssen, um einen Vorteil dem anderen gegenüber zu haben, sondern auch um selbst keinen Nachteil zu bekommen.

Auf molekularer Ebene wird diese Dynamik häufig durch das Gen-für-Gen-Modell erklärt. Dieses Modell wurde ursprünglich an Pflanzenpathogenen untersucht. Dieses Modell wurde entwickelt in Bezug auf die Wirt-Pathogen Interaktion zwischen der Nutzpflanze Flachs und dem Flachs Rostpilz *Melampsora lini* (Dodds *et al.*, 2006). Diese Hypothese besagt, dass es für jedes dominante Avirulenz-Gen des Pathogens ein entsprechendes Resistenzgen im Wirt gibt. Die Interaktion zwischen den Genprodukten führt zu Abwehrmechanismen im Wirt. Das Ziel ist es diesen Abwehrmechanismus zu umgehen. Dafür entwickeln sie gezielte Angriffsstrategien, die das Immunsystem des Wirts umgehen oder manipulieren (Flor, 1971; Stergiopoulos and De Wit, 2009).

Effektoren und Virulenzfaktoren können vielfältige molekulare Funktionen aufweisen. Sie können in die Zellbiologie des Wirtes eingreifen, die Abwehrmechanismen umgehen oder auch das Immunsystem des Wirtes manipulieren (Sperschneider *et al.*, 2015). Beispiele für Effektorproteine gibt es in den pflanzenpathogenen Pilzen *Ustilago maydis* und *Magnaporthe oryzae*. Bei dem Maisbrandpilz *U. maydis* sorgt das Effektorprotein Pep1 dafür, dass die Pilzhyphe die Maispflanze penetrieren kann, indem es die Pflanzenperoxidase POX12 hemmt, welche wichtig für die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Apoplasten ist (Doehlemann *et al.*, 2009). Damit wird der Abwehrmechanismus der Pflanze geschwächt. Ein anderer Effektor ist Pit2, welcher die apoplastische Cystein-Protease der Pflanze hemmt und dadurch der Salicylsäure-Abwehrmechanismus der Pflanze nicht mehr funktioniert (Mueller *et al.*, 2013). Ein weiteres Beispiel ist der Effektor Slp1 des Reisbrandpilzes *M. oryzae*.

Dieser akkumuliert zwischen der Zellwand der Pilze und der Plasmamembran der Reiszellen und ist dort für die Hemmung der Chitin-induzierten pflanzlichen Immunantwort verantwortlich (Mentlak *et al.*, 2012).

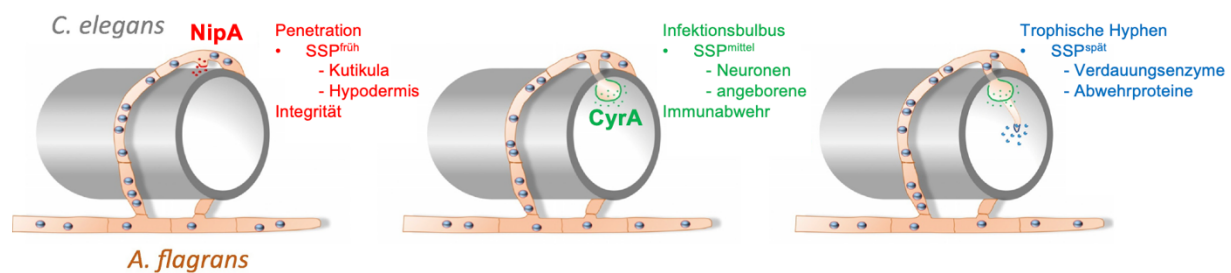
In molekularen Studien wurden bisher über 60 verschiedene pilzliche Effektorproteine gefunden. Allerdings ist das nur ein sehr kleiner Teil der tatsächlich existierenden Effektorproteine. Mit der steigenden Anzahl an sequenzierten Genomen von Pathogenen, steigt auch die Anzahl an Sequenzinformationen und virulenzassoziierten Faktoren, mit denen mit Hilfe von computergestützten Systemen mehr Effektoren gefunden werden können. Allerdings gestaltet sich die Vorhersage von pilzlichen Effektorproteinen mit Hilfe von *machine-learning-tools* als schwierig. Das Problem dabei ist, dass pilzliche Effektorproteine oft keine konservierten Domänen oder andere sequenzspezifischen Motive innerhalb der Arten aufweisen (Sperschneider *et al.*, 2015). Eine Gemeinsamkeit der Effektorproteine ist allerdings, dass die virulenzassoziierten Proteine von Pathogenen oft kleine sekretierte Proteine (*small-secreted proteins*, SSPs) mit einer Länge von weniger als 300 AS sind (Kim *et al.*, 2016).

Auch bei den NFP spielen Effektorproteine eine wichtige Rolle. Um das Infektionsgeschehen und die Interaktion zwischen NFP und Nematode genauer verstehen zu können, ist die Identifizierung von Effektorproteinen wichtig.

In *A. flagrans* wurde das Genom nach der Genomsequenzierung und -annotation auf das Vorkommen von kleinen sekretierten Proteinen hin untersucht. Dabei wurden 249 solcher SSPs gefunden. Mit dem *machine-learning Tool* EffectorP 2.0 wurden 117 der 249 SSPs als putative Effektorproteine vorhergesagt (Youssar *et al.*, 2019). Vier der möglichen Effektorkandidaten wurden schon charakterisiert. Dazu gehören PefB (putatives Effektorprotein B), NipA (Nematoden-induziertes Protein A) und das cysteinreiche Protein A, CyrA. Alle drei Proteine sind nur während der Infektion hochreguliert, weisen also eine differenzielle Genexpression auf. Diese Proteine wurden hinsichtlich ihrer Funktion während der Infektion von *C. elegans* untersucht. PefB transloziert dabei in Zellkerne in *C. elegans* (Youssar *et al.*, 2019). Das cysteinreiche sekretierte Protein NipA lokalisiert während der Infektion außerhalb der Penetrationsstelle und weist einen Effekt auf die Dauer der Penetration vor. Wird es heterolog in *C. elegans* exprimiert, kommt es zu Blasenbildung bei den Nematoden, was einen Hinweis auf die Funktion bei der Schwächung der Kutikula gibt. Somit wird dann das Eindringen des Pilzes in den Nematoden erleichtert (Emser *et al.*, 2024).

CyrA hingegen lokalisiert während der Infektion erst im Infektionsbulbus nach der Penetration. Ein Deletionsstamm des *cyrA* Gens weist eine verzögerte Paralysezeit auf, wodurch es eine Rolle bei der Unterdrückung des Nervensystems haben könnte (Wernet *et al.*, 2021a).

Die Untersuchung dieser Effektorproteine war die Grundlage für ein Modell, welches den Infektionsprozess und die Expression der Effektoren in drei Phasen einteilt: die frühe, mittlere und späte Phase. Bei der frühen Phase spielen Effektoren wie NipA eine Rolle, welche bei der Penetration der Nematoden helfen, indem sie als Beispiel die Kutikula schwächen. In der mittleren Phase sind Effektoren aktiv, die die Immunantwort oder auch die Paralyse beeinflussen, um das Kolonisieren der Nematoden zu erleichtern. Sie lokalisieren dabei häufig im Infektionsbulbus. Ein Beispiel dafür ist CyrA. In der letzten Phase, in der der Nematode von trophischen Hyphen durchwachsen und verdaut wird, spielen Effektoren eine Rolle, die bei der Verdauung helfen (**Abbildung 4**) (Fischer and Requena, 2022).



**Abbildung 4: Räumliche und zeitliche Verteilung der Effektoren während der Infektion.** Anhand der Lokalisationen und Expressionsmuster können die von *A. flagrans* produzierten SSPs in drei Stadien eingeteilt werden. Den frühen SSPs werden Rollen bei der Penetration zugeteilt, indem sie die Kutikula oder Hypodermis angreifen und so die Penetration erleichtern. Die Proteine lokalisieren an der Penetrationsstelle, wie NipA. Effektoren, die im Infektionsbulbus lokalisieren, wie CyrA gehören zu der Gruppe der mittleren SSPs. Sie spielen eine Rolle bei der Überwindung der angeborenen Immunabwehr des Nematoden oder interagieren vielleicht mit Nematoden. In den trophischen Hyphen lokalisieren Effektoren der Gruppe der späten SSPs und helfen bei der Verdauung des Nematoden (verändert nach (Fischer & Requena, 2022).

#### 1.4.1 Das putative Effektorprotein D (PefD)

PefD (putativer Effektor D, DFL\_005559) ist ein Protein aus *A. flagrans*, was durch Genomsequenzierung und anschließender Sekretomanalyse als eines der 117 von EffectorP 2.0 vorhergesagten putativen Effektorproteinen in *A. flagrans* identifiziert wurde (Youssar *et al.*, 2019). Es wurde ein 18 Aminosäure (AS) langes Signalpeptid und ein 10 AS langes Propeptid in dem 72 AS langen Protein mittels bioinformatischen

Tools vorhergesagt. Das Signalpeptid wurde mittels eines Laccase Reportersystems auf Funktionalität untersucht und die Funktionalität des Signalpeptids konnte bestätigt werden.

Um die Rolle von PefD während der Interaktion von *A. flagrans* und *C. elegans* zu untersuchen, wurde die Expression von *pefD* mittels quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR) und Promotorreporterstudien angeschaut. Die Expression von *pefD* war im induzierten Stadium mit Nematoden gegenüber dem uninduzierten Stadium ohne Nematoden erhöht. Die Promotorstudie zeigte eine Expression des Promotors lediglich in den Bereichen mit Fallen. Da dieses Experiment allerdings nur im Wildtyp Hintergrund durchgeführt wurde, konnte nicht bestätigt werden, dass die Expression in allen Zellkernen stattfindet. Die Lokalisation von PefD-GFP oder -mCherry Fusionskonstrukten wurde in den Fallen als vesikel-ähnliche Strukturen und auch im Infektionsbulbus beschrieben. Es konnte eine Kolokalisation von CyrA und PefD gezeigt werden. Um PefD eine Rolle während der Infektion nachzuweisen, wurde *pefD* in *A. flagrans* überexprimiert und auch im Locus deletiert. Ein *A. flagrans* Stamm mit einer Überexpression von *pefD* zeigte eine höhere nematizide Aktivität. Der Deletionsstamm von PefD wurde nicht weiter untersucht (Hu, 2022).

## 1.5 Proteindisulfidisomerasen

Die richtige Faltung von Proteinen ist wichtig für die Zelle. Denn wenn der Faltungsprozess nicht richtig funktioniert, hat es schwerwiegende Ausmaße für die Zelle. Fehlgefaltete Proteine führen nicht nur zum Verlust der Funktion, sondern können auch durch Aggregation die Funktion der ganzen Zelle stören. Fehlgefaltete Proteine kommen im Menschen bei einer Reihe von Krankheiten vor, wie zum Beispiel bei Alzheimer. Um dies zu verhindern, wird die Faltung in der Zelle durch Katalysatoren unterstützt, die die Faltung beschleunigen und durch Chaperone, die die Aggregation verhindern und fehlgefaltete Proteine abbauen (Wilkinson, 2004).

Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden Proteine translatiert und auch gefaltet, sodass sie ihre korrekte dreidimensionale Struktur erhalten, bevor sie an den Bestimmungsort transportiert werden. Ein Katalysator, der mit der Proteinfaltung im ER hilft, sind die Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs). PDIs lokalisieren im ER und spielen eine wichtige Rolle bei der oxidativen Proteinfaltung, indem sie die Bildung, Spaltung und Umlagerung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten katalysieren (Hatahet and Ruddock, 2009; Wilkinson, 2004).

PDIs gehören zur großen Gruppe der Dithiol/Disulfid-Oxidoreduktasen, der Thioredoxin Superfamilie. PDI ist in fünf Domänen eingeteilt: a, b, b', a', c. Dabei sind die a und a' Domäne homolog zum Protein Thioredoxin und enthalten jeder ein unabhängiges aktives Zentrum. Dieses aktive Zentrum besteht aus zwei Cysteinen in der Sequenz CXXC, welches für die Aktivität der PDI verantwortlich ist (Edman *et al.*, 1985). Die inaktiven Domänen b und b' sind sich in ihrer Sequenz ähnlich aber nicht zu Thioredoxin. Die Domäne c befindet sich am C-Terminus und enthält oft ein ER-Retentionssignal (Darby *et al.*, 1996; Wilkinson, 2004).

Während der Oxidation oder Reduktion der Disulfidbrücken wechselt das aktive CXXC-Zentrum zwischen seiner oxidierten und reduzierten Form. Im oxidierten Zustand bilden die Cysteine eines aktiven Zentrums Disulfidverbindungen zwischen sich aus, in der reduzierten Form liegen die Cysteinreste als Dithiole vor (Ali Khan and Mutus, 2014; Hatahet and Ruddock, 2009). In einer Oxidasereaktion werden Disulfidbrücken in ein Proteinsubstrat eingebaut, dabei wird dann das aktive Zentrum der PDI reduziert. Im Gegensatz dazu wird die Disulfidbrücke reduziert, indem das aktive Zentrum oxidiert wird. Bei der Disulfidisomerisierung werden die falsch gebildeten Disulfidbrücken des Proteinsubstrats wieder in die richtige Position konvertiert, dazu wird die Disulfidbrücke aufgebrochen und wieder neu gebildet zwischen den richtigen Cysteinen (Wilkinson, 2004). Somit sind die PDIs integraler Bestandteil der Qualitätskontrolle im ER.

Proteine, die sekretiert werden, werden im ER synthetisiert und auch gefaltet. Proteine mit vielen Cysteinresten, sind besonders auf die richtige Bildung der Disulfidbrücken angewiesen, da diese dem Protein Stabilität verleihen. Eine fehlerhafte Disulfidbindung führt zu Fehlfaltung und ER-Stress (Haynes *et al.*, 2004).

Die erste Aktivität einer PDI wurden 1963 in der Leber einer Ratte gefunden (Goldberger *et al.*, 1963). Im Menschen ist die PDI ein Mitglied einer Gruppe von 20 Proteinen, die im ER lokalisieren und arbeiten (Kozlov *et al.*, 2010). Auch in Pilzen wurden PDIs gefunden, die am besten erforschte PDI ist PDI1 von *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei wurde *pdi1* als essentielles Gen identifiziert, dessen Verlust letal ist. Dadurch wird die wichtige Bedeutung für die Proteinfaltung verdeutlicht (Farquhar *et al.*, 1991; LaMantia *et al.*, 1991; Tachikawa *et al.*, 1991).

Auch in pathogenen Pilzen wurden PDIs gefunden. *M. oryzae* MoPDI1 ist wichtig für die ER-Homöostase, in dem es an der Regulation von ER-Stress beteiligt ist und ER vermittelte Autophagie positiv reguliert. Außerdem ist es auch an der Pathogenität

beteiligt, indem es vom Wirt als Abwehrmechanismus gebildetes ROS abfängt und für eine richtige Sekretion des zytoplasmatischen Effektors AVR-Pia sorgt (Wang *et al.*, 2025a). Ein anderes Beispiel ist PDI1 von *U. maydis*, welche ebenfalls einen Einfluss auf die Virulenz hat. Eine Deletion von *pdi1* führt dazu, dass der Pilz nach der Penetration in der Pflanze nicht mehr weiterwachsen kann und so nicht die Pflanze kolonisieren kann (Marín-Menguiano *et al.*, 2019).

Auch wenn PDIs nicht als klassische Virulenzfaktoren gelten, so können sie als Virulenz-unterstützende Faktoren betrachtet werden. Auch NTF produzieren cysteinreiche Proteine, die kleinen sekretierten cysteinreichen Effektoren, wie CyrA und NipA (Emser *et al.*, 2024; Wernet *et al.*, 2021a). Auch hier sind richtig gebildete Disulfidbrücken für die Struktur und Pathogenität wichtig. Daher stellt sich die Frage ob PDIs in NTFs bei der Effektorsekretion und Faltung eine Rolle spielen.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es die vorausgegangenen Ergebnisse von PefD zu reproduzieren und durch ergänzende Experimente ein vollständiges Bild der Rolle von PefD während der Interaktion von *A. flagrans* und *C. elegans* zu bekommen. Um das Expressionsmuster von *pefD* genauer zu bestimmen, wurden RT-qPCRs mit RNA von verschiedenen Zeitpunkten der Infektion durchgeführt. Dies ermöglicht eine Vorhersage zu treffen, in welchen Stadien der Infektion PefD aktiv ist. Die Lokalisation mit GFP/mCherry Fusionskonstrukten wurde während der Infektion in *A. flagrans* angeschaut und mit den Lokalisationen andere Effektorproteine verglichen. Um die Rolle von PefD während der Infektion zu untersuchen, wurden der *A. flagrans* Deletions- und Überexpressionsstamm von *pefD* in einem Virulenzassay getestet. Heterologe Expression von *pefD* in *C. elegans* sollte Aufschluss über seine Wirkung auf den Wirtsorganismus geben. Dafür wurde *pefD* heterolog in *C. elegans* unter verschiedenen Promotoren von *C. elegans* mit und ohne Fluorophor exprimiert.

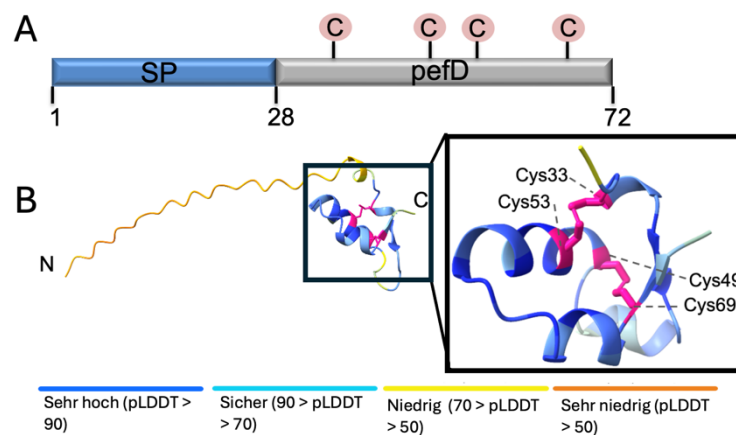
In *A. flagrans* werden viele kleine cysteinreiche Effektorproteine sekretiert. Die Untersuchung der PDI-Homologen in *A. flagrans* im Kontext der Interaktion zwischen NFP und Nematode könnte Aufschluss darüber geben, ob PDIs für die Faltung der Virulenzfaktoren wichtig ist, oder als Virulenz-unterstützende Faktoren einen Einfluss auf die Infektion ausüben.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Bioinformatische Analyse von PefD

Das Protein PefD besteht aus 72 AS und besitzt eine molekulare Masse von circa 8 kDa. Eine mithilfe von ProtParam durchgeführte detaillierte Analyse der Aminosäurezusammensetzung zeigte, dass PefD mit einem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 8,42 zu den basischen Proteinen gehört. Dies spiegelt sich auch in der Anzahl der positiv oder negativ geladenen Aminosäuren wider. Insgesamt enthält PefD 10 positiv geladene Aminosäuren (Arginin und Lysin) und 8 negativ geladene Aminosäuren (Glutamat und Aspartat). Die am häufigsten vorkommenden Aminosäuren sind Lysin und Valin mit jeweils 11,1 %. Der Instabilitätsindex beträgt 36,18, was das Protein als stabil klassifiziert. In der Aminosäuresequenz von PefD kommen außerdem vier Cysteinreste vor, was 5,6 % der Gesamtsequenz entspricht.

Mit Hilfe von AlphaFold 3 wurde ein Modell für PefD mit einem Vertrauensmaß (= pLDDT) von 73,9 vorhergesagt. Das Protein besteht aus mehreren kurzen  $\alpha$ -Helices und wenigen  $\beta$ -Strängen, die einen kompakten Bereich am C-Terminus bilden, während der N-Terminus als flexibler ungeordneter Abschnitt erscheint. Diese Strukturvorhersage von PefD zeigt, dass die vier Cysteine im Kernprotein lokalisiert sind. Diese vier Cysteinreste bilden zwei Disulfidbrücken untereinander aus, zwischen Cys33 und Cys53 sowie Cys49 und Cys 69. Die mit ChimeraX gemessenen Abstände zwischen den Schwefelatomen der Cysteine liegen mit 1,996 Å und 1,970 Å im typischen Bereich für kovalente Disulfidbrückenbindungen (**Abbildung 5B**).



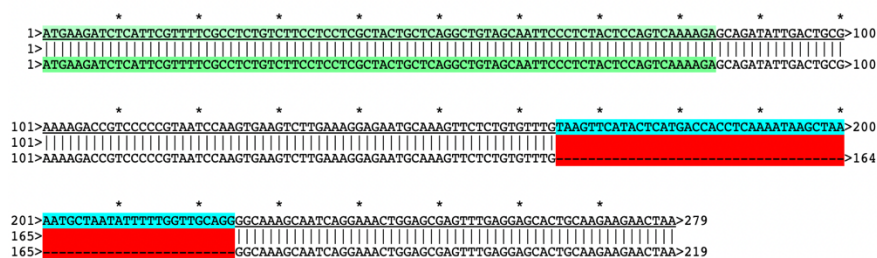
**Abbildung 5: PefD ist ein kleines, sekretiertes cysteinreiches Protein.** [A] Schematische Darstellung von PefD. Das 72 AS lange Protein enthält ein vorhergesagtes Signalpeptid (SP; AS 1-28; blau) am N-Terminus sowie vier Cysteinreste (AS 33, 49, 53, 69; pink) in der verbleibenden Sequenz (AS 29-72). [B] Vorhergesagte 3D-Struktur von PefD, modelliert mit AlphaFold 3. Der Farbverlauf zeigt

die pLDDT-Konfidenzwerte an, und die Cysteinreste und ihre Disulfidbrücken sind in dunklem Pink hervorgehoben.

Das Protein wurde nicht nur hinsichtlich seiner Struktur und Aminosäurezusammensetzung untersucht, sondern auch in Bezug auf weitere Eigenschaften wie Effektorwahrscheinlichkeit, das Vorhandensein eines Signalpeptids sowie mögliche Lokalisationen im Wirt. Mit dem Machine-Learning-Tool EffektorP 3.0 wurde PefD als dual lokalisierender Effektor vorhergesagt, mit Wahrscheinlichkeiten von 0,89 für einen zytoplasmatischen Effektor und 0,575 für einen apoplastischen Effektor. Durch eine WoLF PSORT Analyse wurde die subzelluläre Proteinlokalisierung vorhergesagt, wobei für PefD mit Signalpeptid eine extrazelluläre und ohne Signalpeptid eine zytoplasmatische Lokalisation vorhergesagt wurde. Mit SignalP 6.0 wurde ein 28 AS langes N-terminal gelegenes Signalpeptid mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,84 identifiziert (**Abbildung 5A**). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von früheren Untersuchungen, bei denen nur die ersten 18 AS als Signalpeptid mit einer älteren Version von SignalP vorhergesagt wurden (Hu, 2022). Zudem konnten bei PefD keine bekannten Domänen gefunden werden.

Sequenzierungsdaten zeigen, dass *pefD* ein Intron im ORF besitzt. Das Intron erstreckt sich über 20 AS (Codons 55 - 75) (**Abbildung 6**).

Die Suche nach ähnlichen Proteinen durch eine Blast-Suche ergab lediglich Treffer in anderen Nematoden-fangenden Pilzen.

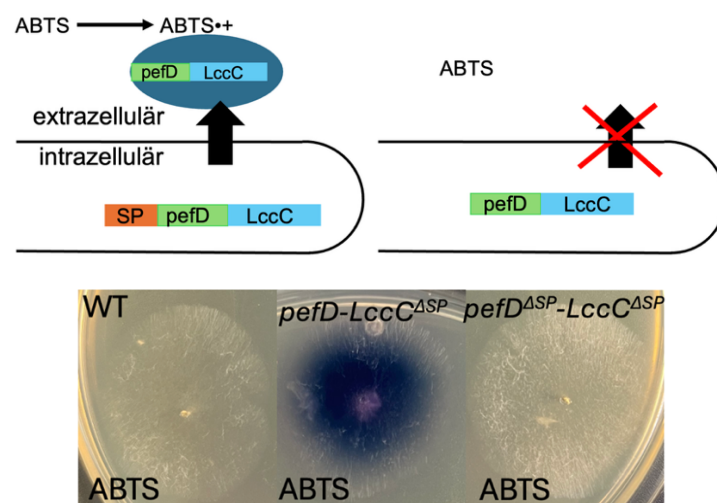


**Abbildung 6: Schematische Darstellung der *pefD*-Sequenzen.** Die Sequenz der genomischen DNA (oben) und der gespleißten mRNA/cDNA (unten) sind dargestellt. Das Signalpeptid ist grün markiert, während das Intron blau hervorgehoben ist und ausschließlich in der gDNA vorkommt.

## 2.2 PefD ist ein kleines sekretiertes Protein

Die Sekretion der Effektorproteine/Virulenzfaktoren ist ein Hauptmerkmal dieser Gruppe. Um die Funktionalität des vorhergesagten 28 AS langen und N-terminal gelegenen Signalpeptids zu überprüfen, wurde ein Laccase-Reportersystem verwendet. Dabei wurde das Gen *pefD* einmal mit (pXD19) und einmal ohne

vorhergesagtes Signalpeptid (pAK55) an das 3'-Ende des Laccase kodierenden Gens *lccC* aus *Aspergillus nidulans* ohne dessen Signalsequenz fusioniert. Die Expression dieses Fusionskonstruktes wurde durch den konstitutiven *gpdA*-Promotor aus *A. nidulans* kontrolliert. Der *A. flagrans* Wildtyp wurde mit diesen Konstrukten transformiert und Transformanten wurden auf PDA-Platten mit Hygromycin selektiert. Positive Transformanten wurden auf PDA-Platten mit 1mM ABTS überführt und 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Erfolgreiche Sekretion wird durch eine Blaufärbung des Mediums um die Hyphen der Kolonie nachgewiesen. Diese Verfärbung des Mediums wird durch die Oxidation des im Medium vorhandenen ABTS durch die sekretierte Laccase verursacht. Nach zwei Tagen zeigte nur das Medium um die Transformanden mit dem Volllängenprotein eine blaue Verfärbung. Um die Hyphen des Wildtyps sowie die der Kontrolle war keine Verfärbung des Mediums sichtbar (**Abbildung 7**). Damit wurde bewiesen, dass das Signalpeptid für die Sekretion von PefD essenziell ist.



**Abbildung 7: Laccase Assay für PefD.** Das vollständige *pefD* wurde C-terminal mit einer Laccase aus *A. nidulans*, der ihr eigenes Signalpeptid fehlt, fusioniert und unter Kontrolle des konstitutiven *gpdA*-Promotors exprimiert. Das Signalpeptid von *pefD* vermittelt die Sekretion des *pefD*-Laccase-Fusionsproteins, was zur Oxidation von ABTS im Medium führt und eine blaue Färbung verursacht. Die Deletion des Signalpeptids von *pefD* (*pefD* $\Delta$ *SP*) verhindert die Sekretion der Laccase (oberes Panel). Wildtyp und Transformanten wurden auf PDA-Platten mit 1mM ABTS für zwei Tage bei 28°C inkubiert. Dieser Assay zeigt, dass das Signalpeptid von *pefD* funktionell ist.

### 2.3 Expression von *pefD* ist während der Infektion hochreguliert

Erst in der prädatorischen Lebensphase von *A. flagrans* werden Effektorproteine exprimiert und sekretiert (Emser *et al.*, 2024; Fischer and Requena, 2022; Wernet *et al.*, 2021a). Stadienspezifische Expression ist daher ein weiteres Merkmal der

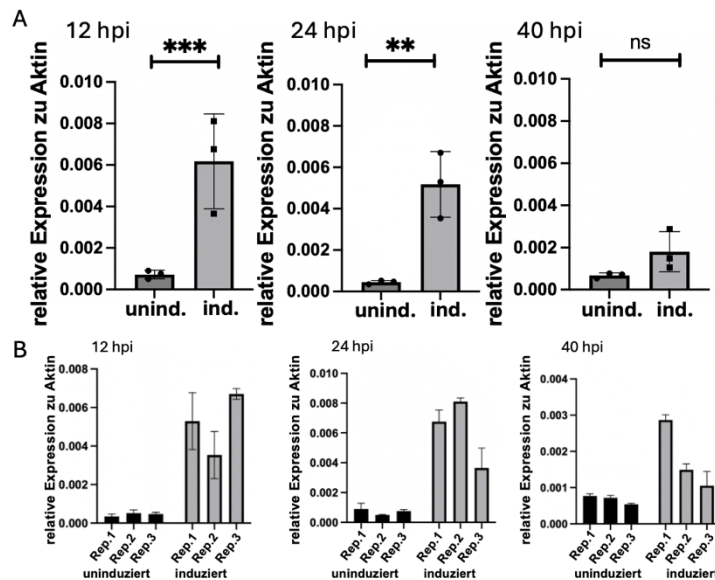
Effektorproteine und Virulenzfaktoren. Um die differenzielle Genexpression von *pefD* nachzuweisen, wurde das Expressionslevel von *pefD* in uninduziertem vegetativen Myzel und mit Nematoden induzierten Myzel mit Fallen mithilfe einer quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) bestimmt.

Für die Extraktion der DNA wurde *A. flagrans* sieben Tage lang bei 28 °C kultiviert und danach eine Sporensuspension hergestellt.  $1 \times 10^6$  Sporen pro Platte wurden ausplattiert und bei 28 °C inkubiert. Die uninduzierten Proben wurden für 48 Stunden inkubiert. Für die induzierten Proben wurde zur Fallenbildung nach 24 Stunden eine gemischte Population von *C. elegans* dazugegeben und weitere 24 Stunden ko-inkubiert. Das Myzel wurde von den mit Cellophan belegten Platten abgekratzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörsert. Die Isolierung und Aufreinigung der RNA erfolgte unter Verwendung der Trizol-Extraktionsmethode. Es wurden biologische Triplikate hergestellt, wobei ein Replikat Myzel von 10 Platten enthält. Der anschließende DNase-Verdau wurde mithilfe des Turbo-DNA-free Kits (Thermo Fischer Scientific) durchgeführt. Die qRT-PCR wurde in biologischen und technischen Triplikaten mit dem Luna One Step qPCR Kit (NEB) durchgeführt, wobei ein Ansatz 50 ng RNA enthielt. Als Referenzgen wurde das *gamma-Aktin* (DFL\_002353) von *A. flagrans* verwendet.

Eine vorausgegangene Arbeit zeigt, dass die Expression von *pefD* im induzierten Myzel höher ist als im uninduzierten Myzel (Hu, 2022). Um einen besseren Überblick darüber zu bekommen, in welcher Phase der Infektion PefD eine Rolle spielt, wurden erneut qRT-PCRs durchgeführt. Dafür wurde uninduziertes und induziertes Myzel zu verschiedenen Zeitpunkten für die RNA-Extraktion geerntet. Für die induzierten Proben wurde das Myzel einmal nach 12 Stunden, 24 Stunden und 40 Stunden nach der Zugabe von *C. elegans* von den LNA-Cellophan Platten gekratzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die RNA-Extraktion und Aufreinigung wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Die relative Expression von *pefD* war im induzierten Myzel 12 Stunden nach der Inokulation mit  $0,005 (\pm 0,001 \text{ SD}; n = 3)$  und 24 Stunden nach der Inokulation mit  $0,006 (\pm 7,8 \times 10^{-4} \text{ SD}; n = 3)$  im Vergleich zum uninduzierten Myzel 12 Stunden nach der Inokulation mit  $4,4 \times 10^{-4} (\pm 1,3 \times 10^{-4} \text{ SD}; n = 3)$  und 24 Stunden nach der Inokulation mit  $0,0007 (\pm 1,7 \times 10^{-4} \text{ SD}; n = 3)$  erhöht. 40 Stunden nach der Inokulation mit *C. elegans* konnte kein signifikanter Unterschied in der Genexpression festgestellt werden (**Abbildung 8A**). Die relative Expression von *pefD* weist zwischen den

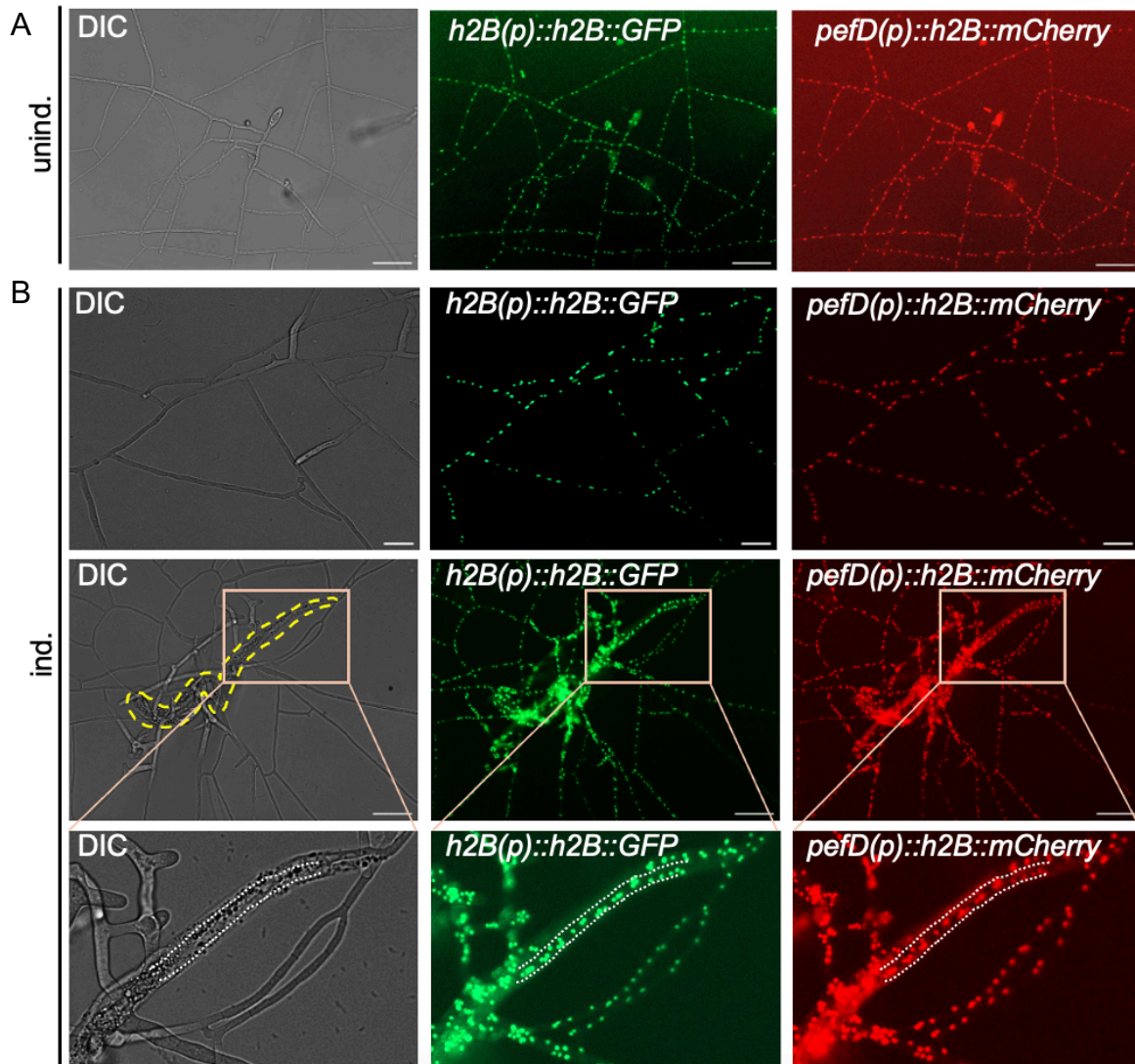
einzelnen Replikaten im induzierten Zustand Unterschiede auf, die die Varianz der Fallenzahl und gefangenen Nematoden auf den einzelnen Platten widerspiegelt (**Abbildung 8B**). Dennoch konnte eine erhöhte Genexpression von *pefD* im induzierten Myzel 12 und 24 Stunden nach der Inokulation im Vergleich zum uninduzierten Myzel festgestellt werden.



**Abbildung 8: *pefD* wird während des Infektionsprozesses hochreguliert.** **[A]** Relative Expression von *pefD*, bestimmt mittels qRT-PCR von RNA, die aus nicht induziertem Myzel auf LNA-Platten sowie aus mit Nematoden ko-inkubiertem Myzel isoliert wurde. Die qRT-PCR zeigt eine Hochregulation in der mittleren Phase des Infektionsprozesses. Proben wurden zu drei Zeitpunkten nach der Induktion mit Nematoden entnommen (12 h, 24 h, und 40 h). **[B]** Die drei Replikate der qRT-PCR sind einzeln dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei technischen Replikaten. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Fallen und Nematoden auf den einzelnen Platten, variiert die Expression von *pefD* im induzierten Zustand zwischen den Replikaten. Die statistische Signifikanz wurde mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test bestimmt ( $p \leq 0,005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*,  $p > 0,05$ ; ns). Die Expression wurde auf Aktin normalisiert.

Da die qRT-PCR allerdings keine räumliche, sondern nur eine zeitliche Auflösung der Genexpression von *pefD* liefert, wurde ein Promotor-Reporter-Assay durchgeführt. Indem der *pefD*-Promotor die Expression des mit mCherry fusionierten Histon Gens *h2B* steuert, dient dieser Assay der Visualisierung der Promotoraktivität von *pefD*. Das Fluorophor lokalisiert aufgrund der Fusion mit dem Histon 2B, welches eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) besitzt, in den Zellkernen und ermöglicht so die

eindeutige Unterscheidung des Signals. Durch dieses System ist es möglich zu sehen, wo *pefD* exprimiert wird.



**Abbildung 9: *pefD* wird in induziertem Myzel in den vegetativen Hyphen, den Fallen und auch in trophischen Hyphen exprimiert.** Räumliche Analyse der *pefD* Expression mittels Transkriptions-Reporter-Assay. Der *pefD*-Promotor wurde mit *h2B*-Gen und mCherry fusioniert und als Kontrolle wurde *h2B* mit seinem nativen Promotor mit GFP fusioniert. Bilder von induziertem und nicht induziertem Myzel wurden 24 Stunden nach der Inokulation aufgenommen. **[A]** Im nicht induzierten Myzel sieht man die Basalexpression von *pefD*. **[B]** Im induzierten Myzel sieht man *pefD* Expression in den vegetativen Hyphen, den Fallen und auch innerhalb der trophischen Hyphen. Gefangener Nematode ist durch gelb gestrichelte Linie markiert, die trophische Hyphe durch weiß gepunktete Linie. Das apricotfarbene Quadrat zeigt die Position der Vergrößerung. Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$

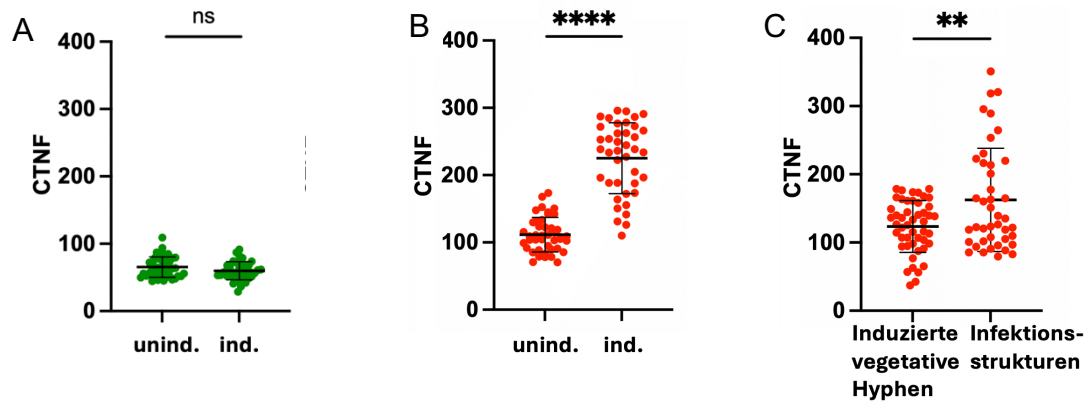
Für die Promotorfusion wurde das Plasmid pXD17 (Hu, 2022), welches das mCherry-Histon *h2B* Fusionsprodukt unter der Kontrolle des *pefD*-Promotors enthält, verwendet. Der Promotor von *pefD* erstreckt sich über 1,5 kb upstream vom Open-

Reading-Frame (ORF) von *pefD*. Dieser Vektor wurde in den *A. flagrans* Stamm sVW10 transformiert. Dieser Stamm exprimiert ein Konstrukt bestehend aus dem Fusionsprodukt des *h2B* Gens mit GFP unter der Kontrolle des konstitutiven *h2B*-p-Promotors (*h2B(p)::h2B::GFP*). Dadurch weisen die Zellkerne dieses Stammes eine grüne Fluoreszenz auf, was als Kontrolle diente. Transformanten wurden auf PDA-Platten mit Hygromycin selektiert. Positive Transformanten erhielten den Namen sAK19. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Transformanten mit einem Zahnstocher auf LNM-Agarpads angeimpft und für die Induktion der Fallenbildung mit einer gemischten Population von *C. elegans* bei 28 °C für 24 Stunden ko-inkubiert.

In uninduziertem Myzel ohne *C. elegans* des *pefD*-Promotor Reporterstammes war die Fluoreszenz der Zellkerne schwächer im Vergleich zum induzierten Myzel. Betrachtet man die induzierte Probe genauer, ist eine stärkere Fluoreszenz in Zellkernen der Fallen und auch der trophischen Hyphe zu sehen. Die GFP-Fluoreszenz der Zellkerne weist hingegen ein gleichmäßig starkes Signal sowohl in uninduzierten wie auch in induzierten Proben auf (**Abbildung 9**). Dieser Phänotyp war für alle getesteten Transformanten gleich.

Zur Quantifizierung der Expressionsstärke wurden einzelne Zellkerne im uninduzierten sowie im induzierten Myzel lokalisiert. Die Zellkerne wurden in ImageJ markiert und die Fluoreszenzstärke sowohl im GFP- als auch im mCherry-Kanal gemessen. Die gemessenen Intensitäten wurden jeweils gegen den Hintergrund relativiert. Dadurch wurde für jeden Kern sowohl der GFP als auch mCherry-Wert ermittelt. Die Werte der korrigierten totalen Kernfluoreszenz (*corrected total nuclei fluorescence*, CTNF) sind in Abbildung 10 dargestellt. Der Vergleich der Werte des GFP-Signals zeigt mit Werten von 65 ( $\pm 15$  SD;  $n = 40$ ) im uninduzierten Myzel und Werten von 60 ( $\pm 14$  SD;  $n = 43$ ) im induzierten Myzel keine Unterschiede in der Intensität der Zellkernfluoreszenz an (**Abbildung 10A**). Vergleicht man nun die Werte des mCherry-Signals des *pefD*-Promotor Reporterstammes, zeigen die Werte mit 225 ( $\pm 53$  SD;  $n = 39$ ) für induziertes Myzel und 112 ( $\pm 26$  SD;  $n = 43$ ) für uninduziertes Myzel, dass die Kerne im induzierten Myzel eine höhere Intensität aufweisen (**Abbildung 10B**). Werden nun die Intensitäten der Zellkerne zwischen induzierten vegetativen und den Infektionsstrukturen verglichen, so weisen die Zellkerne in Fallen und trophischen Hyphen mit Werten von 163 ( $\pm 76$  SD;  $n = 42$ ) gegenüber den induzierten vegetativen Hyphen mit Werten von 123 ( $\pm 38$  SD;  $n = 48$ ) eine leicht höhere Intensität auf (**Abbildung 10C**). Da die Fluoreszenzstärke des Reporters die

Promotoraktivität widerspiegelt, bestätigt dieses Experiment die differenzielle Expression von *pefD* in den Infektionsstrukturen. Damit ergibt sich eine erhöhte Expression von *pefD* im prädatorischen Lebensstil in der frühen und mittleren Phase der Infektion.



**Abbildung 10: Expression von *pefD* ist in den Infektionsstrukturen am höchsten.** Quantifizierung der korrigierten gesamten Kernfluoreszenz (CTNF) von mCherry und GFP in Zellkernen von induziertem (ind.) und uninduziertem (unind.) Myzel. **[A]** Das GFP-Signal der Zellkerne der Kontrolle war im uninduzierten und induzierten Myzel vergleichbar. **[B]** Das mCherry Signal, was die *pefD* Expression widerspiegelt, war im induzierten Myzel höher als im uninduzierten. **[C]** Unterscheidet man das induzierte Myzel in vegetative Hyphen und Infektionsstrukturen wie Fallen und trophischen Hyphen, ist das Signal der Zellkerne in den Infektionsstrukturen stärker als in den Hyphen. Die Zellkerne wurden mit ImageJ gemessen. Anzahl der gemessenen Zellkerne: *pefD(p)* ind.  $n = 40$ , *pefD(p)* unind.  $n = 43$ , *h2B(p)* ind.  $n = 39$ , *h2B(p)* unind.  $n = 43$ , ind. Vegetative Hyphen  $n = 48$ , Infektionsstrukturen  $n = 42$ . Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test bestimmt ( $p \leq 0,0001$ ; \*\*\*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*,  $p > 0,05$ ; ns).

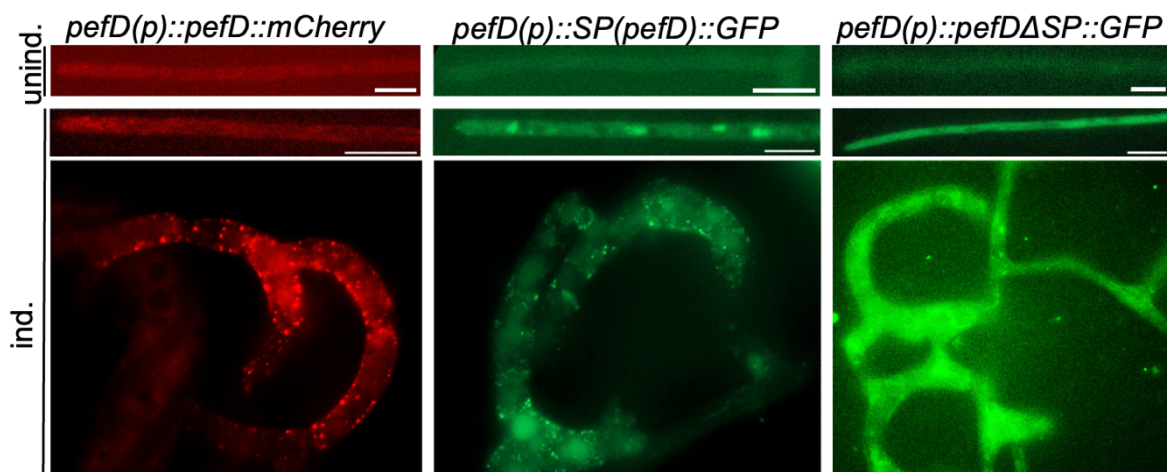
## 2.4 PefD lokalisiert in Infektionsstrukturen

Nicht nur die zeitliche Expression, sondern auch die räumliche Verteilung des Effektors hilft bei der Suche nach der Rolle von PefD während der Infektion. Die Lokalisation von PefD mithilfe von fluoreszierenden Proteinen hilft bei der Einordnung im Infektionsgeschehen. Dafür wurde *pefD* mit mCherry oder GFP fusioniert und diese Konstrukte in *A. flagrans* exprimiert. Zur Mikroskopie der Reporterstämme wurden diese auf dünnen LNM-Agarpads angeimpft und zur Induktion der Fallenbildung mit einer gemischten Population an *C. elegans* bei 28 °C für 24 Stunden inkubiert.

Aus einer vorangegangenen Arbeit ist bekannt, dass das PefD-GFP-Fusionskonstrukt unter dem konstitutiven *oliC*-Promotor von *A. nidulans* in Fallen in vesikelartigen Strukturen lokalisiert (Hu, 2022). Um zu überprüfen, ob diese spezifische Lokalisation auch unter dem nativen Promotor von *pefD* vorkommt, wurde

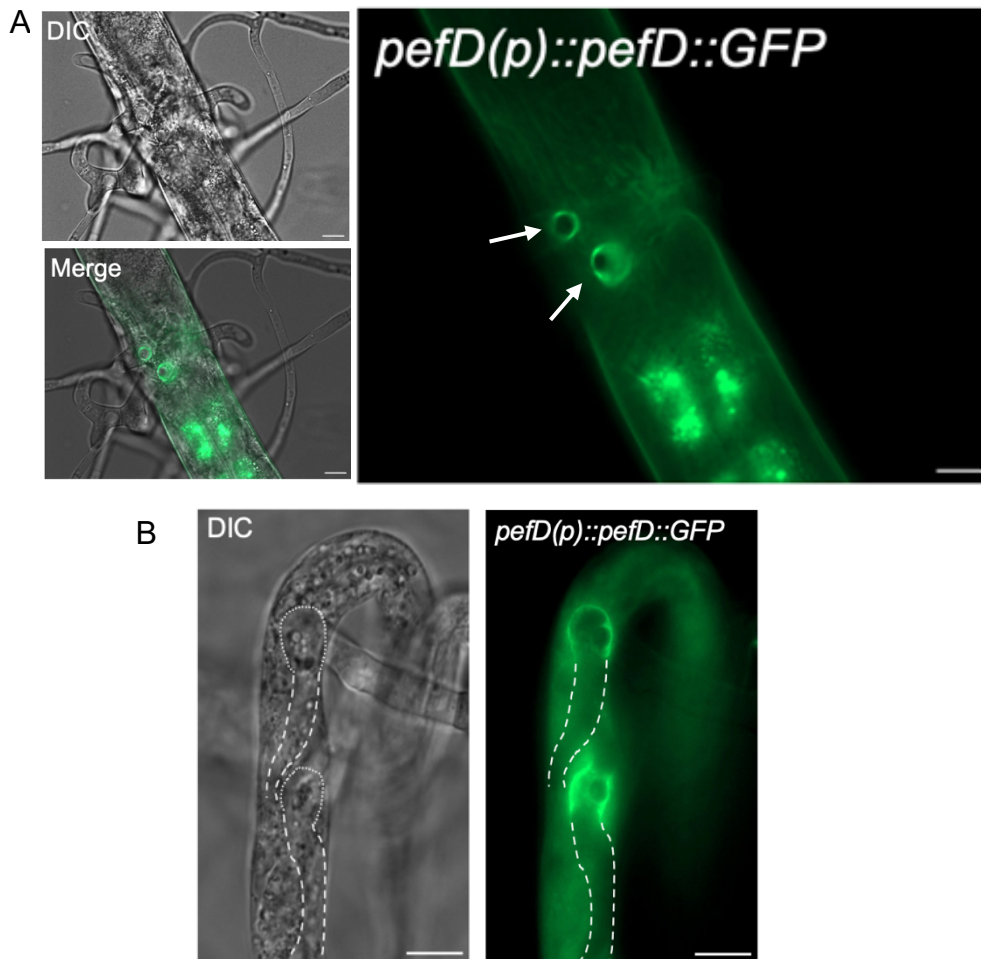
ein *pefD*-mCherry-Fusionskonstrukt unter dem nativen Promotor in *A. flagrans* exprimiert (*pefD(p)::pefD::mCherry* (pXD41), sAK21). Auch unter dem nativen Promotor lokalisiert PefD in vesikelähnlichen Strukturen innerhalb der Fallen (**Abbildung 11**). Um die Rolle des Signalpeptids an dieser Lokalisation zu untersuchen, wurde *pefD* ohne das 28 AS lange Signalpeptid sowie nur das Signalpeptid (AS 1-28) von *pefD* mit GFP fusioniert und unter Kontrolle des konstitutiven *oliC*-Promotors in *A. flagrans* exprimiert (*oliC(p)::pefD $\Delta$ SP::GFP*, pAK68; sAK26) (*oliC(p)::SP<sup>pefD</sup>::GFP*, pAK67; sAK25). Das SP<sup>pefD</sup>-GFP-Fusionskonstrukt lokalisiert wie das Volllängenprotein in vesikelähnlichen Strukturen in den Fallen. In vegetativen Hyphen des induzierten Myzels ist bei dem Stamm mit dem Volllängenprotein und dem, der nur das Signalpeptid von *pefD* exprimiert keine spezifische Lokalisation von PefD erkennbar, sondern höchstens ein schwaches diffuses Fluoreszenzsignal. Die Deletion des Signalpeptids führt zu einer gleichmäßigen Lokalisation von PefD im Zytoplasma des gesamten Myzels (**Abbildung 11**). In vegetativen Hyphen im uninduzierten Zustand ist bei allen drei Fusionskonstrukten keine spezifische Fluoreszenz erkennbar (**Abbildung 11**). Damit wurde gezeigt, dass das Signalpeptid für die Lokalisation von PefD in den vesikelähnlichen Strukturen innerhalb der Fallen notwendig ist.

Um die Rolle von PefD während der Infektion weiter zu untersuchen, wurde die Lokalisation während des Infektionsgeschehens genauer betrachtet. Frühere Untersuchungen mit Fluoreszenzmikroskopie lieferten erste Hinweise auf eine Lokalisation von PefD im Infektionsbulbus und eine Kolo­kalisierung mit dem Effektor CyrA (Hu, 2022). Um diese Beobachtungen weiter zu überprüfen und die Lokalisation genauer zu charakterisieren, wurden die entsprechenden Stämme erneut analysiert.



**Abbildung 11: PefD lokalisiert in Fallen in vesikelähnlichen Strukturen.** Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen verschiedene *PefD*-mCherry oder -GFP Fusionskonstrukte unter

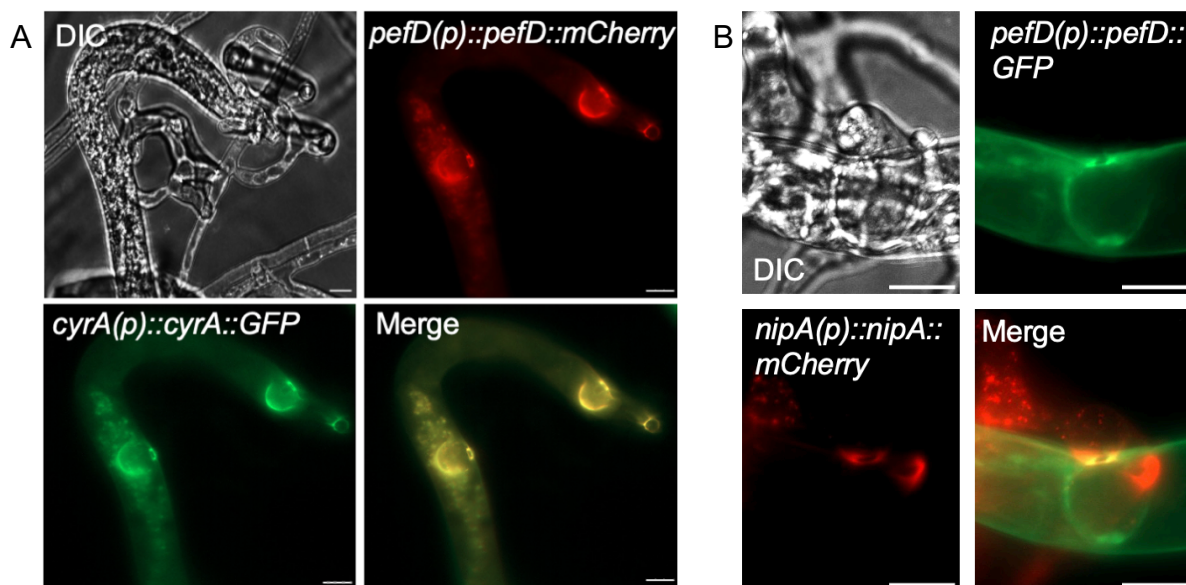
nativem Promotor oder *oliC*-Promotor aus *A. nidulans* in *A. flagrans* exprimiert. PefD mit mCherry fusioniert unter Kontrolle des nativen Promotors lokalisiert nur in den Fallen in vesikelähnlichen Strukturen, in vegetativem Myzel sowohl induziert als auch uninduziert ist kein spezifisches Fluoreszenzmuster erkennbar (links). Wird das Signalpeptid von PefD deletiert, so lokalisiert PefD im Zytoplasma der Fallen und des vegetativen induzierten Myzels, aber nicht im uninduzierten Myzel (rechts). Wenn nur das Signalpeptid von PefD exprimiert, so sind die vesikelähnlichen Strukturen in den Fallen wieder vorhanden, in den vegetativen Hyphen ist keine spezielle Fluoreszenz erkennbar. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 12: PefD lokalisiert im Infektionsbulbus.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Stammes sXD26 (*pefd(p)::pefD::GFP*) im GFP- und DIC-Kanal während der Infektion von *C. elegans*. **[A]** PefD lokalisiert in runden Strukturen innerhalb gefangener Nematoden (durch Pfeile markiert), die den nach der Penetration gebildeten Infektionsbulbi entsprechen. **[B]** Das PefD-GFP Fusionskonstrukt lokalisiert nur im Infektionsbulbus und nicht in trophischen Hyphen (markiert mit gestrichelter Linie). Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ .

Das Fusionsprotein konnte während der Infektion nur in runden Strukturen, dem Infektionsbulbus, in den gefangenen Nematoden lokalisiert werden (**Abbildung 12A**). In trophischen Hyphen innerhalb der gefangenen Nematoden konnte kein PefD-GFP-Fusionsprotein nachgewiesen werden (**Abbildung 12B**).

Zur genaueren Einordnung des zeitlichen und räumlichen Auftretens von PefD während des Infektionsgeschehens wurden Kollokationen mit den bereits bekannten Effektoren CyrA und NipA durchgeführt (Emser *et al.*, 2024; Wernet *et al.*, 2021a). Dafür wurden die Stämme sXD28 (*cyrA(p)::cyrA::GFP*; *pefD(p)::pefD::mCherry*) und sXD30 (*pefD(p)::pefD::GFP*; *nipA(p)::nipA::mCherry*) noch einmal genauer untersucht (Hu, 2022). In einem gefangenen Wurm konnten zwei Infektionsstellen beobachtet werden, an denen sich Infektionsbulbi ausgebildet haben. Sowohl CyrA als auch PefD lokalisieren beide jeweils in diesen runden Infektionsstrukturen, den Infektionsbulbi. PefD und CyrA zeigen eine vollständige Kollokation (**Abbildung 13A**). Die Kollokation mit NipA zeigt eine partielle Überlagerung der Signale an der Infektionsstelle. NipA lokalisiert außerhalb der Penetrationsstelle, an der der Pilz in den Nematoden einwächst. An dieser Stelle zeigt sich die Kollokation mit PefD. PefD ist allerdings im Gegensatz zu NipA auch noch im fortgeschrittenen Stadium der Infektion im Infektionsbulbus sichtbar (**Abbildung 13B**).



**Abbildung 13: PefD zeigt eine Kollokation mit CyrA und eine teilweise Kollokation mit NipA.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Stämme sXD28 (*cyrA(p)::cyrA::GFP*; *pefD(p)::pefD::mCherry*) und sXD30 (*pefD(p)::pefD::GFP*; *nipA(p)::nipA::mCherry*) im GFP-, mCherry- und DIC-Kanal während der Infektion von *C. elegans*. **[A]** Sowohl PefD als auch mCherry lokalisieren beide im Infektionsbulbus von gefangenen Würmern und zeigen in der Überlagerung (Merge) eine komplette Kollokation. **[B]** Während NipA nur außerhalb des Nematoden an der Penetrationsstelle lokalisiert, lokalisiert PefD zusätzlich auch noch im Infektionsbulbus. In der Überlagerung sieht man eine teilweise Kollokation von PefD mit NipA an der Penetrationsstelle. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

## 2.5 Deletion von *pefD* führt zu verringerter Virulenz

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von PefD während der Infektion und den Effekt auf die Virulenz wurde das Gen mittels homologer Rekombination durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt (sXD35). Ebenso wurde ein Überexpressionsstamm von *pefD* (sXD33) erstellt, bei dem eine Extrakopie des *pefD* Gens unter der Kontrolle des konstitutiven *oliC*-Promotors und -Terminators aus *A. nidulans* in den Wildtyp Stamm integriert wurde. Der Deletionsstamm sowie der Überexpressionsstamm konnte weiterhin Nematoden fangen und Fallen bilden wie der Wildtyp (Hu, 2022).

Der Deletionsstamm weist keine Veränderung im vegetativen Wachstum auf und kann sowohl Fallen bilden als auch Nematoden fangen (**Abbildung 14D**).

Beide Stämme wurden mit einer Southern Blot-Analyse auf korrekte, einmalige Integration der Hygromycin-Resistenzkassette beziehungsweise des Überexpressionskonstrukts überprüft. Dafür wurde die genomische DNA des Wildtyps und dieser Stämme extrahiert. Die genomische DNA des Deletionsstammes wurde mit *HindIII* und die des Überexpressionsstammes mit *EcoRV* verdaut. Die genomische DNA des Wildtyps wurde jeweils passend mit dem gleichen Restriktionsenzym als Kontrolle verglichen. Die durch den Restriktionsenzym-Verdau entstandenen DNA-Fragmente wurden mit einer Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran überführt und anschließend mit der passenden Sonde hybridisiert. Für den Deletionsstamm dienten die 1,5 kb *downstream* des *pefD* ORFs als Sonde und für den Überexpressionsstamm diente der OFR von *pefD* als Sonde (**Abbildung 14A**). Mit Hilfe dieser spezifischen Sonden wird zwischen dem Wildtyp-Allel und den veränderten Allelen unterschieden.

Beim Deletionsstamm von *pefD* wurde eine Bande mit einer Größe von 3,2 kb detektiert, was der Größe des durch die Integration der Hygromycin-Resistenzkassette veränderten Allels entspricht. Beim Wildtyp als Kontrolle wurde mit einer Bande von 1,7 kb der intakte ORF von *pefD* nachgewiesen. Das Fehlen der Wildtyp Bande im Deletionsstamm zeigt an, dass eine zielgerichtete Integration der Hygromycin-Resistenzkassette anstelle des ORF von *pefD* stattgefunden hat. Es sind keine Restkopien des Wildtyp Allels mehr übrig, was sich auch in einer PCR widerspiegelt. Bei der Überexpression wurde eine Bande bei 4,5 kb und 2 kb detektiert. Die größere Bande entspricht dem intakten *pefD* Wildtyp Allel und die kleinere 2 kb Bande zeigt an,

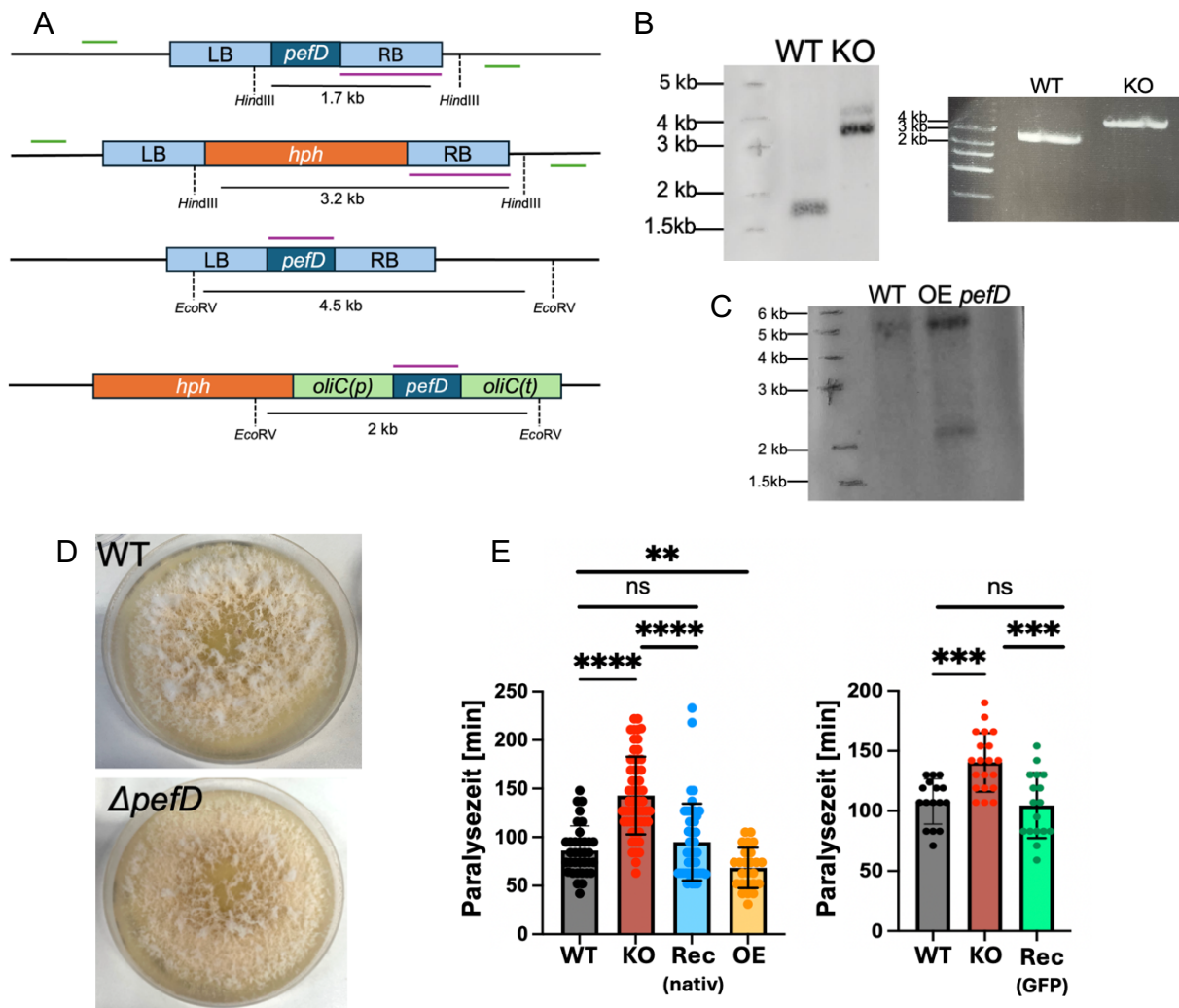
dass das Überexpressionskonstrukt erfolgreich im Stamm integriert ist, sodass eine zusätzliche Kopie des *pefD* Gens vorhanden ist. (**Abbildung 14B/C**).

Da die Lokalisationsstudien darauf hinweisen, dass PefD eine Rolle nach der Penetration von *A. flagrans* in *C. elegans*, also während der mittleren Phase der Infektion, spielt, wurde in einem Virulenzassay die Paralysezeit gemessen. Mit der Paralysezeit wird die Dauer bestimmt bis sich ein frisch gefangener Nematode nicht mehr bewegt, also paralytisch ist. Dabei wird als Startzeitpunkt, der Zeitpunkt gewählt, bei dem der Nematode die Falle berührt und als Endpunkt der Zeitpunkt, bei dem sich der Nematode nicht mehr eigenständig bewegt. Dafür wurden Langzeitaufnahmen von 11 Stunden am *Spinning-disc* Mikroskop durchgeführt, bei der jede 11 Minuten ein Bild der einzelnen Positionen aufgenommen wurde. Um die Paralysezeit zu berechnen wurde der Startzeitpunkt vom Endzeitpunkt abgezogen. Durch andere Nematoden verursachte Bewegungen wurden nicht mit einbezogen. Auch Nematoden, die der Falle nach einer gewissen Zeit wieder entkamen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Getestet wurden der Wildtyp als Kontrolle, der Deletionsstamm, der Überexpressionsstamm und auch zwei Rekomentationsstämme von *pefD*. Der Deletionsstamm von *pefD* wurde einmal mit dem *pefD* Gen unter Kontrolle des nativen Promotors (1,5 kb *upstream* des ORF) und Terminators (1,5 kb *downstream* des ORF) (pXD74) und einmal mit einem *pefD*-GFP-Fusionskonstrukt (pAK65) rekomentiert. Die Transformanten des Rekomentationsstammes mit dem nativen *pefD* Konstrukt wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des *pefD* ORFs getestet. Bei allen getesteten Transformanten konnte der *pefD* ORF nachgewiesen werden. Dieser Stamm wurde sAK18 genannt. Die erfolgreiche Transformation des Deletionsstammes mit pAK65 wurde durch das Vorhandensein des GFP-Signals des PefD-GFP Fusionsproteins bei der Mikroskopie bestätigt. Ein positiver Stamm wurde sAK23 genannt. Die Rekomentation diente zur Wiederherstellung der Proteinfunktion.

Die Auswertung dieser Virulenzassays ergab, dass der *A. flagrans* Wildtyp die Nematoden nach 86 Minuten ( $\pm 35$  SD;  $n = 35$ ) paralytisch, wohingegen der Deletionsstamm von *pefD* mit 141 Minuten ( $\pm 39$  SD;  $n = 59$ ) bis zur Paralyse deutlich länger braucht, um die Nematoden zu paralytischieren. Die Rekomentationsstämme sAK18 und sAK23 zeigen mit 95 Minuten ( $\pm 40$  SD;  $n = 48$ ) (*pefD(p)::pefD::pefD(t)*, sAK18) und 104 Minuten ( $\pm 27$  SD;  $n = 26$ ) (*pefD(p)::pefD::GFP*, sAK23) ähnliche

Werte wie der Wildtyp. Der Überexpressionsstamm ist im Vergleich zu den anderen drei Stämmen mit 69 Minuten ( $\pm 21$  SD;  $n = 25$ ) bis zur Paralyse deutlich schneller (**Abbildung 14E**). Die verzögerte Paralyse des Deletionsstammes von *pefD* und die schnellere Paralyse des Überexpressionsstammes von *pefD* deutet daraufhin, dass PefD an der Paralyse beteiligt sein könnte.



**Abbildung 14: Deletion und Überexpression von *pefD* beeinflussen die Paralysezeit.** [A] Schematische Darstellung der Deletions- und Überexpressionskassette. Für die Deletion (KO) von *pefD* wurde der *pefD*-ORF mittels homologer Rekombination gegen eine Hygromycinresistenzkassette (*hph*) ausgetauscht. Dafür verfügte die Hygromycinresistenzkassette über zwei 1 kb flankierenden Regionen (RB: right border; LB: left border). Für die Überexpression (OE) wurde *pefD* unter die Kontrolle des *oliC*-Promotors gestellt und als Extrakopie in *A. flagrans* exprimiert. Die Sonden für den Southern Blot (lila Striche), die Primer für die Test-PCR der Transformanden (grüne Striche) und die Restriktionsschnittstellen und die daraus resultierende Fragmentgrößen sind angegeben. Verändert nach (Hu, 2022) [B] Verifizierung des *pefD*-Deletionsstammes sXD35 durch Southern Blot (links) und analytische PCR (rechts). Nach dem Verdau des Deletionsstammes mit *HindIII* entsprechen die Bande von 3,2 kb bei der Deletion und die 1,7 kb Bande beim Wildtyp den Erwartungen. Auch die Banden der

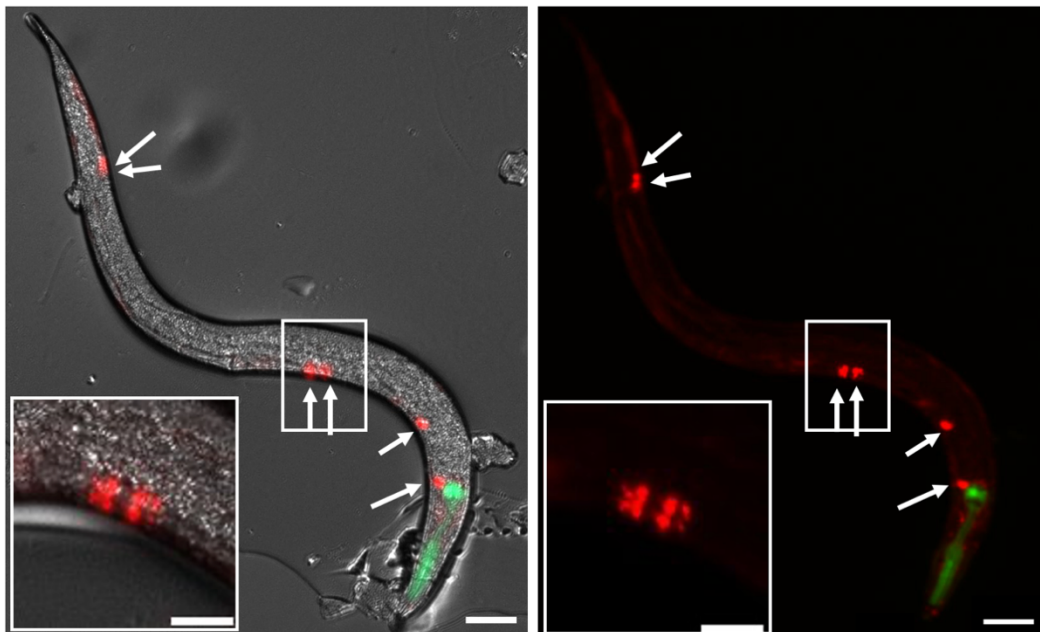
analytischen PCR mit 2 kb für den Wildtyp und 4,5 kb bei der Deletion entsprechen den Erwartungen. **[C]** Nachweis der *pefD* Überexpression mittels Southern Blot. Nach dem Verdau des Überexpressionsstammes sXD33 mit *EcoRV* zeigt zusätzliche Bande bei 1,7 kb die Extrakopie von *pefD* im Genom von *A. flagrans* an. **[D]** Der Wildtyp und die Deletionsmutante wurden für 7 Tage auf PDA-Platten bei 28 °C inkubiert. Der Deletionsstamm von *pefD* sXD35 zeigt keinen veränderten Wachstumsphänotyp als der Wildtyp an. **[E]** Quantifizierung der Paralysezeit gefangener Nematoden. Dargestellt sind Wildtyp, Deletionsstamm, Überexpressionsstamm und die zwei Rekombinationsstämme (nativer Promotor; GFP-Fusion). Punkte repräsentieren Einzelwerte (WT  $n = 35$ ; KO  $n = 59$ ; OE  $n = 25$ ; Rec (nativ)  $n = 48$ ; Rec (GFP)  $n = 26$ ), Balken zeigen Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mittels T-Test bestimmt. ( $p \leq 0,0001$ ; \*\*\*\*,  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*,  $p > 0,05$ ; ns).

## 2.6 Heterolog exprimiertes PefD in *C. elegans* akkumuliert in den Coelomocyten

Die heterologe Expression von pilzlichen Genen im Wirt *C. elegans* kann hilfreich sein, die Funktion des Proteins aufzuklären und mögliche Ziele des Proteins im Wirt zu finden. *pefD* wurde unter Kontrolle verschiedener für *C. elegans* spezifischer Promotoren im Wildtyp Stamm N2 exprimiert. Die Expressionsvektoren wurden über Mikroinjektion in *C. elegans* eingebracht und als extrachromosomales Array exprimiert. Als Marker für erfolgreiche Injektionen wurde ein Markerplasmid mitinjiziert, das zu einer Expression eines Fluorophors im Pharynx führt. Diese Expression wird durch den Promotor des *myo-2* Gens kontrolliert (*myo-2(p)::GFP* oder *myo-2(p)::tdTomato*). Für die heterologe Expression wurde *pefD* sowohl mit als auch ohne Signalpeptid aus cDNA amplifiziert. Da das Zielgewebe des Proteins unbekannt ist und die Expression in *C. elegans* gewebe- und stadien-spezifisch ist, wurden verschiedene Promotoren getestet. Diese Stämme wurden auf einen sichtbaren Phänotyp und das Expressionsmuster hin untersucht.

Da nicht bekannt ist, welches Gewebe oder welche Zellen PefD als Ziel in den Nematoden hat, wurde zunächst der ubiquitäre Promotor des Elongationsfaktors 1-Alpha (*eft-3*) getestet. Unter diesem Promotor wurde *pefD* mit und ohne Signalpeptid und mit dem Fluorophor mScarlet im Wildtyp N2 exprimiert (*eft-3(p)::pefD::mScarlet*; *ceAK16* und *eft-3(p)::pefD $\Delta$ SP::mScarlet*; *ceAK28*). Positive Transformanden konnten anhand der GFP-Fluoreszenz im Pharynx (*myo-2::GFP*) selektiert werden. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden von synchronisierten Nematoden im L4 Stadium gemacht. Dabei wurden die Nematoden mit 20 mM Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )

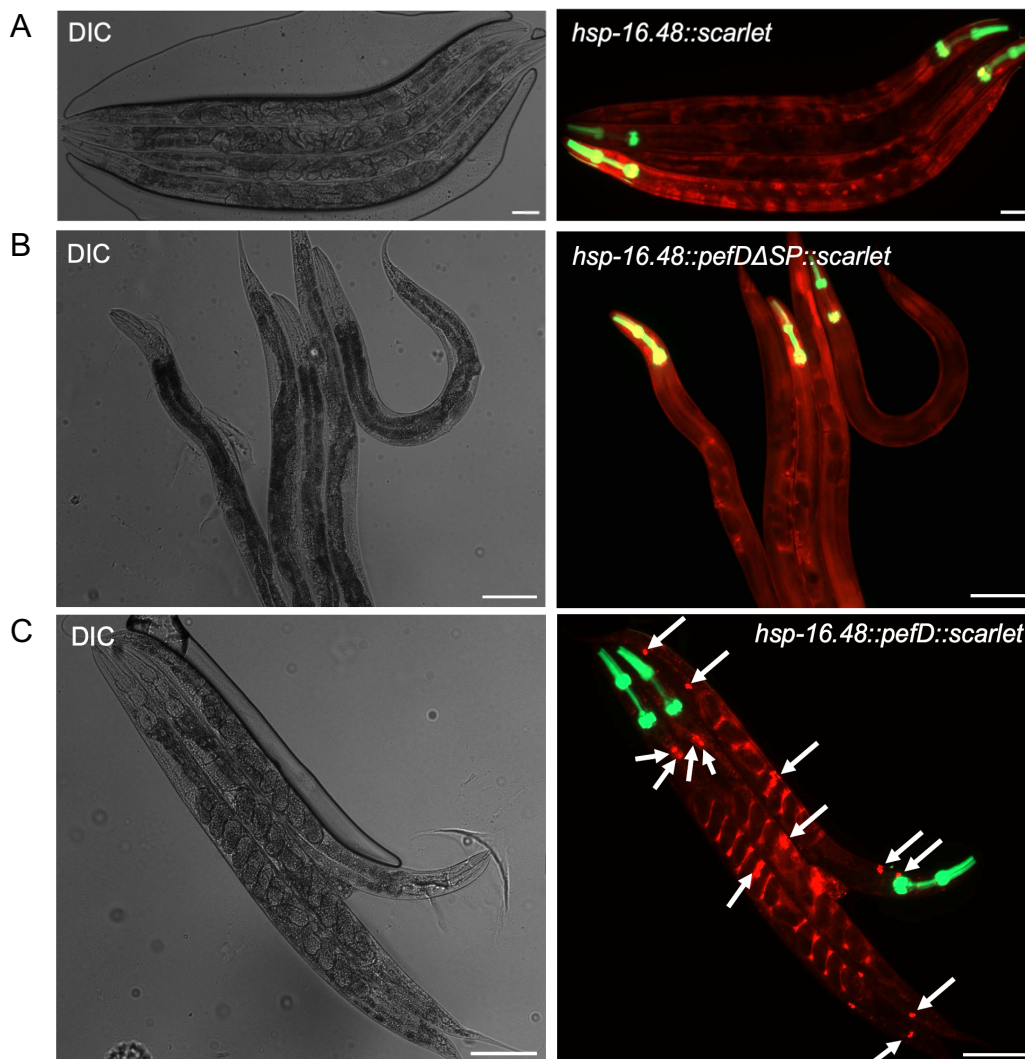
bewegungsunfähig gemacht. Das PefD-mScarlet-Signal zeigt sich hauptsächlich in den Coelomocyten, welches spezialisierte Aufnahmezellen in *C. elegans* sind (**Abbildung 15**). Ein veränderter Phänotyp konnte nicht beobachtet werden. Nematoden, die PefD $\Delta$ SP-mScarlet exprimierten, zeigten unterschiedliche Lokalisierungsmuster zwischen den einzelnen Linien. Da dadurch die Expression von PefD $\Delta$ SP nicht vorhersagbar ist, wurden diese Linien nicht weiterverwendet.



**Abbildung 15: PefD unter Kontrolle des *eft-3* Promotors lokalisiert in Coelomocyten.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der *C. elegans* Linie ceAK16 (*eft-3(p)::pefD::mScarlet*). Unter dem konstitutiven *eft-3* Promotor wird PefD in den sechs Coelomocyten (weiße Pfeile), spezialisierte Aufnahmezellen in *C. elegans*, nachgewiesen. Das Quadrat zeigt eine Vergrößerung bei den ventral gelegenen Coelomocyten. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m; Vergrößerung: 20  $\mu$ m.

Ein weiterer Promotor, unter welchem *pefD* exprimiert wurde, war der *heat shock*-Promotor, *hsp-16.48*. Dieser Promotor hat den Vorteil, dass er induzierbar ist und man somit die Expression der Gene steuern kann. Die Würmer können sich vollständig entwickeln und der Promotor und damit die Genexpression können dann im gewünschten Stadium durch eine einstündige Inkubation bei 37 °C aktiviert werden. Es wurden zwei Konstrukte erstellt: einmal wurde *pefD* mit seinem Signalpeptid und einmal ohne Signalpeptid mit mScarlet fusioniert und im Wildtyp N2 exprimiert (*hsp-16.48::pefD::mScarlet* (pAK60); CeAK25 und *hsp-16.48::pefD $\Delta$ SP::mScarlet* (pAK57); CeAK26). Auch hier konnten die positiven Transformanten anhand des fluoreszierenden Pharynx selektiert werden (*myo-2(p)::GFP*). Als Kontrolle wurde der KIT03 Stamm verwendet, welcher nur mScarlet unter dem *hsp-16.48* Promotor exprimiert (Wernet *et al.*, 2021a). Für die Mikroskopie wurden synchronisierte L4

Larven für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um den Promotor zu aktivieren. Anschließend wurden sie für 24 Stunden bei 20 °C regeneriert und dann auf einem 3 % Agarpad mit 20 mM NaN<sub>3</sub> mikroskopiert. PefD mit Signalpeptid akkumulierte in den Coelomocyten und um die Eier herum. Dahingegen sah die Lokalisierung von PefD ohne das Signalpeptid dem Signal der Kontrolle von KIT03 sehr ähnlich. Die Kontrolle wie auch der PefD $\Delta$ SP-mScarlet exprimierende Stamm weisen eine sehr gleichmäßige Verteilung des Fluoreszenzsignals auf. Die mScarlet Fluoreszenz ist in der Hypodermis, der Muskulatur, dem Nervensystem und dem Darm zu detektieren (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Heterologe Expression von PefD-mScarlet unter dem Promotor hsp-16.48.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *C. elegans*-Linien. **[A]** Gleichmäßige Verteilung des mScarlet-Signals in Nematoden der Kontrolllinie KIT03 (*hsp::16.48::mScarlet*) verteilt. **[B]** Das Fluoreszenzsignal von PefD $\Delta$ SP-mScarlet in Nematoden des Stammes ceAK25 (*hsp-16.48::pefD $\Delta$ SP::mScarlet*) entspricht dem der Kontrolle. **[C]** PefD mit Signalpeptid lokalisiert im Stamm ceAK26 (*hsp-16.48::pefD::mScarlet*) in den Coelomocyten (weiße Pfeile) und auch um die Eier herum. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

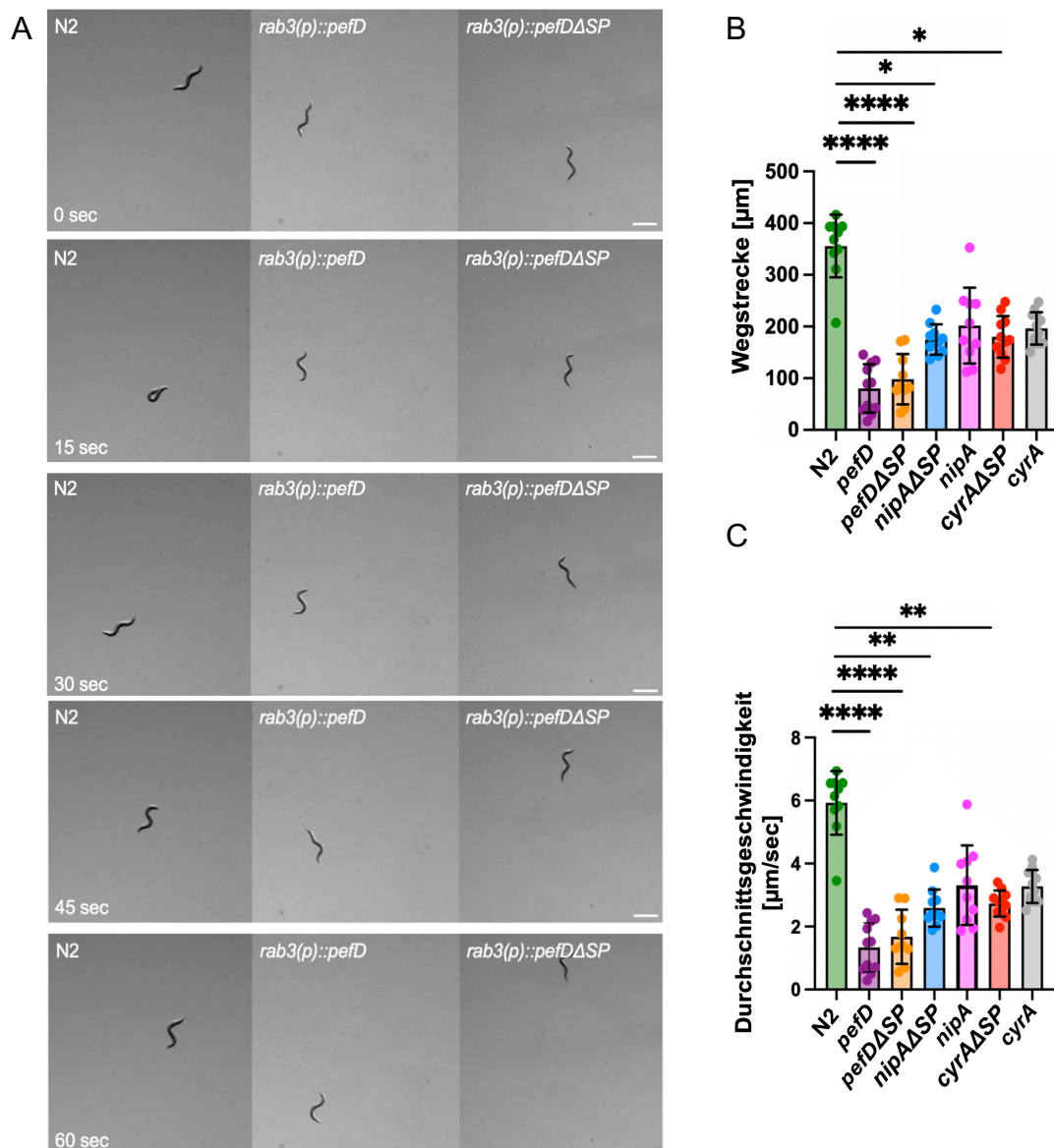
## 2.7 Neuronal exprimiertes *pefD* führt zu verlangsamter Bewegung und allgemein höherer Aktivität des RIS-Neurons in *C. elegans*

Da der Effekt von PefD während der Infektion lokal sehr stark eingegrenzt sein könnte, kann es schwer sein, den direkten Effekt auf *C. elegans* zu sehen. Heterologe Expression von *pefD* in *C. elegans* ist eine Methode die Effekte des Virulenzfaktors zu verstärken. Anhand des Virulenzassays konnte PefD eine eventuelle Rolle bei der Paralyse von gefangenen *C. elegans* zugeteilt werden. In *A. oligospora* wurde vor Kurzem herausgefunden, dass bei einem gefangenen *C. elegans* die Aktivität des RIS-Neurons ansteigt und 20 Minuten, nachdem der Nematode gefangen wurde, ihren Höhepunkt erreicht und ab da an eine konstant hohe Aktivität zeigt. Dadurch wird auch das Bewegungsverhalten verlangsamt. Dieses Ergebnis passt mit der Paralyse des Nematoden bei der Infektion zusammen, da der Nematode 20 Minuten nach dem Fangen deutlich weniger in der Falle zappelt (Lin *et al.*, 2024). Der genaue Mechanismus der Aktivierung des RIS-Neurons ist noch nicht bekannt.

Für PefD wurde die Hypothese aufgestellt, dass es ebenfalls eine positive Rolle bei der Aktivierung des RIS-Neurons haben könnte, da es, wie im Virulenzassay gesehen, zur erfolgreichen Paralyse beiträgt. Um diese Hypothese zu belegen, wurde zuerst das Bewegungsverhalten der Stämme beobachtet, die *pefD* sowohl mit als auch ohne Signalpeptid unter dem panneuronalen *rab-3*-Promotor (*ras-related protein rab-3*) als extrachromosomale Arrays exprimieren. Dieser Promotor resultiert in einer Expression von *pefD* in allen Neuronen. Das *rab-3(p)::pefD* Konstrukt (pAK62) und das *rab-3(p)::pefD $\Delta$ SP* Konstrukt (pAK63) wurden jeweils mit dem Markerplasmid *myo-2(p)::td-Tomato* in den Wildtyp N2 injiziert, es entstanden die Stämme ceAK17 (*pefD*) und ceAK18 (*pefD $\Delta$ SP*).

Werden einzelne Würmer dieser zwei Linien beobachtet, fiel auf, dass sie sich langsamer bewegen als der Wildtyp N2. Um diese Beobachtung zu verifizieren und zu quantifizieren, wurden einminütige Videos einzelner Würmer der Stämme N2, ceAK17 und ceAK18 aufgenommen. Dabei wurde jede Sekunde ein Bild aufgenommen. Mit ImageJ wurden die Bewegungen der Würmer manuell verfolgt und die durchschnittliche Geschwindigkeit und zurückgelegte Gesamtdistanz gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Nematoden, welche *pefD* oder *pefD $\Delta$ SP* in den Neuronen exprimieren, wesentlich langsamer waren und auch weniger Strecke in einer Minute zurücklegten als der Wildtyp N2 (**Abbildung 17A**). Als weitere Kontrollen wurden die schon charakterisierten Virulenzfaktoren *nipA* und *cyrA* unter dem *rab-3*-Promotor

exprimiert. Sowohl *nipA* als auch *cyrA* wurden sowohl mit Signalpeptid (*rab-3(p)::nipA*, pAK78; *rab-3(p)::cyrA*, pAK80) als auch ohne Signalpeptid (*rab-3(p)::nipAΔSP* pAK77; *rab-3(p)::cyrAΔSP*, pAK79) zusammen mit dem Plasmid pPS01 als extrachromosomale Arrays in N2 Wildtyp injiziert. Auch diese vier Linien wurden hinsichtlich ihres Bewegungsverhaltens analysiert. Jedoch zeigte sich hier bei der durchschnittlichen Geschwindigkeit und bei der zurückgelegten Wegstrecke nur ein kleiner signifikanter Unterschied bei den Linien die *nipA* und *cyrA* ohne Signalpeptid exprimieren im Vergleich zu N2 (**Abbildung 17B/C**).



**Abbildung 17: Neuronales exprimiertes *pefD* führt zu verlangsamerter Bewegung in *C. elegans*.** **[A]** Repräsentative Einzelbilder einer Bewegungsanalyse von *C. elegans* Linien N2, ceAK17 (*rab-3(p)::pefD*) und ceAK18 (*rab-3(p)::pefDΔSP*). **[B]** Zurückgelegte Wegstrecke der Nematoden innerhalb einer Minute. Nematoden, welche *pefD* oder *pefDΔSP* neuronal exprimieren, legen im Vergleich zum Wildtyp N2 geringere Distanzen zurück. **[C]** Durchschnittsgeschwindigkeit der Nematoden. Linien mit;

neuronaler *pefD*- oder *pefD* $\Delta$ *SP*-Expression zeigen eine reduzierte Geschwindigkeit im Vergleich zu N2. Alle Gene wurden unter Kontrolle des *rab-3*-Promotors exprimiert. Punkte repräsentieren Einzeltiere (N2 *n* = 10, *pefD* *n* = 11, *pefD* $\Delta$ *SP* *n* = 9, *nipA* $\Delta$ *SP* *n* = 10, *nipA* *n* = 10, *cyrA* $\Delta$ *SP* *n* = 11, *cyrA* *n* = 12) Balken zeigen Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test und dem Dunns Post-hoc Test bestimmt. ( $p \leq 0,0001$ ; \*\*\*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*,  $p \leq 0,05$ ; \*,  $p > 0,05$ ; ns (nicht angegeben). Maßstabsbalken 100  $\mu$ m).

Durch die Beobachtung der verlangsamten Bewegung in den *pefD* und *pefD* $\Delta$ *SP* exprimierenden Stämmen veranlasst, sollte daraufhin die Aktivität des RIS-Neurons in diesen Stämmen untersucht werden. Um die Aktivität des RIS-Neurons messen zu können, wurde in die Stämme ceAK17 und ceAK18 der Vektor pPS01 injiziert (ceAK30 und ceAK31). Dieser Vektor enthält den Calciummarker GcAMP6 unter der Kontrolle des *flp-11*-Promotors, welcher die Expression im RIS-Neuron ermöglicht (Steudel, 2022). GcAMP6 bindet Calciumionen ( $Ca^{2+}$ ), die zur Aktivierung der Neuronen benötigt werden, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und damit einhergehend grünes Licht emittiert wird. Als Kontrolle wurde ein Stamm benutzt, der nur GCaMP6 unter der Kontrolle des *flp-11* Promotors exprimiert (sPS01) (Steudel, 2022).

Als erstes wurde die Struktur des RIS-Neurons zwischen den beiden *pefD* exprimierenden Stämmen und dem Kontrollstamm verglichen. Das RIS-Neuron wies keine phänotypischen Veränderungen auf. Als zweites wurde die Aktivität des RIS-Neurons in diesen drei Stämmen gemessen. Die Fluoreszenzintensität des Zellkörpers des RIS-Neurons wurde mit ImageJ gemessen. Diese Werte wurde gegen die Grundlinie normalisiert. Die Grundlinie ist hierbei der Mittelwert aus den Fluoreszenzwerten der ersten Minute. Es wurde beobachtet, dass die Gesamtaktivität des RIS-Neurons in den beiden Stämmen, welche *pefD* mit und ohne Signalpeptid exprimieren, im Vergleich zur Kontrolle sPS01, in welcher nur das RIS-Neuron mit GCaMP markiert ist, erhöht ist (**Abbildung 18A/B**). Da die Stämme, welche *nipA* und *cyrA* ohne Signalpeptid exprimieren, in der Bewegungsanalyse eine verminderte Geschwindigkeit und Wegstrecke zeigten, wurde die RIS-Aktivität ebenfalls in diesen Stämmen gemessen. In allen vier Kontrollstämmen konnte jedoch keine Erhöhung der Gesamtaktivität im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (**Abbildung 18**).

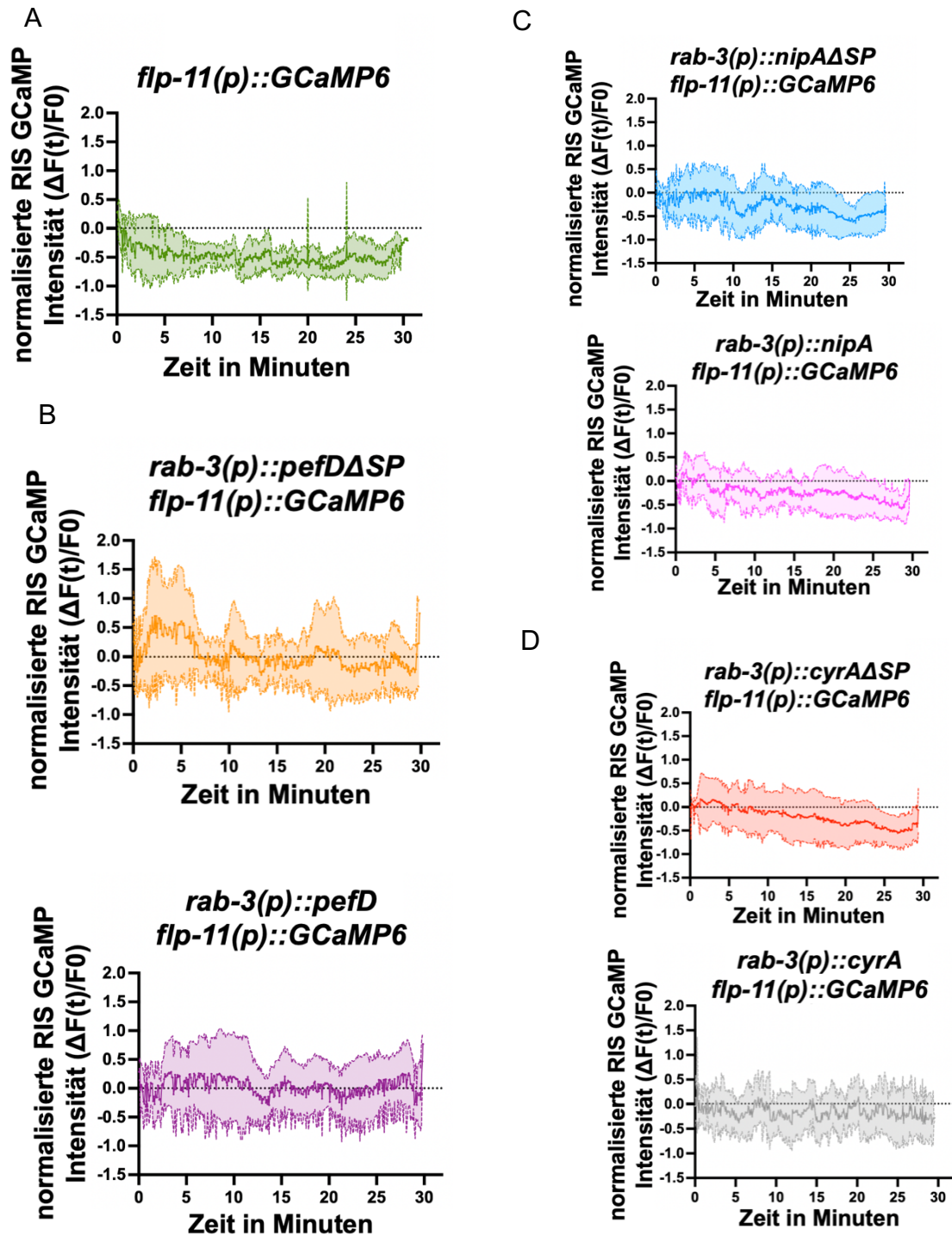
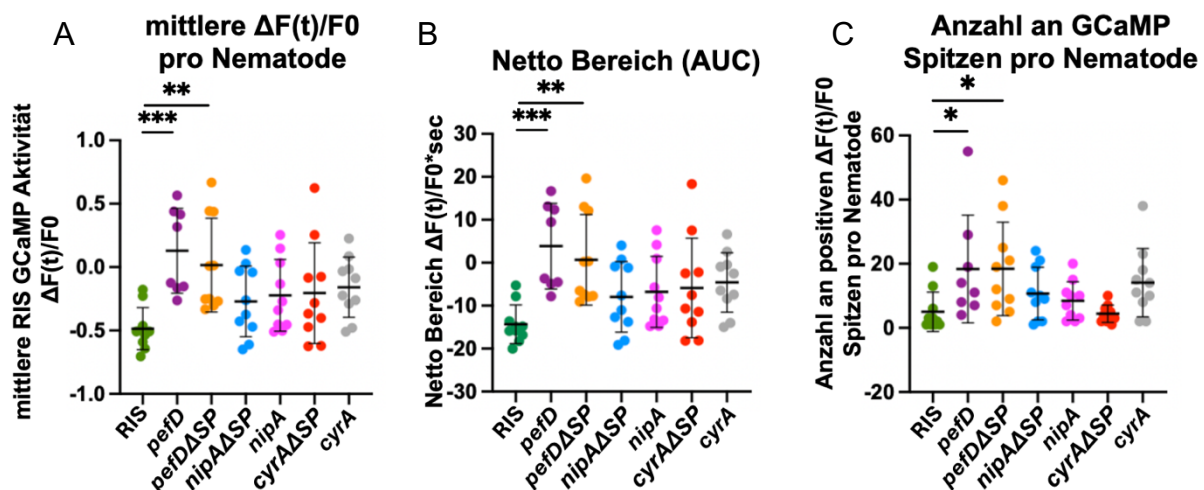


Abbildung 18: Mittlere Gesamtaktivität des RIS-Neurons basierend auf der GCaMP Fluoreszenzintensität. [A] Die Kontrolllinie *sps01(flp-11(p)::GCaMP6)* weist die niedrigste gemessene Aktivität des RIS-Neurons auf. [B] Linien mit panneuronaler Expression von *pefD* und *pefD $\Delta$ SP* zeigen eine erhöhte Gesamtaktivität des RIS-Neurons. [C]-[D] Weitere Kontrolllinien mit heterologer Expression anderer Effektoren. Sowohl *nipA* als auch *cyrA* jeweils mit und ohne Signalpeptid unter Kontrolle des *rab-3*-Promotors, weisen keine erhöhte RIS-Gesamtaktivität auf. Die dicken Linien stellen den Mittelwert aller gemessener Nematoden dar, die transparente Fläche zeigt die Streuung zwischen einzelnen Würmern. Die gestrichelte Linie markiert die Null-Referenzlinie.

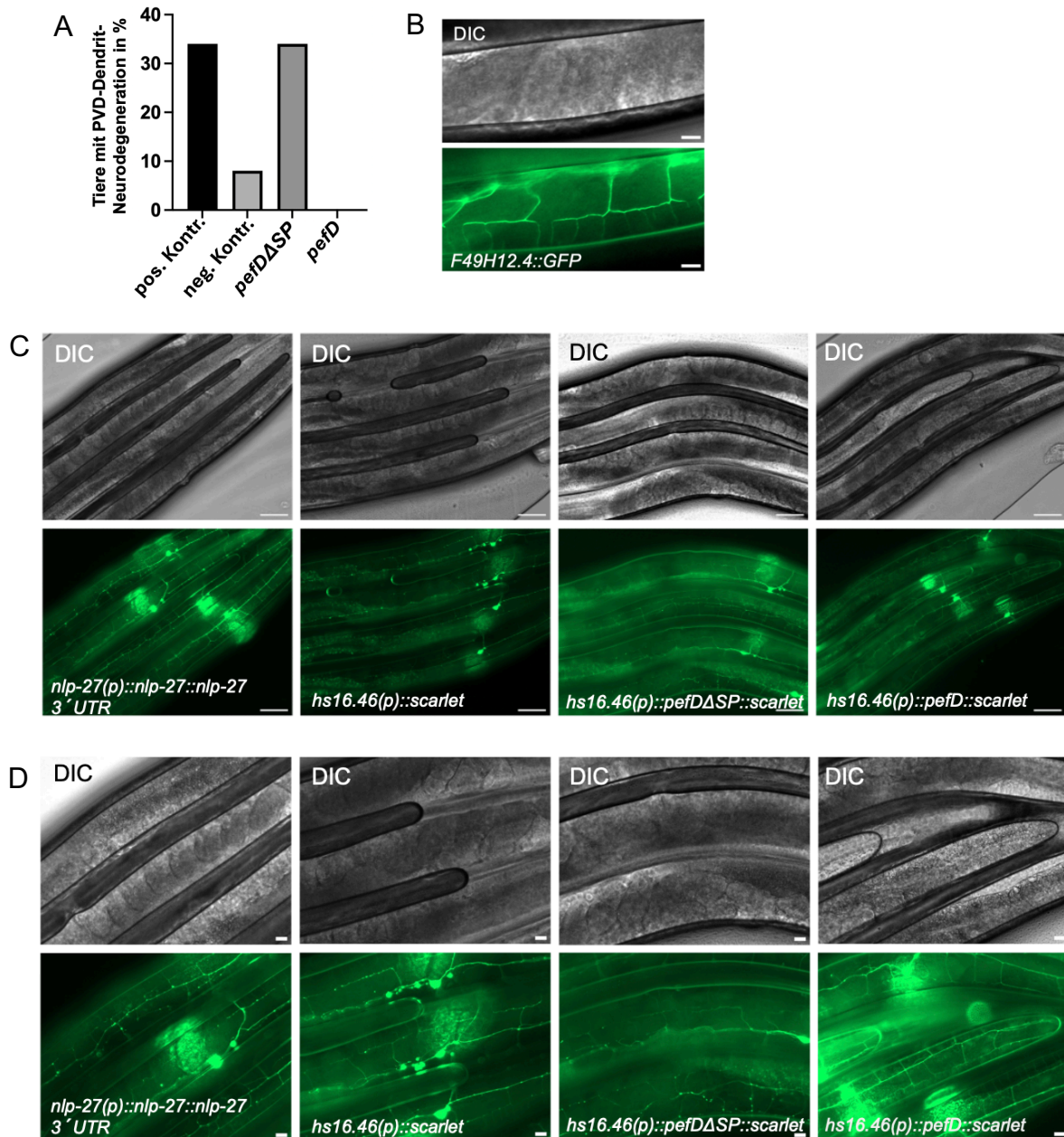
Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurden statistische Tests durchgeführt und dabei die durchschnittliche GCaMP Fluoreszenz, die Nettoaktivität und die Anzahl an positiven Spitzen von allen getesteten Würmern in allen sieben Linien betrachtet. Die durchschnittliche GCaMP Fluoreszenz war in *pefD* exprimierenden Nematoden ( $0,13 \pm 0,3$  SD;  $n = 8$ ) sowie bei *pefD* $\Delta$ SP exprimierenden Nematoden ( $0,02 \pm 0,4$  SD;  $n = 10$ ) höher als in der Kontrolllinie sPS01 ( $-0,5 \pm 0,17$  SD;  $n = 10$ ), in der nur das RIS-Neuron markiert ist. Auch die Werte der Nettoaktivität der *pefD*-exprimierenden Würmer mit  $3,9 \pm 10$  SD;  $n = 8$ ) und die der *pefD* $\Delta$ SP exprimierenden Würmer mit  $0,67 \pm 10$  SD;  $n = 10$ ) sind höher als die der Kontrolle sPS01 mit  $-14,33 \pm 4,5$  SD;  $n = 10$ ). Die Anzahl der positiven Spitzen zeigt dasselbe Ergebnis; auch hier weisen die *pefD* exprimierenden Nematoden mit  $18 \pm 16$  SD;  $n = 8$ ) und die *pefD* $\Delta$ SP exprimierenden Nematoden mit  $18 \pm 14$  SD;  $n = 10$ ) mehr positive Spitzen auf als die Kontrolle sPS01 mit  $5 \pm 6$  SD;  $n = 10$ ). Die anderen vier Kontrollen, welche *cyrA* oder *nipA* mit und ohne Signalpeptid exprimieren, zeigen dabei keinen signifikanten Unterschied in den getesteten Werten im Vergleich zur Kontrolle sPS01. Alle getesteten Werte bestätigen die Beobachtung, dass nur die *C. elegans* Stämme, welche *pefD* mit oder ohne Signalpeptid exprimieren, einen Anstieg der Gesamtaktivität des RIS-Neurons auslösen (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19: Neuronale Expression von *pefD* führt zu erhöhter Aktivität des RIS-Neurons in *C. elegans*.** Quantifizierung der RIS-Neuronenaktivität mit drei Werten: **[A]** Mittlerer  $\Delta F/F_0$ -GCaMP-Fluoreszenzintensität pro Nematode, **[B]** Nettoaktivität des RIS-Neurons dargestellt als Fläche unter der Kurve (AUC area under the curve) und **[C]** der Anzahl positiver GCaMP-Spitzen pro Nematode. Nematoden, die *pefD* oder *pefD* $\Delta$ SP panneuronale unter der Kontrolle des *rab-3*-Promotors exprimieren, zeigen im Vergleich zur Kontrolllinie sPS01 (*flp11::GCaMP*; RIS) eine erhöhte Aktivität des RIS-Neurons. Die Linien mit neuronaler Expression von *cyrA* und *nipA* mit und ohne Signalpeptid weisen

keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle auf. Einzelne Punkte repräsentieren einzelne Nematoden. Balken zeigen Mittelwert  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Post-hoc-Test bestimmt ( $p \leq 0,005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*,  $p \leq 0,05$ ; \*,  $p > 0,05$ ; ns (in der Graphik sind nicht signifikante Vergleiche nicht dargestellt).

Um zu überprüfen, ob die veränderte RIS-Neuronen Aktivität spezifisch durch *pefD* verursacht wird und nicht auf die heterologe Expression zurückzuführen ist, wurde ein weiteres Neuron untersucht. Dazu wurden die Plasmide pAK57 (*hsp-16.48::pefD $\Delta$ SP::mScarlet*) und pAK60 (*hsp-16.48::pefD::mScarlet*) jeweils in den Stamm NC1686 zusammen mit dem Markerplasmid *myo-2(p)::GFP* injiziert (ceAK32 (pAK60); ceAK33 (pAK57)). Im Stamm NC1686 ist das PVD-Neuron mit GFP markiert. Als Negativkontrolle wurde noch das Plasmid pNH59 (*hsp-16.48::mScarlet*) (Wernet *et al.*, 2021a) in den Stamm NC1686 injiziert (ceAK34). Die Positivkontrolle exprimiert *nlp-27* im Stamm NC1686 (cMM04) (Pop *et al.*, 2024). In diesen Linien wurden das PVD-Neuron auf Dendritdegeneration hin untersucht. Dabei wurde die PVD-Dendrit-Neurodegeneration als kugelähnliche Strukturen entlang des Neurons charakterisiert. Zu Nematoden mit Neurodegeneration in den Dendriten wurden Nematoden gezählt, die 10 oder mehr dieser kugelähnlichen Strukturen in fünf oder mehr Menorachs, den Verzweigungen des PVD-Neurons aufweisen (**Abbildung 20B**). Die Würmer wurden synchronisiert und im L4 Stadium zur Induktion der *pefD* Expression eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Nematoden auf 3 % Agarpads mit  $\text{NaN}_3$  ruhiggestellt, mikroskopiert. Mit dieser Charakterisierung zeigten 34 % (4/12) der getesteten Würmer der Positivkontrolle Neurodegeneration. Bei der Negativkontrolle wiesen lediglich 8 % (1/12) der Würmer Neurodegeneration auf. Bei Betrachtung der zwei *pefD*-exprimierenden Stämme zeigt der Stamm der *pefD $\Delta$ SP* exprimiert mit 34 % eine mit der Positivkontrolle vergleichbare Neurodegeneration an, während der Stamm welcher *pefD* exprimiert keinerlei Neurodegeneration aufweist (**Abbildung 20A/C**).

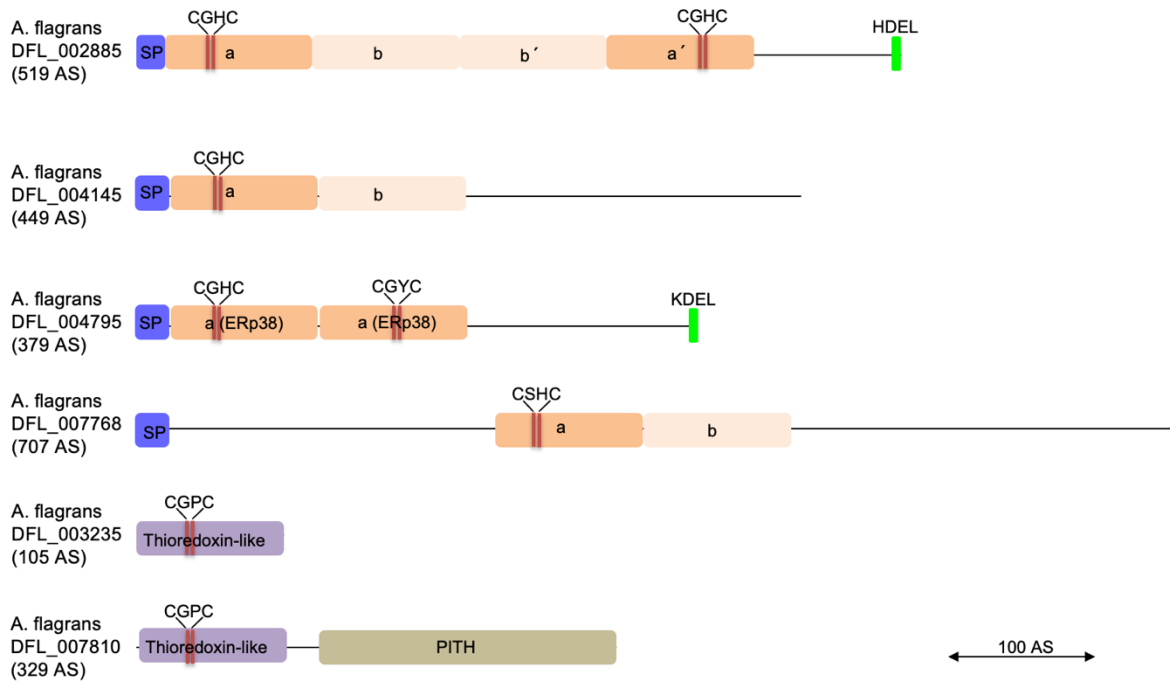


**Abbildung 20: Untersuchung der PVD-Neuronenmorphologie nach heterologer Expression von *pefD*.** **[A]** Quantifizierung der PVD-Dendritdegeneration in den Linien Positivkontrolle (*nlp-27(p)::nlp-27::nlp-27 3' UTR*, *cMM04*), Negativkontrolle (*hsp-16.48::scarlet*, *ceAK34*), *ceAK32* (*hsp-16.48::pefD::mScarlet*) und *ceAK33* (*hsp16.48::pefDΔSP::mScarlet*). Dargestellt ist der Anteil an Nematoden mit Dendritdegeneration. **[B]** Repräsentative Fluoreszenzaufnahme des PVD-Neurons im Stamm NC1686, indem das Neuron mit GFP markiert ist, ohne Neurodegeneration. **[C]** Repräsentative Aufnahme von Nematoden der getesteten Linien. Die PVD-Dendritneurodegeneration wurde anhand der kugelähnlichen Strukturen entlang der Dendriten charakterisiert. **[D]** Vergrößerungen der in C gezeigten Würmer. Maßstabsbalken 10  $\mu$ m.

## 2.8 Proteindisulfid-Isomerasen in *A. flagrans*

Die Proteindisulfid-Isomerase wurde in filamentösen Pilzen zuerst in *S. cerevisiae* charakterisiert. Auch in pflanzenpathogenen Pilzen wie *M. oryzae* oder *U. maydis* wurden Proteindisulfid-Isomerasen charakterisiert. In NFP wurde bisher noch keine Proteindisulfid-Isomerase beschrieben. Somit wurde mittels einer BLAST-Suche in *A. flagrans* nach PDI-Homologen gesucht. Als Referenz diente PDI1 aus *S. cerevisiae*. Dadurch wurden in *A. flagrans* sechs Homologe DFL\_002885, DFL\_004145, DFL\_004795, DFL\_007768, DFL\_003235 und DFL\_007810 identifiziert. Wobei DFL\_002885 mit einem E-Wert von  $6 \times 10^{-110}$  das Protein mit der höchsten Ähnlichkeit ist.

Die Domänen der Proteine wurden mit InterPro identifiziert und sind in Abbildung 21 dargestellt. DFL\_002885 kodiert ein 519 AS langes Protein mit einer klassischen Domänenstruktur einer PDI mit einem N-terminalen Signalpeptid (AS1-19) und einer Domänenorganisation a-b-b'-a'. Zudem besitzt es ein CGHC-Motiv in der a und a' Domäne und ein ER-Retentionssignal (HDEL) am C-Terminus. DFL\_004145 stellt eine verkürzte Version dar, welche für ein 449 AS langes Protein kodiert. Es besitzt ein N-terminales Signalpeptid und nur eine a Domäne mit einem konservierten CGHC-Motiv und einer nachfolgenden b Domäne, jedoch kein ER-Retentionssignal. DFL\_004795 kodiert ein 379 AS langes Protein und weist eine ERp38-ähnliche Struktur auf. Es besitzt zwei a Domänen, wobei in einer ein CGHC und in der anderen ein CGYC-Motiv liegt. Zudem besitzt es auch ein C-Terminales ER-Retentionssignal KDEL. DFL\_007768 kodiert das längste Protein mit 707 AS. Es besitzt nur ein CSHC-Motiv in einer a Domäne mit einer nachfolgenden b Domäne und kein ER-Retentionssignal. Zusätzlich wurden zwei kleinere Proteine (DFL\_003235 und DFL\_007810) gefunden, welche zu den Thioredoxin-ähnlichen Proteinen gehören und beide jeweils ein CGPC-Motiv besitzen und keine klassische PDI-Domänenstruktur aufweisen.

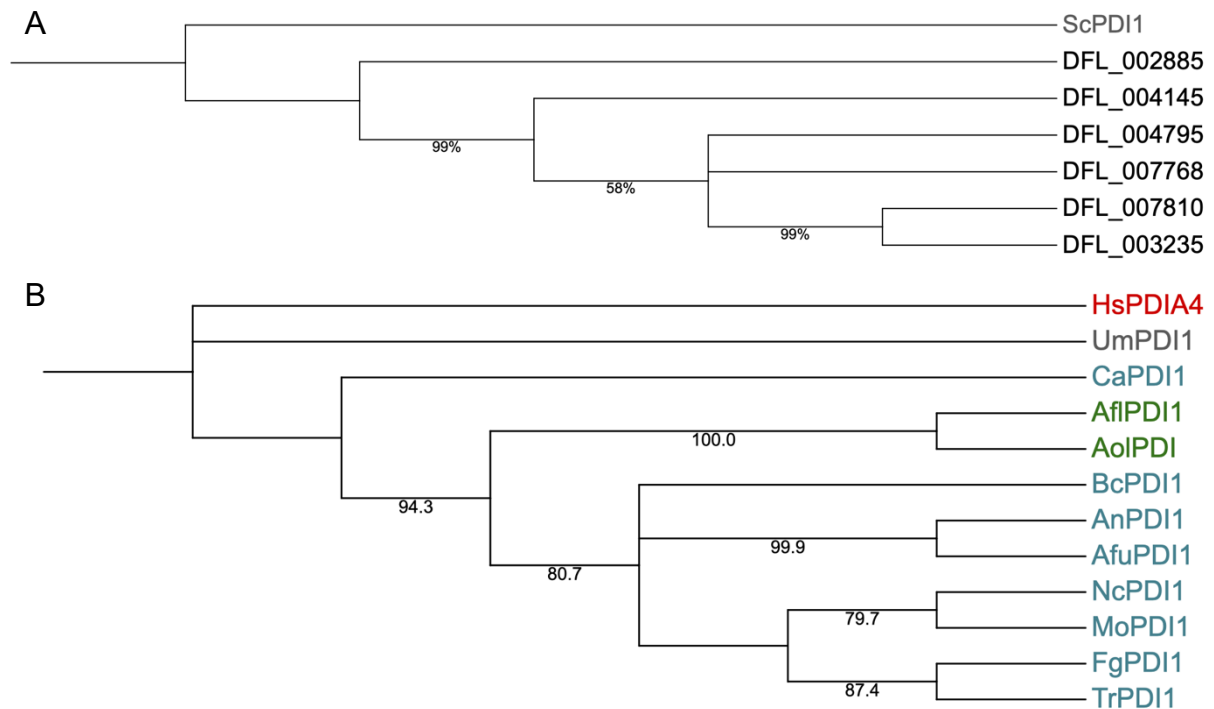


**Abbildung 21: Schematische Darstellung der Domänen der PDI-Homologen von *A. flagrans*.**

Gezeigt sind das N-terminale Signalpeptid (SP), die Thioredoxin-ähnlichen a und b Domänen, sowie die konservierten aktiven Cysteinmotive (CGHC, CGYC, CSHC, CGPC). DFL\_002885 weist die klassische PDI-Domänenorganisation a-b-b'-a' mit jeweils einem CGHC-Motiv in den katalytisch aktiven Domänen a und a' auf. Zudem besitzt es ein ER-Retentionssignal (HDEL) am C-Terminus. DFL\_004145 besitzt eine verkürzte a-b Domänenstruktur ohne ein ER-Retentionssignal am C-Terminus. DFL\_004795 zeigt eine ERp38 ähnliche Organisation mit zwei a Domänen und zwei Cysteinmotiven auf, sowie dem C-Terminus gelegenen ER-Retentionssignal (KDEL). Das größte Protein kodiert von DFL\_007768 weist eine a Domäne mit einem aktiven Cysteinmotiv und eine b Domäne auf, aber kein ER-Retentionssignal. DFL\_003235 und DFL\_007810 sind Thioredoxin-ähnliche Proteine ohne klassische PDI-Domänenstruktur. Der Maßstab von 3 cm entspricht 100 AS. Die Domänen wurden mittels InterPro identifiziert.

Um die PDI-ähnlichen Proteine weiter zu identifizieren, wurde eine phylogenetische Analyse mit diesen sowie der PDI1 aus *S. cerevisiae* (ScPDI1) durchgeführt (**Abbildung 22A**). Das gut charakterisierte Protein PDI1 aus *S. cerevisiae* wurde zur Wurzelung als Outgroup verwendet. Dabei gruppiert DFL\_002885 als nächster Verwandter mit ScPDI1 und wurde dementsprechend als PDI1 Homolog klassifiziert. Die übrigen Proteine bilden ein separates Cluster und sind als PDI ähnliche Proteine Mitglieder der PDI-Superfamilie zuzuordnen. Um die evolutionäre Einordnung der DFL\_002885 weiter zu untersuchen, wurde eine weitere phylogenetische Analyse mit ausgewählten PDI1-Proteinen anderer Organismen durchgeführt (**Abbildung 22B**). Die PDI1 von *Homo sapiens* (rot) wurde als Outgroup

zur Wurzelung des Baumes verwendet. Hier gruppiert DFL\_002885 mit den PDI1-Proteinen der Ascomyceten (blau). Innerhalb der Ascomyceten hat sich neben der PDI1-Klade eine zusätzliche gut unterstützte Subgruppe, die NFP (Grün), ausgebildet. Damit gruppiert DFL\_002885 eng mit PDI1 aus *S. cerevisiae* und auch mit anderen PDIs von Ascomyceten. Dies und die Domänenstruktur unterstützt die Einordnung als PDI1-Homolog.



**Abbildung 22: Phylogenetische Analyse der PDI-ähnlichen Proteine aus *A. flagrans*.** [A] Maximum-Likelihood-Baum (ML) der in *A. flagrans* durch BLAST-Suche identifizierten PDI-ähnlichen Proteine. PDI1 aus *S. cerevisiae* (ScPDI1, grau) diente als Outgroup zur Wurzelung des Baumes. Der Baum wurde rekonstruiert mit der ML-Methode unter Verwendung des Substitutionsmodells LG+I und 1000 Bootstrap-Replikaten. Bootstrapwerte sind an den Knoten in Prozent angegeben. Dabei gruppiert DFL\_002885 als nächster Verwandter mit ScPDI1. [B] ML-Baum ausgewählter pilzlicher PDI-Proteine (inklusive *A. flagrans* DFL\_002885, AfIPDI1, grün) mit PDIA4 von *Homo sapiens* (HsPDIA4, rot) als Outgroup zur Wurzelung des Baumes. Der Baum wurde mit der ML-Methode unter Verwendung des LG+F+G Substitutionsmodells und 1000 Bootstrap-Replikate konstruiert. Bootstrap-Werte sind an den Knoten in Prozent angegeben. AfIPDI1 gruppiert mit den anderen Pilzen in der Gruppe der Ascomyceten (blau) und bildet innerhalb dieser Gruppe eine extra Gruppe der NFP (grün).

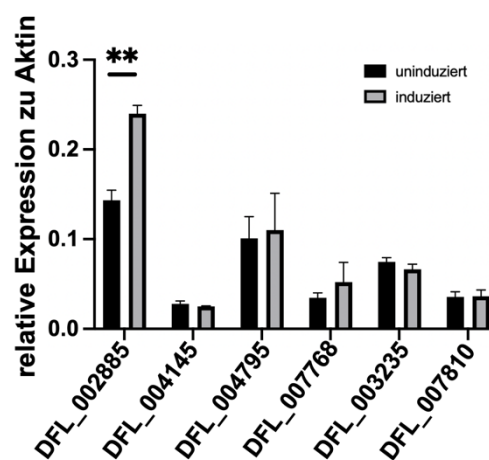
### 2.8.1 Expression von PDI1 (DFL\_002885) ist während der Infektion hochreguliert

Während die phylogenetischen Analysen und die Domänenstruktur DFL\_002885 als richtiges PDI1-Homolog identifizieren, wurde als nächstes die Expression aller PDI-

ähnlichen Gene in induziertem und uninduziertem *A. flagrans* Myzel mittels einer qRT-PCR bestimmt.

Für die Extraktion der DNA wurde *A. flagrans* sieben Tage lang bei 28 °C kultiviert und danach eine Sporensuspension hergestellt.  $1 \times 10^6$  Sporen pro Platte wurden ausplattiert und bei 28 °C inkubiert. Die uninduzierten Proben wurden für 48 Stunden inkubiert. Für die induzierten Proben wurde zur Fallenbildung nach 24 Stunden eine gemischte Population von *C. elegans* dazugegeben und weitere 24 Stunden ko-inkubiert. Das Myzel wurde von den mit Cellophan belegten Platten abgekratzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörsert. Die Isolierung und Aufreinigung der RNA erfolgte unter Verwendung der Trizol-Extraktionsmethode. Es wurden biologische Triplikate hergestellt, wobei ein Replikat Myzel von 10 Platten enthält. Der anschließende DNase-Verdau wurde mithilfe des Turbo-DNA-free Kits (Thermo Fischer Scientific) durchgeführt. Die qRT-PCR wurde in biologischen und technischen Triplikaten mit dem Luna One Step qPCR Kit (NEB) durchgeführt, wobei ein Ansatz 50 ng RNA enthielt. Als Referenzgen wurde das *gamma-Aktin* (DFL\_002353) von *A. flagrans* verwendet.

Nur DFL\_002885 zeigte eine relative Expression, welche sich zwischen uninduziertem ( $0,14 \pm 0,01$  SD;  $n = 3$ ) und induziertem ( $0,24 \pm 0,01$  SD;  $n = 3$ ) Myzel signifikant unterscheidet. Die anderen getesteten Proteine weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Zuständen auf. Damit konnte eine erhöhte Genexpression von DFL\_002885 im induzierten Zustand festgestellt werden (**Abbildung 23**). Daher wurde DFL\_002885 als PDI1 bezeichnet und in weiteren Experimenten nur noch mit PDI1 von *A. flagrans* gearbeitet.



**Abbildung 23:** *DFL\_002885* wird während des Infektionsprozesses leicht hochreguliert. Relative Expression der PDI-Homologe aus *A. flagrans*, bestimmt mittels qRT-PCR von RNA, die aus nicht induziertem Myzel auf LNA-Platten sowie aus mit Nematoden ko-inkubiertem Myzel isoliert wurde. Die

qRT-PCR zeigt eine Hochregulation nur bei *DFL\_002885*. Die statistische Signifikanz wurde mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test bestimmt ( $p \leq 0,005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*,  $p > 0,05$ ). Die Expression wurde auf Aktin normalisiert.

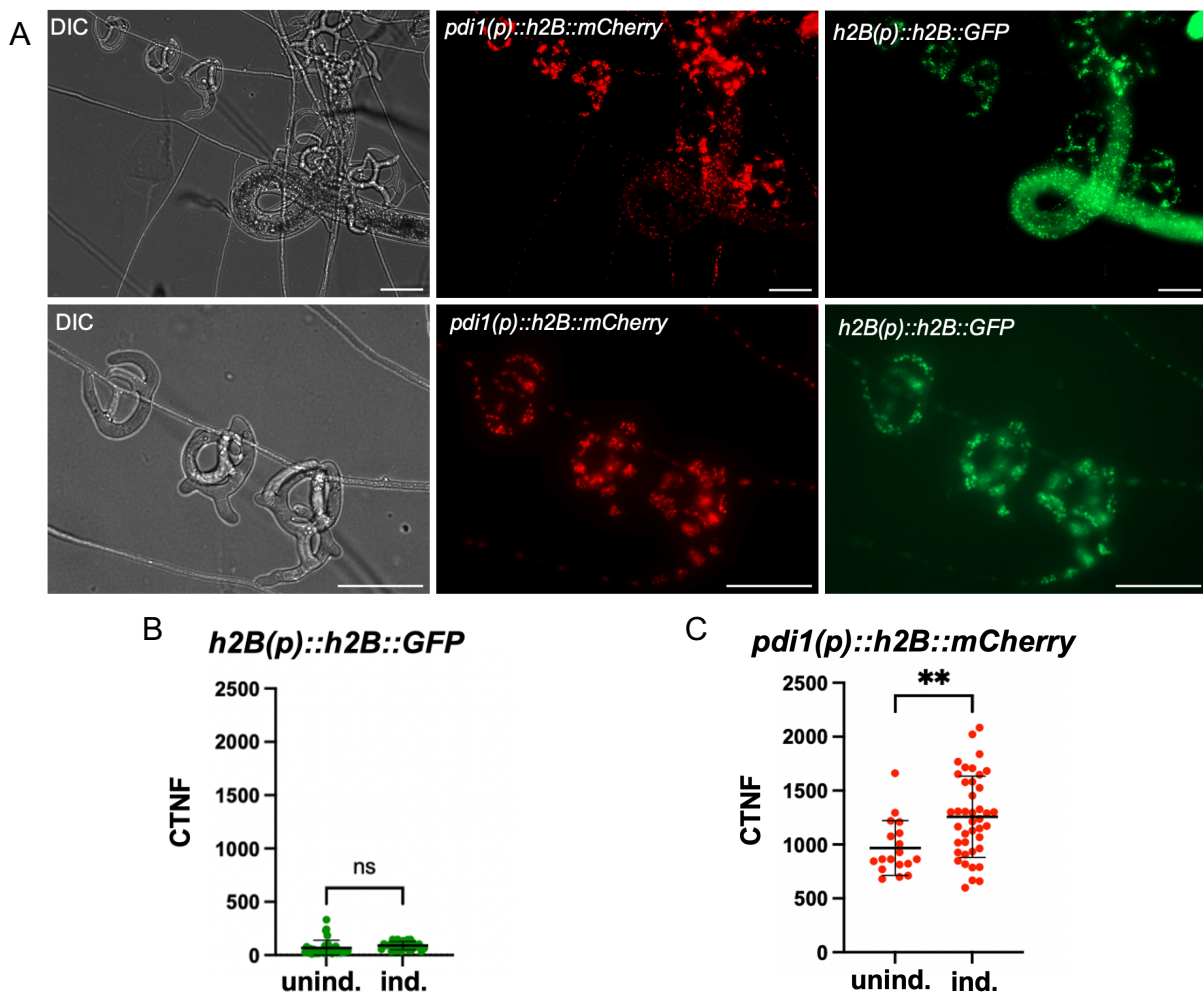
Da die qRT-PCR allerdings keine räumliche, sondern nur eine zeitliche Auflösung der Genexpression liefert, wurde ein Promotor-Reporter-Assay durchgeführt. Indem der *pdi1*-Promotor die Expression des mit mCherry fusionierten Histon Gens *h2B* steuert, dient dieser Assay der Visualisierung der Promotoraktivität von *pdi1*. Das Fluorophor lokalisiert aufgrund der Fusion mit dem Histon 2B, welches eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) besitzt, in den Zellkernen und ermöglicht so die eindeutige Unterscheidung des Signals. Durch dieses System ist es möglich zu sehen, wo *pdi* exprimiert wird.

Für die Promotorfusion wurde das Plasmid pAK53, welches das mCherry-Histon *h2B* Fusionsprodukt unter der Kontrolle des *pdi1*-Promotors enthält, verwendet. Der Promotor von *pdi1* erstreckt sich über 1,5 kb upstream vom Open-Reading-Frame (ORF) von *pdi1*. Dieser Vektor wurden in den *A. flagrans* Stamm sVW10 transformiert. Dieser Stamm exprimiert ein Konstrukt bestehend aus dem Fusionsprodukt des *h2B* Gens mit GFP unter der Kontrolle des konstitutiven *h2B*-Promotors (*h2B(p)::h2B::GFP*). Dadurch weisen die Zellkerne dieses Stammes eine grüne Fluoreszenz auf, was als Kontrolle diente. Transformanten wurden auf PDA-Platten mit Hygromycin selektiert. Positive Transformanten erhielten den Namen sAK22. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Transformanten mit einem Zahnstocher auf LNM-Agarpads angeimpft und für die Induktion der Fallenbildung mit einer gemischten Population von *C. elegans* bei 28 °C für 24 Stunden ko-inkubiert.

In uninduziertem Myzel ohne *C. elegans* des *pdi*-Promotor Reporterstammes war die Fluoreszenz der Zellkerne schwächer im Vergleich zum induzierten Myzel. Betrachtet man die induzierte Probe genauer, ist nicht nur eine Fluoreszenz in Zellkernen der Fallen sondern auch der trophischen Hyphe zu sehen. Die GFP-Fluoreszenz der Zellkerne weist ein gleichmäßig starkes Signal sowohl in uninduzierten wie auch in induzierten Proben auf (**Abbildung 24A**).

Zur Quantifizierung der Expressionsstärke wurden einzelne Zellkerne im uninduzierten sowie im induzierten Myzel lokalisiert. Die Zellkerne wurden in ImageJ markiert und die Fluoreszenzstärke sowohl im GFP- als auch im mCherry-Kanal gemessen. Die gemessenen Intensitäten wurden jeweils gegen den Hintergrund relativiert. Dadurch wurde für jeden Kern sowohl der GFP als auch mCherry-Wert ermittelt. Die Werte der korrigierten totalen Kernfluoreszenz (*corrected total nuclei*

fluoreszenz, CTNF) sind in **Abbildung 24B/C** dargestellt. Der Vergleich der Werte des GFP-Signals zeigt mit Werten von  $67 (\pm 74 \text{ SD}; n = 33)$  im uninduzierten Myzel und Werten von  $90 (\pm 39 \text{ SD}; n = 27)$  im induzierten Myzel keine Unterschiede in der Intensität der Zellkernfluoreszenz an (**Abbildung 24B**). Die Analyse der Werte des mCherry-Signals des *pdi1*-Promotor Reporterstammes, zeigen mit den Werten  $1257 (\pm 377 \text{ SD}; n = 41)$  für induziertes Myzel und  $968 (\pm 254 \text{ SD}; n = 18)$  für uninduziertes Myzel, dass die Kerne im induzierten Myzel eine höhere Intensität aufweisen (**Abbildung 24C**). Da die Fluoreszenzstärke des Reporters die Promotoraktivität widerspiegelt, bestätigt dieses Experiment die differenzielle Expression von *pdi1* im prädatorischen Lebensstil.



**Abbildung 24:** *pdi1* wird in induziertem Myzel in den vegetativen Hyphen, den Fallen und auch in trophischen Hyphen exprimiert. Räumliche Analyse der *pdi1* Expression mittels Transkriptions-Reporter-Assay. Der *pdi1*-Promotor wurde mit *h2B*-Gen und mCherry fusioniert und als Kontrolle wurde *h2B* mit seinem nativen Promotor mit GFP fusioniert. Bilder wurden 24 Stunden nach der Inokulation aufgenommen. **[A]** Im induzierten Myzel sieht man *pdi1* Expression in den vegetativen Hyphen, den Fallen und auch innerhalb der trophischen Hyphen. Gefangener Nematode links im Bild obere Reihe.

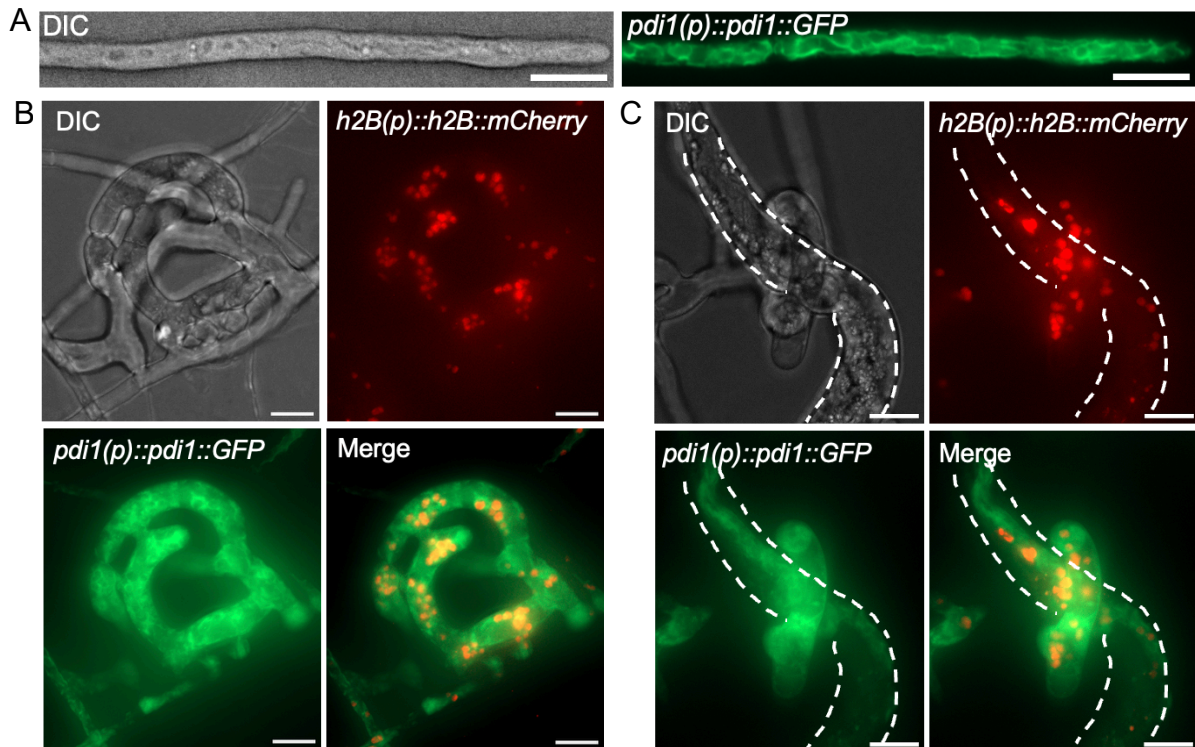
Untere Reihe zeigt drei leere Fallen. Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$  **[B]** Quantifizierung der korrigierten gesamten Kernfluoreszenz (CTNF) von mCherry und GFP in Zellkernen von induziertem (ind.) und uninduziertem (unind.) Myzel. **[C]** Das GFP-Signal der Zellkerne der Kontrolle war im uninduzierten und induziertem Myzel vergleichbar. **[D]** Das mCherry Signal, was die *pdi1* Expression widerspiegelt, war im induzierten Myzel höher als im uninduzierten. Die Zellkerne wurden mit ImageJ gemessen. Anzahl der gemessenen Zellkerne: *pdi1(p)* ind.  $n = 41$ , *pdi1(p)* unind.  $n = 18$ , *h2B(p)* ind.  $n = 27$ , *h2B(p)* unin.  $n = 33$ . Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten zweiseitigen Student-t-Test bestimmt ( $p \leq 0,01$ ; \*\*,  $p > 0,05$ ; ns).

### 2.8.2 PDI1 lokalisiert im ER

Nicht nur die zeitliche Expression, sondern auch die räumliche Verteilung des Proteins hilft bei der Suche nach der möglichen Rolle von PDI1 während der Infektion. Die Lokalisation von PDI1 mithilfe von fluoreszierenden Proteinen hilft bei der Einordnung im Infektionsgeschehen. Dafür wurde *pdi1* mit GFP fusioniert und dieses Konstrukt in *A. flagrans* exprimiert. Zur Mikroskopie der Reporterstämme wurden diese auf dünnen LNM-Agarpads angeimpft und zur Induktion der Fallenbildung mit einer gemischten Population an *C. elegans* bei 28 °C für 24 Stunden inkubiert.

Das Fusionsprotein konnte während der Infektion in den Fallen, den trophischen Hyphen und im vegetativen induzierten Myzel in ER ähnlichen Strukturen lokalisiert werden (**Abbildung 25**). Auch in uninduzierten Hyphen konnte das Protein in denselben ER-ähnlichen Strukturen lokalisiert werden. Dieser Stamm wurde sAK13 genannt.

Zur genaueren Einordnung der Strukturen, welche bei der Lokalisation von PDI1 zu sehen sind, wurde in den Stamm sAK13 das Plasmid pAK74 (*h2B(p)::h2B::mCherry*) transformiert, mit welchem die Zellkerne rot angefärbt werden. Man sieht, dass sich die ER-ähnlichen Strukturen um die Zellkerne sammeln und dann filamentös weitergehen (**Abbildung 25B/C**).



**Abbildung 25: PDI1 lokalisiert in ER-artigen Strukturen.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Stammes sXD22 (*pdi1(p)::pdi1::GFP*) und sAK24 (*sAK13 x pAK74 (h2B(p)::h2B::mCherry)*) im GFP-, mCherry und DIC-Kanal während der Infektion von *C. elegans*. **[A]** PDI1 lokalisiert in ER-artigen Strukturen in einer vegetativen uninduzierten Hyphe. **[B]** Das PDI1-GFP Fusionskonstrukt lokalisiert in ER-artigen Strukturen um die Zellkerne, in rot markiert. **[C]** Auch in trophischen Hyphen innerhalb des Nematoden lokalisiert PDI1-GFP in ER-artigen Strukturen. Gefangener Nematode markiert mit gestrichelter Linie. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ .

### 2.8.3 Deletion von PDI1 beeinflusst Pathogenität von *A. flagrans*

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von PDI1 während der Infektion und den Effekt auf die Virulenz wurde das Gen mittels homologer Rekombination durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt (*sAK14*). Dazu wurde *A. flagrans* Wildtyp mit dem Plasmid *pAK46 (left border (LB)::hph::RB (right border))* transformiert, auf dem die Hygromycinresistenzkassette von je 1 kb oberhalb und unterhalb des ORFs flankiert wird.

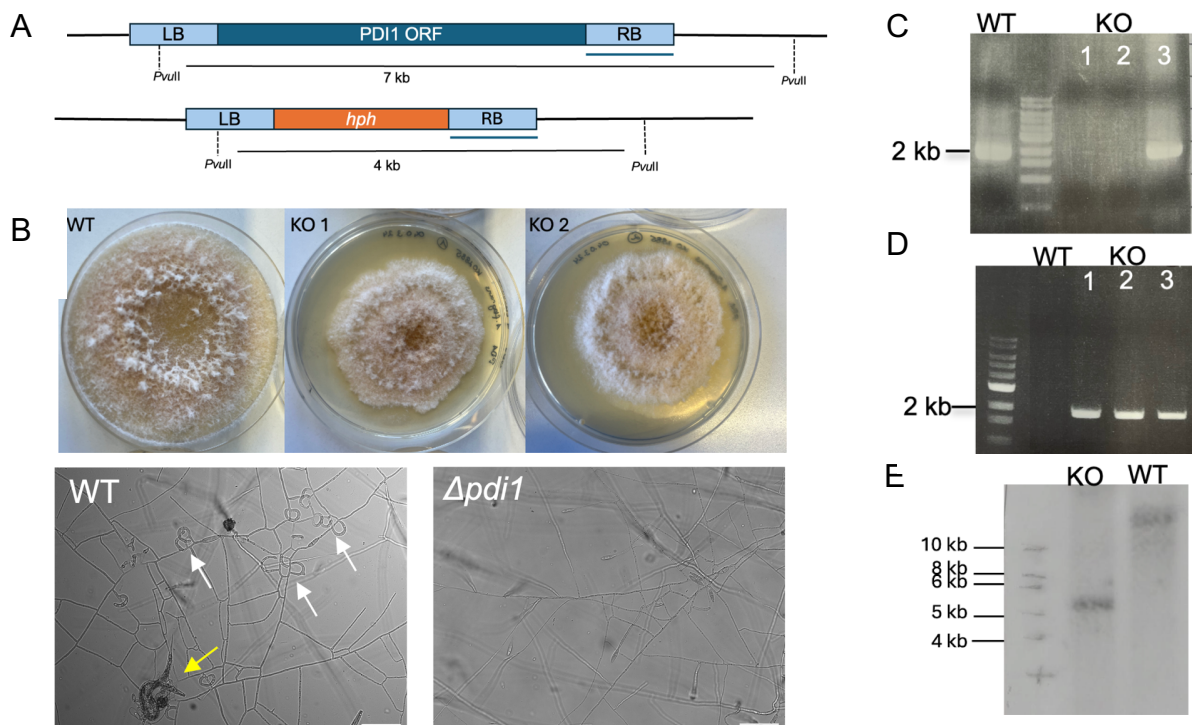
Der Deletionsstamm weist eine Veränderung im vegetativen Wachstum auf PDA-Platten auf und kann keine Fallen bilden und damit auch keine Nematoden fangen (**Abbildung 26B**).

Drei mögliche Transformanden-Stämme wurden mit einer Southern Blot-Analyse und PCR auf korrekte, einmalige Integration der Hygromycin-Resistenzkassette überprüft. Dafür wurde die genomische DNA des Wildtyps und

dieser Stämme extrahiert. Die genomische DNA der Deletionsstämme wurde mit *PvuII* verdaut. Die genomische DNA des Wildtyps wurde mit dem passenden gleichen Restriktionsenzym als Kontrolle verglichen. Die durch den Restriktionsenzym-Verdau entstandenen DNA-Fragmente wurden mit einer Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran überführt und anschließend mit der passenden Sonde hybridisiert. Für die Deletionsstämme dienten die 1,5 kb *downstream* des *pdi1* ORFs als Sonde (**Abbildung 26A**). Mit Hilfe dieser spezifischen Sonde wird zwischen dem Wildtyp-Allel und den veränderten Allelen unterschieden.

Zur Kontrolle wurden zwei PCRs gemacht. In der einen wurde der ORF (1,7 kb) (**Abbildung 26C**) amplifiziert, in der anderen die *hph*-Kassette (2 kb) (**Abbildung 26D**). Ein Transformant wurde als positiver Transformant bezeichnet, wenn er eine Bande bei der *hph* Sequenz aufweist aber keine beim ORF. Dies ist nur der Fall für Transformant 1 und 2.

Im Southern Blot getesteten Deletionsstamm 1 (KO1) von *pdi1* wurde eine Bande mit einer Größe von 5,5 kb detektiert, was nicht der erwarteten Größe von 4 kb des durch die Integration der Hygromycin-Resistenzkassette veränderten Allels entspricht. Beim Wildtyp als Kontrolle entsprach die Bande von über 10 kb nicht der erwarteten 7 kb Bande (**Abbildung 26E**).



**Abbildung 26: Deletion von *pdi1* beeinflusst die Virulenz.** [A] Schematische Darstellung der Deletionskassette. Für die Deletion (KO) von *pdi1* wurde der *pdi1*-ORF mittels homologer Rekombination gegen eine Hygromycinresistenzkassette (*hph*) ausgetauscht. Dafür verfügte die

Hygromycinresistenzkassette über zwei 1kb flankierenden Regionen (RB: *right border*, LB: *left border*). Die Sonde für den Southern Blot (blaue Striche), die Restriktionsschnittstellen und die daraus resultierende Fragmentgrößen sind angegeben. **[B]** Deletion von *pdi1* resultiert in einem langsameren Wachstum auf PDA-Platten. Pilze wurden 7 Tage bei 28 °C inkubiert. Der Deletionsstamm konnte auch keine Fallen auf LNA-Agarpads bilden. **[C] [D]** Analytische PCR zu Bestätigung der Deletion von *pdi1*. Dabei wurde einmal der ORF von *pdi1* amplifiziert (C) und einmal die *hph* Resistenzkassette (D). Der ORF von 1,7 kb wurde im Wildtyp (WT) als Kontrolle amplifiziert. Von den drei getesteten Transformanden konnte nur noch bei der Nummer 3 der ORF amplifiziert werden. Die *hph* Resistenzkassette konnte dagegen bei allen drei getesteten Transformanden amplifiziert werden und in der Kontrolle mit Wildtyp nicht. Das zeigt, dass Transformand 1 und 2 die Deletion des *pdi1* ORFs aufweisen. **[E]** Verifizierung des *pdi1*-Deletionsstammes sAK14 durch Southern Blot. Nach dem Verdau des Deletionsstammes mit *PvuII* wurden Banden von 4 kb bei der Deletion und 7 kb beim Wildtyp erwartet. Jedoch sind beide Banden mit 5 kb bei der Deletion und über 10 kb beim Wildtyp zu groß.

### 3. Diskussion

Die im Boden lebenden NFP bilden spezifische Fallenstrukturen aus, mit denen sie Nematoden fangen und so von einem saprotrophen zu einem prädatorischen Lebensstil wechseln (Jiang *et al.*, 2017). Während der Interaktion des Pilzes mit den Nematoden werden viele Virulenzfaktoren und Effektorproteine sekretiert (Kim *et al.*, 2016). Bisher ist der Infektionsmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Die interspezieskommunikation zwischen Wirt und Pathogen ist ein ausgeklügeltes System, was sich durch Millionen Jahre Koevolution entwickelt hat. Durch eine Transkriptom- und Sekretionsanalyse des NFP *A. flagrans* konnten viele pathogenrelevante Proteine bestimmt werden. Während der Infektion werden viele kleine sekretierte Proteine sekretiert, von denen einige als cysteinreich identifiziert wurden (Youssar *et al.*, 2019).

Bisher ist nicht viel bekannt, wie die NFP auf ihren Wirt wirken und welchen Effekt die Effektorproteine während des Infektionsprozesses auf den Wirt haben. CyrA, NipA und TrsA sind Virulenzfaktoren, die in *A. flagrans* schon charakterisiert wurden (Emser *et al.*, 2024; Emser *et al.*, 2025; Wernet *et al.*, 2021a).

In einer vorausgegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass der putative Effektor D PefD während der Infektion hochreguliert wird, eine distinkte Lokalisation während der Infektion zeigt, welche mit der Lokalisation von CyrA übereinstimmt. Ein Deletionsstamm von *pefD* wurde nicht weiter untersucht.

In dieser Studie wurde PefD nun weiter untersucht, vor allem seine Rolle im Wirt während der Infektion. PefD gehört mit den Charakteristika: ein Signalpeptid, eine Größe von 72 AS und Disulfidbrücken zur Gruppe der kleinen sekretierten Proteine an. Diese Gruppe hat häufig eine Rolle während der Infektion (Kim *et al.*, 2016). In einem Virulenzassay mit dem Deletionsstamm konnte ein signifikanter Unterschied in der Paralyse im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. *C. elegans* Stämme mit heterolog exprimiertem *pefD* wurden auf abweichende Phänotypen hin untersucht. Neuronal exprimiertes *pefD* führte in den Nematoden zu einer erhöhten RIS-Gesamtaktivität.

Zusätzlich wurde die Proteindisulfid-Isomerase PDI1 in *A. flagrans* untersucht, welche das Homolog zur PDI1 in *S. cerevisiae* ist. Es konnte gezeigt werden, dass es während der Infektion hochreguliert ist und im ER lokalisiert. Deletion der *pdi1* führte zu einer komplett reduzierten Virulenz.

### 3.1 Verschiedene Sekretionsmechanismen für Virulenzfaktoren in *A. flagrans*

Die Interaktion von Pilz und Nematoden findet außerhalb vom Pilz statt, somit müssen die Virulenzfaktoren und Effektorproteine sekretiert werden. Die meisten sekretierten Proteine besitzen ein N-terminales Signalpeptid (von Heijne, 1990). Für PefD wurde ein 28 AS langes Protein am N-Terminus vorhergesagt. Dies unterscheidet sich von der vorausgegangenen Studie, welche nur die ersten 18 AS als Signalpeptid identifizierten. Durch Weiterentwicklung des SignalP *Machine Learning Tools* können immer mehr Signalpeptide erkannt werden und genauere Vorhersagen getroffen werden. Somit kann die in dieser Arbeit verwendete SignalP 6 Version Signalpeptide erkennen, die in vorherigen Versionen nicht erkannt wurden (Teufel *et al.*, 2022). Die Funktionalität des Signalpeptids wurde durch einen Laccase-Assay untersucht und bestätigt. Durch einen Laccase-Assay in dem die Laccase an eine Variante des *pefD* Gens ohne sein Signalpeptid fusioniert ist, konnte gezeigt werden, dass das Signalpeptid für die Sekretion wichtig ist. Auch die vesikelartige Lokalisation von PefD in den Fallen ist abhängig vom Signalpeptid. Denn PefD ohne sein Signalpeptid lokalisiert im Zytoplasma der Fallen, wohingegen die Expression des Signalpeptids alleine die Lokalisation in den vesikel-ähnliche Strukturen wie das Volllängenprotein aufweist. Dies deutet auf eine aktive sekretorische Route hin. Die Lokalisierung im Wirt wurde mittels WoLF PSORT als extrazellulär vorhergesagt. In NFP sind schon Virulenzfaktoren oder -proteine bekannt, die extrazellulär eine Rolle spielen, wie Serinproteasen, Chitinasen oder Collagenasen (Yang *et al.*, 2007a).

Da das Signalpeptid eine wichtige Rolle spielt, könnte PefD in Vesikeln über den konventionellen Weg über den Golgi-Apparat und das ER bis zur Plasmamembran gebracht werden (Rothman, 1994). Die Sekretion in filamentösen Pilzen ist schon gut beschrieben, allerdings sind viele Fragen im Zusammenhang mit NFP und ihren Virulenzproteinen unbeantwortet.

Im pflanzenpathogenen Pilz gibt es zwei Sekretionsmechanismen für Effektorproteine, die sich für zytoplasmatische und extrazelluläre/apoplastische Effektoren unterscheidet. Zytoplasmatische Effektoren lokalisieren im *biotrophic interference complex* (BIC) und werden über den unkonventionellen Weg sekretiert. Dabei spielt der Exozystkomplex zusammen mit SNARE Proteinen (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor*) eine wichtige Rolle. Die extrazellulären Effektoren werden über den konventionellen Golgi-ER Sekretionsweg

sekretiert (Zhang and Xu, 2014). So wird der Effektor CyrA über den unkonventionellen Weg in den Infektionsbulbus sekretiert, was durch die veränderte Lokalisation in einer ExoA-Mutante gezeigt wurde (Wernet *et al.*, 2021a). Die Analyse von PefD in der ExoA-Deletionsmutante könnte zeigen, ob PefD durch den unkonventionellen Weg sekretiert wird. Die Beteiligung der konventionellen Sekretion könnte durch eine BrefeldinA Behandlung überprüft werden, da BrefeldinA den konventionellen Sekretionsweg hemmt (Arioka *et al.*, 1991).

Es gibt aber neben diesen Sekretionsmechanismen noch andere Möglichkeiten der Sekretion. Eine Möglichkeit sind die extrazellulären Vesikel, wobei über den molekularen Mechanismus noch nicht viel bekannt ist. Allerdings werden extrazelluläre Vesikel häufig mit Wirt-Pathogen Interaktionen in Verbindung gebracht, indem sie Pathogenitäts-relevante Faktoren transportieren (Wang *et al.*, 2025b). Die Isolation dieser Vesikel in *A. flagrans* könnte zeigen, ob Virulenzfaktoren enthalten sind, da auch in *A. flagrans* die Effektoren wie NipA, CyrA in vesikel-ähnlichen Strukturen in den Fallen lokalisieren (Emser *et al.*, 2024; Wernet *et al.*, 2021a).

### **3.2 Expression von *pefD* ist abhängig vom Lebensstil von *A. flagrans***

Die Analyse der Expression des *pefD*-Gens mittels qRT-PCR zeigte eine statistisch signifikante Hochregulierung der relativen Expression während des induzierten Zustandes 12 und 24 Stunden nach der Inokulation mit Nematoden. Dies zeigt, dass PefD eine Rolle während der Infektion in der mittleren Phase nach der Penetration hat. Da aber nicht gesagt werden kann, in welchen Strukturen während der Infektion *pefD* hochreguliert wird, da die RNA aus Platten extrahiert wurde, auf denen leere Fallen und auch Fallen mit lebenden und toten Würmern vorhanden sind, wurde eine Promotorreporteranalyse durchgeführt. Diese bestätigte das qRT-PCR Ergebnis. Dabei wurde die korrigierte Fluoreszenzintensität der Zellkerne (*corrected total nuclei fluorescence*, CTNF) im induzierten und uninduzierten Zustand verglichen. Dies spiegelt die Promotoraktivität von *pefD* wider, da das Fluoreszenz-Reporterkonstrukt unter der Kontrolle des *pefD* Promotors steht. CTNF-Werte waren im induzierten Zustand signifikant höher als im uninduzierten Zustand, wobei bei der H2B Kontrolle die Aktivität bei beiden Zuständen ähnlich war. Im induzierten Zustand wiederum waren die CTNF-Werte in den Infektionsstrukturen, also Fallen und trophischen Hyphen im Vergleich zum induzierten vegetativen Myzel etwas erhöht. Im uninduzierten vegetativen Myzel konnten trotzdem fluoreszente Zellkerne identifiziert

werden, was mit dem Ergebnis der qRT-PCR auf eine Basalexpression von *pefD* hindeutet.

Differentielle Genexpression ist wichtig für Virulenz der NFP, da die Fallenbildung und der damit einhergehende Wechsel in den räuberischen Lebensstil ein energieaufwendiger Prozess ist. Daher sollten virulenzspezifische Faktoren wie PefD stark reguliert werden (Vidal-Diez de Ulzurrun and Hsueh, 2018). In anderen NFPs wurde durch Transkriptomanalysen gezeigt, dass unter den hochregulierten Genen während der Infektion auch kleine sekretierte Proteine sind, die eine wichtige Rolle beim räuberischen Lebensstil haben (Yang *et al.*, 2011). Diese Regulation der Effektorproteine und Virulenzfaktoren ermöglicht eine ressourcensparende anpassbare Steuerung von Faktoren für die Pathogenität (Lo Presti *et al.*, 2015).

### **3.3 Die Lokalisation gibt Hinweise, dass PefD ein Effektor der mittleren Phase des Infektionsprozesses ist.**

Wird die Lokalisation von PefD während der Infektion angeschaut, so sieht man PefD in leeren Fallen in den vesikel-ähnlichen Strukturen lokalisieren. Im weiteren Verlauf der Infektion, wenn ein Nematode in der Falle gefangen ist, lokalisiert PefD nur noch im Infektionsbulbus, welcher nach der Penetration im Nematoden gebildet wird. In vegetativem induzierten und uninduzierten Myzel ist kein spezifisches oder nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal von PefD sichtbar. Dies steht im Kontrast mit der mRNA-Expression und der Promotoraktivität, welche auch im vegetativen Myzel in geringer Konzentration sichtbar war. Dies deutet auf eine Regulation auf Translationsebene oder Posttranskriptionsebene hin. In filamentösen Pilzen wie *A. nidulans*, *S. cerevisiae* oder *N. crassa* wurden spezifische regulatorische Sequenzen in Genen gefunden, die die Expression regulieren. Diese *upstream open-reading-frames* (uORFs) befinden sich am 5' Ende der mRNA und kontrollieren Ribosomen, um so die Translation zu beeinflussen. Genregulation durch uORFs kontrolliert die Expression der Gene als Antwort auf bestimmte physiologische Signale (Hood *et al.*, 2009).

Die Lokalisation im Infektionsbulbus stimmt mit der von CyrA überein im Infektionsbulbus (Wernet *et al.*, 2021a). Mit NipA gibt es eine Kolo-kalisation an der Penetrationsstelle aber im Gegensatz zu NipA, welches nur an der Penetrationsstelle lokalisiert, findet sich PefD im weiteren Verlauf im Infektionsbulbus. Dies zeigt, dass PefD nicht nur zeitlich, sondern auch räumlich reguliert wird. Die Infektion lässt sich in

drei Phasen einteilen: frühe Phase, die Penetration; mittlere Phase, Infektionsbulbus und die späte Phase, wenn trophische Hyphen den Nematoden kolonisieren. Bei jeder Phase werden unterschiedliche Effektoren exprimiert und sekretiert, welche auch verschiedene Angriffspunkte im Wirt aufweisen (Fischer and Requena, 2022). PefD wird durch seine Lokalisation und Expression zur mittleren Phase gezählt und könnte damit eine Rolle bei der Paralyse oder der Überwindung der angeborenen Immunabwehr spielen. Das Phänomen der räumlich zeitlichen Expression und Sekretion von Effektorproteinen konnte auch schon in anderen Wirt-Pathogen Interaktionen beobachtet werden. Im pflanzenpathogenen Pilz *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass die Effektoren in drei Phasen exprimiert werden, welche mit den Phasen der Infektion übereinstimmen. Dies zeigt, dass die zeitliche und räumliche Steuerung der Effektoren ein wichtiges Merkmal der Virulenz ist.

Diese Experimente zeigen eine vielschichtige Regulation von *pefD* auf Transkriptions- und Translationsebene hin. Die gezielte Expression und Lokalisation von PefD während der Infektion deuten auf eine Rolle in der Interaktion mit Nematoden hin.

### **3.4 PefD ist an der Paralyse gefangener Nematoden beteiligt**

Um die Rolle von PefD während des Infektionsprozesses zu verstehen, wurde das *pefD* Gen durch homologe Rekombination in *A. flagrans* deletiert. Der Deletionsstamm wies keinen offensichtlichen Phänotyp auf, er bildete Fallen aus und war in der Lage Nematoden zu fangen und zu verdauen. In einem Virulenzassay wurden der Deletionsstamm, die Rekompentationsstämme und auch ein Überexpressionsstamm von *pefD* auf ihre Rolle während der Infektion hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp eine verzögerte Paralyse der Nematoden aufwies. Der Wildtyp und auch die Rekompentationsstämme benötigten zwischen 80 bis 100 min, um die gefangenen Nematoden vollständig zu paralisieren. Der Deletionsstamm brauchte mit 150 min wesentlich länger bis der Nematode paralytisch war. Der Überexpressionsstamm hingegen war mit circa 60 min am schnellsten mit der Paralyse. Dass die Rekompentation den Wildtyp Phänotyp wieder herstellt, zeigt, dass PefD direkt eine Rolle bei der Paralyse hat. Dadurch kann man PefD nun als einen Effektor der mittleren Phase der Infektion zuordnen. Dazu passt auch die Rolle bei der Paralyse der Nematoden.

Nicht nur PefD, sondern auch CyrA zeigt einen Einfluss auf die Paralyse (Wernet *et al.*, 2021a). Daraus lässt sich schließen, dass *A. flagrans* Virulenzfaktoren mit ähnlichen Funktionen besitzen kann, die das gleiche Ziel haben können, aber andere Wirkweise. Somit können sie miteinander interagieren und bei Deletion des einen Effektors das Fehlen dessen kompensieren. Oft ist es so, dass die Deletion eines Gens nur einen dezenten Phänotyp zeigt, da der Pilz weitere Effektorproteine hat, die die Virulenz aufrechterhalten (Brefort *et al.*, 2014). Um nicht unterzugehen, müssen Pathogene immer neue Strategien entwickeln, damit sie die Pathogenität aufrechterhalten können (Van Der Does and Rep, 2007). PefD ist dabei nur eine Komponente in einem komplexen Zusammenspiel vieler verschiedener Virulenzfaktoren.

Zukünftige Studien über Interaktionspartner mittels Yeast-Two-Hybrid oder Transkriptomanalysen könnte zeigen, ob PefD mit anderen Effektorproteinen interagiert oder wie er die Paralyse reguliert.

### **3.5 Heterologe Expression von PefD in *C. elegans* führt zu einer Lokalisation in den Coelomocyten**

Heterologe Expression von Proteinen ist eine gute Methode, um die Wirkweise der Proteine im Wirt zu identifizieren. *PefD* wurde dabei sowohl mit als auch ohne Signalpeptid in *C. elegans* exprimiert. Nach der Infektion sollte das prozessierte Protein ohne Signalpeptid die Wurmzellen erreichen. Die Expression mit Signalpeptid erlaubt es, dass Protein aus den Wurmzellen sekretiert werden kann und damit sein eigentliches Zielgewebe erreichen kann, wenn das exprimierende Gewebe nicht das richtige Ziel ist. Wird *pefD* mit Signalpeptid heterolog in *C. elegans* unter Kontrolle des konstitutiven *eft-3* Promotors oder des induzierbaren Hitzeschock Promotors *hsp-16.48* exprimiert, so kann eine Lokalisation in den sechs Coelomocyten nachgewiesen werden. Coelomocyten sind spezialisierte Makrophagen-ähnliche Zellen, die jedoch keine aktive Phagozytose betreiben, sondern unspezifisch durch Endozytose toxische extrazelluläre Proteine aus dem Pseudocoel aufnehmen und abbauen (Fares and Greenwald, 2001). Die Lokalisation von PefD in den Coelomocyten zeigt, dass *pefD* wahrscheinlich ins Pseudocoel sekretiert wird und dann von den Coelomocyten aufgenommen wird. Dadurch könnten Coelomocyten eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Virulenzfaktoren spielen, da *C. elegans* nur die angeborene Immunität zur Verfügung hat und keine spezialisierten Immunzellen. Zusätzlich könnten die

Coelomocyten auch eine Rolle bei der Signalweiterleitung spielen, wenn sie PefD aufgenommen haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Coelomocyten Signale aus dem Nervensystem aufnehmen können, was dann zur Aktivierung von Stress- und Immunantworten führt (Gallotta *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2010). Dass nur PefD mit dem Signalpeptid in den Coelomocyten lokalisiert, spricht dafür, dass die Sekretion für die Verteilung und Funktion im Wirt wichtig ist. Die Lokalisation von PefD ohne Signalpeptid unter dem *eft-3* Promotor zeigte kein einheitliches Lokalisationsmuster, was durch die ubiquitären Promotoren in *C. elegans* entstehen kann, die häufig zu ungleichmäßigen, mosaikförmigen Expressionsmustern führen. Auch die Verwendung des Hitzeschock Promotors erschwert die Beobachtung eines Phänotyps, da ein Hitzeschock alleine schon Einfluss auf die Nematoden hat.

### **3.6 PefD beeinflusst das schlafaktive Neuron RIS und moduliert die Lokomotion von *C. elegans***

Heterologe Expression von *pefD* in den Neuronen von *C. elegans* führte zu einem Bewegungsphänotyp in den Nematoden. *PefD* exprimierende Nematoden wiesen eine signifikant langsamere Bewegung auf als der Wildtyp, was sich in der kürzeren zurückgelegten Wegstrecke und der verminderten Geschwindigkeit zeigte. Kontrollen mit neuronal exprimiertem CyrA oder NipA ohne Signalpeptid zeigten nur geringe Unterschiede in der Bewegung im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Molekularbiologie hinter diesem Phänotyp ist noch nicht vollständig geklärt. PefD könnte direkten Einfluss auf Neuronen haben, die die Bewegung steuern, könnte aber auch indirekt an der Signalweiterleitung an die Muskeln beteiligt sein. In *C. elegans* gibt es verschiedene Mutanten, die eine verlangsamte Lokomotion zeigen. Bekannt sind die *unc*-Mutanten (*uncoordinated*). Mutanten mit *unc-2* oder *unc-119* Deletionen zeigen ein verlangsamtes unkoordiniertes Bewegungsmuster. UNC-2 codiert für einen spannungsabhängigen Calciumkanal, welcher präsynaptisch in Motoneuronen lokalisiert. Durch Verlust oder Mutation von *unc-2* kommt es zu einem verminderten Ca<sup>2+</sup> Einstrom und damit verbunden zu einer verminderten Freisetzung von Neurotransmittern, was dazu führt, dass die Signalweiterleitung zu den Motoneuronen nicht mehr richtig funktioniert. Dadurch kommt es zu einer verlangsamten Lokomotion in den Nematoden (Mathews *et al.*, 2003; Schafer, 1995). Ein weiteres Gen, was bei Mutation oder Verlust zu einem verlangsamten fast Paralyse-ähnlichen Bewegungsphänotyp führt, ist *unc-119*. Auch hier liegen die Defekte, die diesen

Phänotyp auslösen, nicht primär an den Muskeln, sondern im Nervensystem. Dort kontrolliert es autonom das Axon-Branching. Mutationen in *unc-119* können zu exzessiven Verzweigungen innerhalb der Neuronen führen, auch in den Motoneuronen (Knobel *et al.*, 2001; Maduro and Pilgrim, 1995).

Die Nematoden werden nach dem Fangen paralytisiert. Allerdings ist noch nicht aufgeklärt, wie es zu dieser Paralyse kommt, ob es von den Nematoden ausgelöster Stress-induzierter Schlaf ist oder ob der Pilz durch Virulenzfaktoren die Paralyse auslöst oder ein Zusammenspiel beider Faktoren ist. Im Virulenzassay wurde gezeigt, dass PefD die Paralyse positiv beeinflusst, also eine Rolle bei der Paralyse gefangener Nematoden spielen muss. In einer Studie in *A. oligospora* konnte gezeigt werden, dass mit Einsetzen der Paralyse die schlaf-aktivierenden Neuronen RIS und ALA aktiviert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Neuronen durch mechanischen Stress und den EGFR-Signalweg aktiviert werden. Was genau aber die Signale sind, welche die Aktivierung der Neurone während dem Fangen durch den Pilz auslöst, bleibt unklar (Lin *et al.*, 2025). Dies führte zur Fragestellung, ob es nicht Virulenzfaktoren wie zum Beispiel PefD geben könnte, die die Paralyse durch Eingreifen in die neuronalen Kreise des Schlafes in *C. elegans* fördern. Dafür wurde die RIS-Aktivität in *pefD* neuronal exprimierenden Stämmen untersucht. Beide *pefD* exprimierende Stämme zeigten eine erhöhte Gesamtaktivität des RIS-Neurons an, was sich in einem erhöhten Mittelwert der normalisierten GCaMP Fluoreszenzintensität, einer größeren Anzahl an Aktivierungsevents (positiver Peak) und einer höheren Netto GCaMP-Aktivität, der effektiven Aktivität, gezeigt hat. Somit führt PefD zu einer Erhöhung der Aktivität des RIS-Neurons. Neben der Tatsache das RIS für den entwicklungsabhängigen Schlaf als auch den Stress-induzierten Schlaf essenziell ist, wurde auch eine weitere Funktion als Stopp-Neuron gefunden (Steuer Costa *et al.*, 2019; Trojanowski and Raizen, 2016; Turek *et al.*, 2013). In der Studie von Steuer Costa (2019) konnte gezeigt werden, dass die Ris Aktivität mit der Inhibierung der Bewegung korreliert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass RIS aktiv als Motorinhibitor wirkt. Durch Calciumanstieg im Neuron kommt es zur Freisetzung des Neurotransmitters GABA und dem Neuropeptid Flp-11. Die Kombination aus beiden führt zu einer Hemmung der motorischen Netzwerke, was in einem Bewegungsstopp resultiert. Dies könnte die beobachtete Reduktion der Geschwindigkeit und zurückgelegten Wegstrecke in *pefD* exprimierenden Neuronen erklären. Die hier gemessene erhöhte Gesamtaktivität von RIS, könnte ein direktes oder indirektes Eingreifen von PefD in die regulatorischen Signalwege, die zur

Aktivierung des RIS-Neurons führen, aufzeigen. Für RIS als eine spezifische neuronale Zielstruktur von PefD spricht, dass neuronal exprimiertes *cyrA* und *nipA* keinen Einfluss auf die Aktivität des RIS-Neurons haben. Die PefD-induzierte erhöhte Aktivität könnte jedoch eine doppelte Wirkung in *C. elegans* auslösen. Denn nicht nur Schlaf und Bewegungsstopp werden durch die Aktivierung des RIS-Neurons ausgelöst, sondern auch stressassoziierte Gene werden zum Schutz des Nematoden hochreguliert (Busack and Bringmann, 2023). Damit könnte PefD nicht nur die Bewegung inhibieren und zu einer längeren Paralyse beitragen, um dem Pilz die Penetration zu erleichtern, sondern auch Stress und Schutzmechanismen im Wirt aktivieren. Im Gegensatz dazu könnten die leichten Veränderungen bei NipA und CyrA ohne Signalpeptid eher unspezifischer Natur sein. Eine Akkumulation in den Neuronen könnte zu leichten Störungen oder Stress führen. Da aber keine RIS-Aktivität beobachtet werden konnte, spricht es gegen eine Veränderung des Schlafneurons, sondern eher für einen unspezifischen überexprimierten Effekt.

Durch was PefD den Effekt der erhöhten RIS-Aktivität auslöst, ist noch nicht bekannt. Die AlphaFold Vorhersage zeigt, dass PefD ein kompaktes kleines mit zwei Disulfidbrücken stabilisiertes Protein ist. Solche kleinen sekretierten cysteinreichen Proteine sind in Spinnen- und Schlangengift enthalten. Häufig sind in der Zusammensetzung des Giftes inhibitorische Cystin-Knot Peptide (ICK-Peptide) enthalten. Diese besitzen sechs Cysteine, welche Disulfidbrücken eingehen. Dabei bilden zwei Disulfidbrücken einen Ring, durch den die dritte Disulfidbrücke durchgeht und so einen Knoten bilden. Zusätzlich besitzen sie ein charakteristisches  $\beta$ -Faltblatt-Motiv. ICK-Peptide sind strukturell stabil und attackieren hauptsächlich das Nervensystem. Ein Beispiel sind die  $\omega$ -Agatoxine von Spinnen. Diese interagieren mit spannungsabhängigen Calciumkanälen. Ziel hierbei ist die muskuläre Paralyse durch Verhinderung des Calcium Eintritts und der Freisetzung von präsynaptischen Neurotransmittern (Escoubas, 2000). Bei PefD ist die charakteristische ICK-Struktur nicht vorhanden, da nur zwei Disulfidbrücken vorhanden sind. Obwohl PefD keine klassische ICK-Struktur aufweist, könnte seine disulfidstabilisierte Struktur dennoch funktionelle Parallelen zu solchen Mini Toxinen aufweisen. Ob PefD also Ionenkanäle verändern kann oder *upstream* in Signalwege eingreift, muss erst noch untersucht werden. Dazu könnten Mutanten in den Calciumkanälen auf Effekte der *pefD* Expression hin untersucht werden, es könnten auch Transkriptomanalysen gemacht werden, um mögliche Zielproteine oder Signalwege zu finden.

Interessanterweise führte die Expression von *pefD* ohne Signalpeptid unter Kontrolle des *hsp-16.48* Promotors in den Nematoden zu einer Neurodegeneration in den PVD-Neuronen. Dieser Effekt trat nicht auf, wenn *pefD* mit dem Signalpeptid exprimiert wurde. Dies zeigt, dass die zelluläre Lokalisation von PefD entscheidend für die Wirkung sein könnte. So könnte die sekretierte Form gezielt neuronale Signalwege angreifen, während die intrazelluläre Expression zu einer Ansammlung des Proteins führt und dadurch eine proteotoxische Belastung darstellt. Dies wiederum könnte zur Neurodegeneration in den PVD-Neuronen führen.

Im Kontext des Infektionsprozesses ist die Manipulation eines schlafinduzierenden Neurons evolutionär plausibel. Eine Immobilisierung des Wirtes hilft dem sessilen Pilz mit der Penetration und erleichtert die Kolonisation. Da die Deletion von PefD die Pathogenität nicht vollständig reduziert, wird PefD durch Eingreifen in die Paralyse zu einem effizienteren Fang- und Kolonisierungsevent beitragen.

### **3.7 Die Rolle des PDI1 Homologs in *A. flagrans***

Protein-Disulfid-Isomerasen sind Enzyme, welche wichtig für die Proteinfaltung im ER sind, indem sie die Bildung, Umlagerung und Reduktion von Disulfidbrücken katalysieren und damit für die korrekte Faltung der sekretierten cysteinreichen Proteine sorgt (Hatahet and Ruddock, 2009; Wilkinson, 2004). Auch *A. flagrans* produziert viele cysteinreiche kleine sekretierte Proteine während der Infektion, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert werden (Kim *et al.*, 2016). Die Ausbildung dieser Disulfidbrücken findet im ER statt, somit könnte die PDI dabei eine Rolle spielen. Bisher wurden in NFP keine PDIs identifiziert und untersucht.

Daher wurde zunächst mittels einer BLAST-Suche nach PDI-ähnlichen Proteinen im Genom von *A. flagrans* gesucht. Unter Verwendung von PDI1 aus *S. cerevisiae* als Referenzgen konnten sechs Homologe identifiziert werden. Die Analyse der Domänenstruktur zeigte, dass diese Proteine unterschiedlich aufgebaut sind. Nur DFL\_002885 wies die klassische a-b-b'-a' Domänenstruktur einer PDI mit zwei aktiven CXXC-Motiven in den katalytisch aktiven a und a' Domänen auf. Die übrigen Homologe zeigen eine verkürzte oder modifizierte Domänenstruktur auf. Solche Abweichungen von der klassischen Struktur wurden innerhalb der PDI-Familie beschrieben (Hatahet and Ruddock, 2009). Neben der passenden Domänenstruktur weist DFL\_002885 auch noch ein Signalpeptid am N-Terminus und ein ER-

Retentionssignal am C-Terminus auf. In einer phylogenetischen Analyse gruppierte DFL\_002885 eng mit den PDI1-Proteinen anderer Ascomyceten und auch der PDI1 von *S. cerevisiae*. Nicht nur die Domänenstruktur, sondern auch die phylogenetische Analyse zeigen, dass DFL\_002885 wahrscheinlich das funktionelle PDI1-Homolog in *A. flagrans* ist.

Eine mögliche Rolle von PDI während der Infektion konnte in den phytopathogenen Pilzen *M. oryzae* und *Fusarium graminearum* gezeigt werden. MoPDI1 aus *M. oryzae* ist wichtig für die Virulenz, indem es hilft das von der Pflanze gebildete ROS abzufangen. Zudem beeinflusst MoPDI1 die Lokalisation des zytoplasmatischen Effektors AVR-Pia. In einem Deletionsstamm von MoPDI1 lokalisierte der Effektor nicht mehr im BIC (Wang *et al.*, 2025a). Auch in *F. graminearum* wurde eine Disulfidbrücken Isomerase FgEps1 identifiziert, welche bei der Infektion des Wirtes eine Rolle spielt. FgEps1 wird während der Infektionsphasen exprimiert und führt bei Deletion zu einer reduzierten Pathogenität und einer Beeinträchtigung der DON Toxin Biosynthese im Pilz (Liu *et al.*, 2023).

Daher scheint es auch eine Möglichkeit zu sein, dass auch in *A. flagrans* PDI und damit einhergehend die Faltung im ER eine Rolle während der Infektion spielen. Expression der *pdi1* von *A. flagrans* zeigte eine leichte Hochregulation im induzierten Zustand. Allerdings zeigt auch die Analyse der Promotoraktivität, dass *pdi1* nicht nur in Infektionsstrukturen, sondern auch im uninduzierten Myzel aktiv ist. Dieses Expressionsmuster spricht dafür, dass PDI1 aus *A. flagrans* eine allgemeine zelluläre Funktion hat, die in allen Stadien benötigt wird. Gleichzeitig wird sie während der Infektion leicht hochreguliert, da dort dann vermehrt sekretierte Proteine produziert werden. In NFP werden während der Infektion viele verschiedenen Gene, welche mit der Virulenz in Verbindung stehen, hochreguliert, unter anderem auch die kleinen sekretierten Effektorproteine (Andersson *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016).

Subzelluläre Lokalisation des PDI1-Proteins von *A. flagrans* bestätigt die Interpretation, dass PDI1 eine allgemein wichtige Rolle hat. PDI1-GFP lokalisiert in ER-ähnlichen Strukturen innerhalb der Hyphen, Fallen und trophischen Hyphen in der Nähe der Zellkerne. Diese Lokalisation stimmt mit dem Vorhandensein eines ER-Retentionssignals überein. Diese Lokalisation konnte auch für PDIs anderer Pilze beobachtet werden, wie bei MoPDI1 aus *M. oryzae* (Wang *et al.*, 2025a). Da die ER-Lokalisation auch während der Infektion im ER zu sehen ist, spielt sie als Faltungsprotein und Qualitätskontrolle eine wichtige Rolle während der Infektion.

Zur funktionellen Analyse von PDI1 in *A. flagrans* wurde mittels homologer Rekombination das *pdi1*-Gen deletiert. Der Deletionsstamm zeigte im Vergleich zum Wildtyp ein verlangsamtes Wachstum auf PDA-Platten. Zudem konnte er auf LNA keine Fallen mehr bilden. Da bei beiden Prozessen Proteine sekretiert werden, könnte Verlust von PDI zu Fehlfaltung und unstabilen Proteinen führen und dadurch das Wachstum und die Fallenbildung beeinträchtigen (Conesa *et al.*, 2001; Peberdy, 1994).

Allerdings sollte hierbei berücksichtigt werden, dass die Verifizierung des Deletionsstammes nicht vollständig eindeutig war. Während bei der analytischen PCR die Hygromycin-Kassette in der Deletionsmutante amplifiziert werden konnte, aber nicht der *pdi1*-ORF, was auf eine Integration der Hygromycinresistenzkassette spricht, so zeigte die Southern Blot Analyse Banden mit nicht erwarteten Größen an. Die Fragmente waren sowohl beim WT als auch der Deletionsmutante zu hoch. Solche Abweichungen können vielleicht durch zusätzliche Restriktionsschnittstellen im Genom oder durch einen partiellen Restriktionsverdau entstehen. Zur eindeutigen Bestätigung der Deletion sollte der Southern Blot mit einer neuen Sonde oder einem neuen Restriktionsenzym wiederholt werden, und der Deletionsstamm rekomplementiert werden. Trotzdem zeigen die Ergebnisse, dass PDI1 eine wichtige Rolle während der Infektion in *A. flagrans* spielt, jedoch nicht als Virulenzfaktor per se sondern als unterstützender Faktor. Gerade in der Infektion werden viele sekretierte Proteine produziert, die durch die PDI dann stabilisiert und richtig gefaltet werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass DFL\_002885 das PDI1-Homolog von *A. flagrans* ist und mit der Funktion der Disulfidbrückenbildung, -umlagerung und -reduktion als unterstützender Faktor im Infektionsprozess eine wichtige Rolle spielt.

Zukünftige Arbeiten könnten durch Interaktionsstudien zeigen, welche spezifischen Proteine von der PDI abhängig sind. Ebenso könnte untersucht werden, ob PDI1 an der Disulfidbrückenbildung von Virulenzfaktoren und somit an ihrer Lokalisation beteiligt ist. Dazu müsste die PDI nicht vollständig deletiert werden, sondern nur in ihrer Aktivität eingeschränkt werden, indem man eventuell eines der zwei aktiven CXXC-Motive mutiert oder sie unter einem induzierbaren Promotor exprimiert, damit die Infektionsstrukturen für die Lokalisation der Effektoren noch gebildet werden können.

### 3.8 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Effektor PefD eine Rolle bei der Beeinflussung neuronaler Prozesse in *C. elegans* spielen könnte. Die Ergebnisse charakterisieren das schlafaktive RIS-Neuron als ein mögliches Ziel für PefD, wodurch die Paralyse gefangener Nematoden positiv beeinflusst wird. Damit wird das Verständnis pilzlicher Virulenzmechanismen in NFP um eine neue Wirkweise von Effektoren, die gezielt neuronale Schaltkreise manipulieren, um die Paralyse und damit das Fangen der Beute zu beeinflussen, erweitert.

Neben PefD wurde in dieser Arbeit auch noch das PDI1-Homolog in *A. flagrans* identifiziert und untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PDI als zentrale Komponente der Proteinfaltung und mit ihrer Funktion zur Disulfidbrückenbildung eine wichtige Rolle während der Proteinfaltung sekretierter Proteine im Infektionsprozess hat. Es könnte sein, dass PDI1 indirekt zur Virulenz beiträgt, indem es die korrekte Faltung der sekretierten Proteine ermöglicht, welche für die Ausbildung der Fallen und generell der Pathogenität wichtig sind.

Zukünftige Arbeiten könnten sich mit der Identifikation von Interaktionspartnern für PefD beschäftigen, damit der molekulare Wirkmechanismus, der zur erhöhten RIS-Aktivität führt, genauer charakterisiert werden kann. Auch für PDI sollten Interaktionspartner identifiziert werden, um herauszufinden, ob bestimmte sekretierte Effektoren von der Disulfidbrückenbildung der PDI abhängig sind.

Insgesamt liefert die Studie neue Einblicke in die molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen und eröffnet neue Perspektiven für die pilzlichen Virulenzmechanismen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Materialien, Geräte und Chemikalien

Sofern nicht anders im Text erwähnt, stammen die verwendeten Chemikalien von folgenden Unternehmen: Macherey-Nagel (Düren), Wako-Chemicals (Neuss), Biozym (Hamburg), Sigma-Aldrich (Selze), Applichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), 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).

Die verwendeten Kits sind in Tabelle 1 gelistet und die verwendeten Geräte in Tabelle 2.

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Kits mit Verwendung und Hersteller.**

Kit	Verwendung	Hersteller
DIG Probe Synthesis Kit	Synthese von DIGSonden für Southern-Blot Analysen	Roche
Luna One-Step RT-qPCR Kit	qRT-PCR	New England Biolabs GmbH
NucleoSpin®Plasmid EasyPure	Plasmid-DNA-Präparation	Macherey-Nagel
TURBO DNA-free™ Kit	DNA-Verdau	Invitrogen AG
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gel	Zymo Research

**Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Geräte mit Hersteller und Typ.**

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	3870ELV	Tuttnauer (Breda)
Detektionssystem	Amersham™ ImageQuant™ 800 biomolecular imager	Cytiva (Uppsala, Schweden)
Geldokumentationssysteme	FastGene® FAS-V Imaging System	NIPPON Genetics EUROPE GmbH (Düren)

Gelelektrophorese	Mupid-ex U Elektrophoresis System Mupid-One Elektrophoresis System	NIPPON Genetics EUROPE GmbH (Düren)
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Hybridisierungs-Ofen	UVP HB-1000 Hybridizer	UVP, LLC; (California, USA)
Inkubatoren	Infors HT Minitron Schüttelinkubator Innova® 44	Infors AG (Bottmingen, Schweiz) News Brunswick Scientific Co., Inc. (Edison, NJ, USA)
	Standard Inkubator BD Linie INCU-Linie 250R	Binder GmbH (Tuttlingen) VWR International GmbH (Darmstadt)
Magnetrührer	MR Hei-Mix S	Heidolph (Schwabach)
Mikroinjektor	FemtoJet4i	Eppendorf, (Hamburg)
Mikroskope	Eclipse (C-S) E200	Nikon (Düsseldorf)
	Axio Imager Z1 LSM 900	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
	Axio Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
	SteREO Lumar. V12	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
	SteReo Lumar. V8	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
Yokogawa Spinning Disc CSU-X1	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)	

Reinraumbank	Maxisafe 2020	Fisher Scientific (Schwerte)
Rollenmischer	Kipp-/Rollenmischer RS- TR 05 Phoenix Instrument GmbH (Garbsen) Rollenmischer Assistent RM 5 Typ 348	Phoenix Instrument GmbH (Garbsen) Karl Hecht KG (Sondheim)
Schüttler	Kleinschüttler KM Swip  Vortex-Genie® 1 Touch Mixer	Edmund Bühler (Bodelshausen) Scientific Industries, Inc. (Bohemia, New York)
Spectrophotometer	NanoDrop® Spectrophotometer ND- 1000	NanoDrop Technologies (Wilmington, DE United States)
Stratalinker	BLX-E254	Peqlab Biotechnologie GmbH
Thermocycler	Labcyler CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Sensoquest (Göttingen) Bio-Rad (Feldkirchen)
Zentrifugen	AccuSpin Micro 17  Biofuge 13  Eppendorf Centrifuge 5415R Microzentrifuge Micro Star 17R Zentrifuge Universal 320R	Fisher Scientific (Schwerte) Heraeus® Sepatech (Hanau) Eppendorf (Hamburg)  VWR International GmbH (Darmstadt) Hettich (Tuttlingen)

## Antibiotika

Ampicillin Stammlösung: 100 mg/ml

Hygromycin Stammlösung: 100 mg/ml

Geneticin Stammlösung: G418: 50 mg/ml

Nourseothricin Stammlösung: 100 mg/ml

## 4.2 Verwendete Organismen und Vektoren

Die verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 3, die *A. flagrans* Stämme in Tabelle 4, die *C. elegans* Stämme in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 3: Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme. Für die Klonierung der Plasmide wurde der chemisch kompetente Stamm Top10 benutzt. Der Stamm OP50 wurde für die Kultivierung von *C. elegans* benutzt.**

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
Top 10	F- <i>mcrA</i> <sub>-(mrr- hsdRMSmcrBC)</sub> _80 <i>lacZ</i> _M15 _lacX74 <i>recA1</i> <i>araD139</i> _( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galk</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Amp <sup>R</sup>	Invitrogen (Karlsruhe)
OP50	<i>ura-</i>		Institut für Biologie III, Bioinformatik und Molekulargenetik (Freiburg)

**Tabelle 4: Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten *A. flagrans* Stämme.**

Stamm	Genotyp	Resistenz	Herkunft
Wildtyp	-	-	CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (Utrecht)

sAK13	<i>olic(p)::2885::GFP</i> pAK48	Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK14	$\Delta$ 2885 pAK46	Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK15	<i>gpdA(p)::pefD::LccC<math>\Delta</math>SP</i> pXD19	Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK17	<i>gpdA(p)::pefD<math>\Delta</math>SP::LccC<math>\Delta</math>SP</i> pAK55	Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK18	sXD35 x <i>pefD(p)::pefD::pefD(t)</i> pAK74	Hyg <sup>R</sup> , g418 <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK19	sVW10 x <i>pefD(p)::h2B::mCherry</i> pXD17	Hyg <sup>R</sup> , g418 <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK22	sVW10 x <i>2885(p)::h2B::mCherry</i> pAK53	Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK21	<i>pefD(p)::pefD::mCherry</i> pXD41	G418 <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK23	sXD35 x <i>pefD(p)::pefD::GFP</i> pAK65	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK24	sAK13 x <i>h2B(p)::h2B::mCherry::g418R::RB(h2B)</i> pAK74	Hyg <sup>R</sup> , g418 <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK25	<i>oliC(p)::SP(pefD)::GFP::gluc(t)</i> pAK67	Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sAK26	<i>oliC(p)::pefD<math>\Delta</math>SP::GFP::gluc(t)</i> pAK68	Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
sVW10	<i>h2b(p)::h2b::GFP</i> pJW04	g418 <sup>R</sup>	(Wernet <i>et al.</i> 2021b)
sXD24	<i>olic(p)::pefD::GFP</i> pXD33	Hyg <sup>R</sup>	(Hu, 2022)
sXD26	<i>pefD(p)::pefD::GFP</i> pXD32	Hyg <sup>R</sup>	(Hu, 2022)
sXD28	sNH30 x <i>pefD(p)::pefD::mCherry</i> pXD41	Hyg <sup>R</sup> , g418 <sup>R</sup>	(Hu, 2022)
sXD30	sXD26 x <i>nipA(p)::nipA::mCherry</i> pJM16	Hyg <sup>R</sup> , g418 <sup>R</sup>	(Hu, 2022)
sXD33	<i>olic(p)::pefD::gluc(t)</i> pXD52	Hyg <sup>R</sup>	(Hu, 2022)
sXD35	$\Delta$ <i>pefD</i> pXD42	Hyg <sup>R</sup>	(Hu, 2022)

Tabelle 5: Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten *C. elegans* Stämme.

Stamm	Genotyp	Marker	Herkunft
N2	-	-	Institut für Biologie III; Bioinformatik und Molekulargenetik, Freiburg
CeAK16	N2 x <i>eft-3(p)::pefD::wormScarlet::unc-54 3'UTR</i> pAK42	<i>myo-2(p)::GFP</i>	Diese Arbeit

CeAK17	N2 x <i>rab-3(p)::pefD::unc-54 3'UTR</i> pAK62	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	Diese Arbeit
CeAK18	N2 x <i>rab-3(p)::pefDΔSP::unc-54 3'UTR</i> pAK63	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	Diese Arbeit
CeAK21	N2 RIS x <i>rab-3(p)::cyrA::unc-54 3'UTR</i> pAK80	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	Diese Arbeit
CeAK22	N2 RIS x <i>rab-3(p)::nipAΔSP::unc-54 3'UTR</i> pAK77	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	Diese Arbeit
CeAK23	N2 RIS x <i>rab-3(p)::nipA::unc-54 3'UTR</i> pAK78	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	Diese Arbeit
CeAK24	N2 RIS x <i>rab-3(p)::cyrAΔSP::unc-54 3'UTR</i> pAK79	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	Diese Arbeit
CeAK25	N2 x <i>hsp-16.46(p)::pefD::wormScarlet::unc-54 3'UTR</i> pAK60	<i>myo-2(p)::GFP</i>	Diese Arbeit
CeAK26	N2 x <i>hsp-16.46(p)::pefDΔSP::wormScarlet::unc-54 3'UTR</i> pAK57	<i>myo-2(p)::GFP</i>	Diese Arbeit
CeAK28	N2 x <i>eft-3(p)::pefDΔSP::wormScarlet::unc-54 3'UTR</i> pAK56	<i>myo-2(p)::GFP</i>	Diese Arbeit
CeAK30	N2 RIS x <i>rab-3(p)::pefD::unc-54 3'UTR</i> pAK62	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	Diese Arbeit
CeAK31	N2 RIS x <i>rab-3(p)::pefDΔSP::unc-54 3'UTR</i> pAK63	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	Diese Arbeit
CeAK32	NC1686 x <i>hsp-16.46(p)::pefD::wormScarlet::unc-54 3'UTR</i> pAK60	<i>myo-2(p)::GFP</i>	Diese Arbeit
CeAK33	NC1686 x <i>hsp-16.46(p)::pefDΔSP::wormScarlet::unc-54 3'UTR</i> pAK57	<i>myo-2(p)::GFP</i>	Diese Arbeit
CeAK34	NC1686 x <i>hsp-16.46(p)::wormScarlet::unc-54 3'UTR</i> pNH59	<i>myo-2(p)::GFP</i>	Diese Arbeit
NC1686	wdIs51 F49H12.4::GFP + <i>unc-119(+)</i>		CGC
N2 RIS	N2 x <i>flp-11::GCamP6</i> pPS01	<i>myo-2(p)::tdTomato</i>	(Steudel, 2022)

Die verwendeten Plasmide und die zur Klonierung verwendeten Primer sind in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt.

**Tabelle 6: Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide.**

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
pJET1.2	<i>rep</i> (pMB1), Amp <sup>R</sup> , <i>eco47IR</i> , P <sub>lacUV5</sub> ::multiple cloning site (MCS)::insertion site ::T7 Promotor	Amp <sup>R</sup>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham Massachusetts USA)
pAK42	<i>eft-3(p)</i> : : <i>pefD</i> :: <i>wrmScarlet</i> :: <i>unc-54</i> 3'UTR	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK46	<i>LB</i> (2885), <i>trpC(p)</i> :: <i>hph</i> :: <i>trpC(t)</i> , <i>RB</i> (2885)	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK47	<i>2885(p)</i> :: <i>2885</i> :: <i>GFP</i> :: <i>tgluc</i>	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK48	<i>oliC(p)</i> :: <i>2885</i> :: <i>GFP</i> :: <i>tgluc</i>	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK53	<i>2885(p)</i> :: <i>h2B</i> :: <i>mCherry</i> :: <i>Ttub</i>	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK55	<i>gpdA(p)</i> :: <i>pefD</i> Δ <i>SP</i> :: <i>LccC</i> Δ <i>SP</i>	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK56	<i>eft-3(p)</i> :: <i>pefD</i> Δ <i>SP</i> :: <i>wrmScarlet</i> :: <i>unc-54</i> 3'UTR	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK57	<i>hsp-16.46(p)</i> :: <i>pefD</i> Δ <i>SP</i> :: <i>wrmScarlet</i> :: <i>unc-54</i> 3'UTR	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK60	<i>hsp-16.46(p)</i> :: <i>pefD</i> :: <i>wrmScarlet</i> :: <i>unc-54</i> 3'UTR	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK62	<i>rab-3(p)</i> :: <i>pefD</i> :: <i>unc-54</i> 3'UTR	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK63	<i>rab-3(p)</i> :: <i>pefD</i> Δ <i>SP</i> :: <i>unc-54</i> 3'UTR	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK65	<i>pefD(p)</i> :: <i>pefD</i> :: <i>GFP</i>	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK67	<i>oliC(p)</i> :: <i>SP(pefD)</i> :: <i>GFP</i> :: <i>tgluc</i>	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK68	<i>oliC(p)</i> :: <i>pefD</i> Δ <i>SP</i> :: <i>gfp</i> :: <i>tgluc</i>	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK74	<i>h2B(p)</i> :: <i>h2B</i> :: <i>bcmCherry</i> :: <i>gpdA(p)</i> :: <i>g418</i> :: <i>trpC T</i> :: <i>RB(h2B)</i>	Amp <sup>R</sup> , <i>g418</i> <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK77	<i>rab-3(p)</i> :: <i>nipA</i> Δ <i>SP</i> :: <i>unc-54</i> 3'UTR	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK78	<i>rab-3(p)</i> :: <i>nipA</i> :: <i>unc-54</i> 3'UTR	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pAK79	<i>rab-3(p)</i> :: <i>cyrA</i> Δ <i>SP</i> :: <i>unc-54</i> 3'UTR	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit

pAK80	<i>rab-3(p)::cyrA::unc-54 3'UTR</i>	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pXD17	<i>pefD(p)::h2B::mCherry::Ttub</i>	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Hu, 2022)
pXD19	<i>gpdA(p)::pefD::LccCΔSP</i>	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Hu, 2022)
pXD74	<i>pefD(p)::pefD::pefD(t)</i>	Amp <sup>R</sup> , g418 <sup>R</sup>	(Hu unveröffentlich t)

**Tabelle 7: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide dargestellt in 5`->3` Richtung.**

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
unc_sec_rev	AGCACAGGGAGAAAGAGCAT	Sequenzierung
TgluC_fwd	CGTATGTAGATAAGATGTATGATT	Backbone Amplifikation
trpCT_rev	TGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	Backbone Amplifikation
gfp_noATG_fwd	GTTTCCAAGGGTGAGGTAAG	Backbone Amplifikation
mCherry_fwd	GTAAGCAAGGGCGAGGTAA	Backbone Amplifikation
pJM10_rev	GAATTCACTGGCCGTCGTTT	Backbone Amplifikation
hph_kass_fwd/trp C(p) fwd	AAGTGTAATGCTAGTGGAGGT	Amplifikation Hygromycinresi stenzkassette
hph_kass_rev/trp C(T)_rev	TGGGGGGAGTTTAGGGAAA	Amplifikation Hygromycinresi stenzkassette
unc- 54_3UTR_fwd	GAGCTCCGCATCGGCCGC	Backbone Amplifikation
wrmscarlet_rev	CTTGTAGAGCTCGTCCATTCTC	Backbone Amplifikation
df_h2b_fwd	ATGCCACCAAAGCCGCC	Backbone Amplifikation
olic(p)_2_rev	GGTTGGATCGATTGTGATGTGAT	Backbone Amplifikation
TrpC_term_for	AGTAGATGCCGACCGATCC	Backbone Amplifikation
PoliC_seq_fw	CGTATTTAGGTGCTAGGGC	Sequenzierung
bcGFP_mid_rev	TTGGAACGACGCCAGTGAA	Sequenzierung
TgluC_seq_rev	CTCCACAAGGGTCCATGC	Sequenzierung
Age1_pefD_fwd	ACCGGTATGGTAGCAATTCCC	<i>pefD</i> Amplifikation aus cDNA für <i>C.</i> <i>elegans</i> Expression
Age1_pefD_noSP_ fw_neu	ACCGGTATGGCAGATATTGACTGCGAA AAGA	<i>pefD</i> ohne SP Amplifikation

		aus cDNA für <i>C. elegans</i> Expression
pefD_OL_unc543' UTR_rev	GACAGCGGCCGATGCGGAGCTCCTGCA GGTTCTTCTTGCACTGCTCCTC	<i>pefD</i> Amplifikation aus cDNA für <i>C. elegans</i> Expression
OL_pPF37BB_eft- 3(p)_fwd	GGATAACAATTTACAGGGCCCGCACC TTTGGTCTTTTATTGTCA	<i>eft-3</i> Promotor Amplifikation aus <i>C. elegans</i> für <i>pefD</i> Expression
eft- 3(p)_OL_pefD_rev	AAAACGAATGAGATCTTCATACCGGTGA GCAAAGTGTTTCCCAACTGAA	<i>eft-3</i> Promotor Amplifikation aus <i>C. elegans</i> für <i>pefD</i> Expression
eft- 3(p)_OL_pefDnoS P_rev	TAGAGGGAATTGCTACCATACCGGTGA GCAAAGTGTTTCCCAACTGAA	<i>eft-3</i> Promotor Amplifikation aus <i>C. elegans</i> für <i>pefD</i> Expression
qPCR_dfl_002885 fwd	CAAGAACAACCTTGTCTTGC	qRT-PCR
qPCR_dfl_002885 rev	CACCGTATGGGGAGGGG	qRT-PCR
qPCR- dfl_003235_fwd	CAAAGTCACTGTCGTCGACTT	qRT-PCR
qPCR- dfl_003235_rev	GGATTGGCGCCGACGAC	qRT-PCR
qPCR- dfl_004145_fwd	CTGCCAGGCGGTACTGC	qRT-PCR
qPCR- dfl_004145_rev	TTCCAGAGAAGGAGCCTCG	qRT-PCR
qPCR- dfl_004795_fwd	CCCTCGATGCCATGACCAA	qRT-PCR
qPCR- dfl_004795_rev	GGCGAAGGTTGTTGCCAGT	qRT-PCR
qPCR- dfl_007768_fwd	CCTAAGCTACGAAATGCAAGG	qRT-PCR
qPCR- dfl_007768_rev	TTGGATCTCCTCAAAGTCAGC	qRT-PCR
qPCR- dfl_007810_fwd	GTACCACTATCGTTGTGATCG	qRT-PCR
qPCR- dfl_007810_rev	CACCTTTGATGCGGGTTGTTT	qRT-PCR
qpcr_hk_actin2_f wd	TCCAGACTGCCTCCCAGT	qRT-PCR Haushaltsgen <i>A. flagrans</i>

qpcr_hk_actin2_rev	AGGTCTTTTCTGACGTCGAC	qRT-PCR Haushaltsgen <i>A. flagrans</i>
OL_eft-3p_pefD_fwd	AGTTGGGAAACACTTTGCTCACCGGTAT GAAGATCTCATTTCGTTTTTCGC	<i>pefD</i> Amplifikation aus cDNA für Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>eft-3</i> Promotor
OL_eft-3p_pefDnoSP_fwd	CAGTTGGGAAACACTTTGCTCACCGGTA TGGTAGCAATTCCCTCTACTC	<i>pefD</i> ohne SP Amplifikation aus cDNA für Expression in <i>C. elegans</i> unter <i>eft-3</i> Promotor
5559ko_up_for_n	CTACCAAACCTTCGAAGAAGG	analytische PCR
5559ko_down_rev_nn	GAGCCCTCAATATTTCTGTAC	analytische PCR
OL_pJET1.2_LB-2885_fwd	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATTCT CATAATCTAGCATCCGCG	Dfl_002885 (PDI) Deletion
LB-2885__OL_trpCP_rev_new	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTCTT GATTGGTATGTGGGGGTA	Dfl_002885 (PDI) Deletion
OL_trpcT_RB-2885_fwd	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAACG AAATAAAATAATCCGAGAAAAG	Dfl_002885 (PDI) Deletion
RB-2885_OL_pJET1.2_rev_new	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATAAA TATATGGCAATGTACGTACC	Dfl_002885 (PDI) Deletion
ORF_2885_fwd	ATGCATTTCGAAACAGATTCTTCTG	analytische PCR
ORF_2885_rev	TTACAATTCATCGTGCTTAGTGG	analytische PCR
OL_trpcT_2885P_fwd	TTCCCTAAACTCCCCCACTGCAGATG TTCAAACCTGGTGTGGGAG	Amplifikation dfl_002885 mit Promotor für GFP-Fusion
2885ORF_OL_gfp_rev	GATTACTTACCTCACCTTGGAAACCAA TTCATCGTGCTTAGTGGAC	Amplifikation dfl_002885 mit Promotor für GFP-Fusion
OL_olicp_2885_fwd	CATCACATCACAATCGATCCAACCATGC ATTCGAAACAGATTCTTCTG	Amplifikation dfl_002885 ORF für GFP- Fusion unter <i>olic(p)</i>
OL_pefD_unc54 3UTR_fwd	GTTTGAGGAGCACTGCAAGAAGAACCT GCAGGAGCTCCGCATCGGCCGC	Backbone Amplifikation

pefD_OL_unc54 3 UTR_rev	GCGGCCGATGCGGAGCTCCTGCAGGTTCTTCTTGCAGTGCTCCTCAAAC	Backbone Amplifikation
eftP_mid_for	ACCGTCCGCACTCTTCTTA	Sequenzierung
OL_efiBB_2885P_fwd	GTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCATGTTCAAACCTGGTGTGGGAG	Amplifikation Promotor 2885 für Promotorfusion
2885P_OLh2b_rev	CTTTTCGGCGGCGGCTTTTGGTGGCATCTTGATTGGTATGTGGGGGTA	Amplifikation Promotor 2885 für Promotorfusion
bcCherry_mid_rev	TTCATGAACTCCTTGATAATGG	Sequenzierung
PefD_OL_Lacc_rev	GTCGTGCTCAAAGACCCAAGAACCGGTGTTCTTCTTGCAGTGCTCCTC	Amplifikation <i>pefD</i> für Laccase Assay
OL_pefDohneSP28_fwd	TGAGCAGACATCACAGGCGCGCCATGGCAGATATTGACTGCGAAAAGAC	Amplifikation <i>pefD</i> ohne SP für Laccase Assay
5559_RT_for	ATGAAGATCTCATTCGTTTTTCGC	qRT-PCR
5559_RT_rev	TAGTTCTTCTTGCAGTGCTCC	qRT-PCR
LccC_mid_rev	GTGTCAATGGCGCCGTTGA	Sequenzierung
pPF37_BB_rev	GGGCCCTGTGAAATTGTTATC	Backbone Amplifikation
OL_pPF37BB_rab3P_fw	AGCGGATAACAATTTACAGGGCCCGATCTTCAGATGGGAGCAGT	Amplifikation <i>rab-3</i> Promotor aus <i>C. elegans</i> für <i>pefD</i> Expression
rab3P_OL_pefD_rev	GAAAACGAATGAGATCTTCATACCGGTC TGAAAATAGGGCTACTGTAGA	Amplifikation <i>rab-3</i> Promotor aus <i>C. elegans</i> für <i>pefD</i> Expression
rab3P_OL_pefDdeltaSP_rev_neu	TCTTTTCGCAGTCAATATCTGCCATACCGTCTGAAAATAGGGCTACTG	Amplifikation <i>rab-3</i> Promotor aus <i>C. elegans</i> für <i>pefD</i> ohne SP Expression
OL_pPF37BB_hs16_fwd	ACCAGCGGATAACAATTTACAGGGCCCGCTGGACGGAAATAGTGGTAA	Amplifikation <i>hs-16.48</i> Promotor aus <i>C. elegans</i> für <i>pefD</i> Expression
hsp16_OL_pefD_rev	GGCGAAAACGAATGAGATCTTCATTTCTTGAAGTTTAGAGAATGAACAG	Amplifikation <i>hs-16.48</i> Promotor aus <i>C. elegans</i> für

		<i>pefD</i> Expression
hsp16_OL_pefDn oSP_rev_neu	TCTTTTCGCAGTCAATATCTGCCATTTCT TGAAGTTTAGAGAATGAAC	Amplifikation <i>hs-16.48</i> Promotor aus <i>C. elegans</i> für <i>pefD</i> ohne SP Expression
OL_pJet_h2b(P)_f wd	GCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGATCCG GAGAAGAAAGGAGCAAAATCG	Amplifikation Nourseothricin Resistenzkass ette
tubA(T)_OL_pefD( p)_rev	AGAGAACAGCAAAGGTCTTCGCTGCAG GGATCCAGACAGCCAATTGAAA	Amplifikation Nourseothricin Resistenzkass ette
oliC(P)_fwd	TGCAGCTGTGGAGCCGCA	Backbone Amplifikation
5559LB_for	CGAAGACCTTTGCTGTTCTC	Analytische PCR
OL_tubA(T)_Ascl_ 5559p_fwd	CAATTGGCTGTCTGGATCCGGCGCGCC CGAAGACCTTTGCTGTTCTCT	Amplifikation <i>pefD</i> für GFP- Fusion
5559_OL_pacl_gf p_rev	CACCCTTGGAACCATCTTAATTAAGTT CTTCTTGCAAGTGCCT	Amplifikation <i>pefD</i> für GFP- Fusion
rab3(p)_rev	CATGATTTATTTTAAAAGAGCATTTAGAT TAC	Backbone Amplifikation
OL_rab3P_pefDn oSP_fwd	CTAAATGCTCTTTTAAAATAAATCATGGC AGATATTGACTGCGAAAAG	Amplifikation <i>pefD</i> ohne SP aus cDNA für <i>C.</i> <i>elegans</i> Expression unter <i>rab-3</i> Promotor
pefD_OL_uncseq	TGATGACAGCGGCCGATGCGGAGCTCG TTCTTCTTGCAAGTGCCT	Amplifikation <i>pefD</i> ohne SP aus cDNA für <i>C.</i> <i>elegans</i> Expression unter <i>rab-3</i> Promotor
TubA(T)_fwd	ATATCTGATGTCATTCCTACTTTG	Sequenzierung
RB_pefD_fwd	GATACAGATTTTGTTAAACTGCGG	Southern Blot Analyse
RB_pefD_rev	TTAGAAGGCAGTCTTGACGGT	Southern Blot Analyse
2885_RB_fw	ACGAAATAAATAATCCGAGAAAAG	Southern Blot Analyse

RB_2885_rev_2	AAATATATGGCAATGTACGTACCAA	Southern Blot Analyse
OL_olic(p)_SPpefD_fwd	CCATCACATCACAATCGATCCAACCATG AAGATCTCATTCTGTTTTTCGC	Amplifikation SP von <i>pefD</i> für GFP-Fusion
SPpefD_OL_GFP_rev	GATTACTTACCTCACCCCTTGAAACTCT TTTGGACTGGAGTAGAGGG	Amplifikation SP von <i>pefD</i> für GFP-Fusion
OL_olic(p)_pefDwoSP_fwd	CCATCACATCACAATCGATCCAACCGCA GATATTGACTGCGAAAAGAC	Amplifikation <i>pefD</i> ohne SP für GFP-Fusion
pefDwoSP_OLgfp_rev	GATTACTTACCTCACCCCTTGAAACGTT CTTCTTGCAGTGCTCCTC	Amplifikation <i>pefD</i> ohne SP für GFP-Fusion
h2B_RB_fw	GCATTTGAAGTCTTTTTTGGTTCC	Backbone Amplifikation
bcmCherry_rev_mitStop	TTATTTGTAGAGTTCATCCATTCCA	Backbone Amplifikation
OL_mCherry_g418R_fw	TGGAATGGATGAACTCTACAAATAAGGT ATCTATTACATTGCATTGCG	Amplifikation g418 <sup>R</sup>
g418R_OL_h2bRB_rev	CGGAACCAAAAAAGACTTCAAATGCTGG GGGGAGTTTAGGGAAAG	Amplifikation g418 <sup>R</sup>
OL_rab3(p)_nipA_fwd	AAATCTACAGTAGCCCTATTTTCAGATG AAAGGCGCTATCCTCATTAT	Amplifikation <i>nipA</i> aus cDNA für <i>C. elegans</i> Expression unter <i>rab-3</i> Promotor
OL_rab3(p)_nipAnoSP_fwd	AAATCTACAGTAGCCCTATTTTCAGATG CCGACCTCCAAAATATGC	Amplifikation <i>nipA</i> ohne SP aus cDNA für <i>C. elegans</i> Expression unter <i>rab-3</i> Promotor
nipA_OL_unc54UTR_rev	GATGACAGCGGCCGATGCGGAGCTCCT AGGCTTCCTCGTCGGG	Amplifikation <i>nipA</i> aus cDNA für <i>C. elegans</i> Expression unter <i>rab-3</i> Promotor
OL_rab3(p)_cyrA_fwd	AAATCTACAGTAGCCCTATTTTCAGATG CAGCTCCTCAGCACTATC	Amplifikation <i>cyrA</i> aus cDNA für <i>C. elegans</i> Expression unter <i>rab-3</i> Promotor
OL_rab3(p)_cyrAnoSP_fwd	AAATCTACAGTAGCCCTATTTTCAGATG AACCCCAATGTATACGACTC	Amplifikation <i>cyrA</i> ohne SP aus cDNA für <i>C.</i>

		<i>elegans</i> Expression unter <i>rab-3</i> Promotor
cyrA_OL_unc54U TR_rev	GATGACAGCGGCCGATGCGGAGCTCTT AGTAGCACTTTTCGCACAAAGT	Amplifikation <i>cyrA</i> aus cDNA für <i>C. elegans</i> Expression unter <i>rab-3</i> Promotor

### 4.3 Molekularbiologische Methoden

#### PCR

Der PCR-Prozess besteht aus mehreren Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation.

Der erste Schritt ist die Denaturierung. Bei 98 °C wird die doppelsträngige DNA 5 min erhitzt, um die Wasserstoffbrücken aufzubrechen und einzelsträngige DNA zu erhalten. Bei der nachfolgenden Primerhybridisierung lagern sich die spezifischen Primer an die homologen Bereiche der einzelsträngigen DNA an. Dabei ist die Temperatur abhängig von der Länge und der Sequenz der Primer. Im letzten Schritt, der Elongationsphase, füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Nukleotide vom 3'-Ende des Primers auf und nutzt die einzelsträngige DNA als Template. Die Temperatur ist dabei abhängig vom Arbeitsoptimum der Polymerase. Die Dauer dieses Schrittes hängt von der Arbeitseffizienz der verwendeten Polymerase ab.

Die PCR wurde in Cyclern von Sensoquest durchgeführt und folgendes allgemeines Pipettierschema (**Tabelle 8**) verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Eurofins (Ebersberg) bezogen (**Tabelle 7**). Das PCR-Programm variiert je nach Länge des Amplikons und der Schmelztemperatur der Primer.

**Tabelle 8: Standardpipettierschema einer PCR-Reaktion mit Mengenangaben der einzelnen Komponenten für einen 50 µl Ansatz.**

Material	Menge in µl pro 50 µl
DNA-Template	1
Primer forward (10 µM)	2
Primer reverse (10 µM)	2
dNTPs	1

Q5-Reaktionspuffer	10
Q5 Polymerase	0,5
H <sub>2</sub> O	Auf 50 µl auffüllen

### **Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe wurde die Agarose Gelelektrophorese benutzt. Hierfür wurde ein 0,8 %iges Agarosegel hergestellt. Das feste Gel wurde anschließend in eine Gelelektrophoresekammer mit 0,5x TAE Puffer überführt (**Tabelle 9**). Die Proben wurden vor dem Beladen der Taschen mit 6x Ladepuffer versetzt. Das Gel wurde bei einer Spannung von 100 V für 20 min laufen gelassen. Als Größenstandard diente der 1 kb DNA-Marker von New England Biolabs. Um die DNA-Banden detektieren zu können, wurde das Gel auf einem Blaulichttisch angeschaut.

**Tabelle 9: Lösungen für die Gelelektrophorese.**

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung pro Liter</b>
50 x TAE Puffer	242,0 g 2,0 M Tris-Base 57,1 ml 2,0 M Essigsäure (99,7 %) 100,0 ml 10,0 % (v/v) 0,5 M EDTA pH 8,0 (Endkonzentration 50 mM)
0,8 % Agarose	8 g Agarose in 1000 ml 0,5 x TAE Puffer
6 x Ladepuffer	30 % Glycerol 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylene Cyanol FF Mit dH <sub>2</sub> O auffüllen

### **Gelaufreinigung**

Die passenden DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution und Aufreinigung aus dem Gel erfolgte durch das Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA). Die isolierte DNA wurde in destilliertem Wasser gelöst und anschließend wurde die Konzentration am Nanodrop Spektrophotometer gemessen.

## Klonierung von DNA-Fragmenten

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mittels homologer Rekombinationsreaktion in einen Plasmid-Vektor ligiert. Dabei hatten die PCR-Produkte überlappende komplementäre 25 bp lange Überhänge. Zu 15 µl Mastermix (**Tabelle 10**) wurden 50-100 ng/µl Vektor und die aufgereinigten PCR-Produkte im Verhältnis 1:3 in einem maximalen Volumen von 5 µl zum Mastermix hinzugegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert und 10 µl davon in *E.coli* Top10 (**Tabelle 3**) transformiert.

**Tabelle 10: Zusammensetzung des Mastermixes für die homologe Rekombinationsreaktion (Gibbson-Assembly).**

Reagenz	Konzentration
Iso-Buffer (5x)	26,6 % v/v
T5-Exonuclease (10 U/µl)	5,3 U/ml
Q5-Polymerase (2 U/µl)	33,3 U/ml
Taq Ligase (40 U/µl)	5333,3 U/ml
H <sub>2</sub> O	58,3 % v/v

## *E. coli* Trafo

Für die Transformation eines Plasmides in *E. coli* wurde die Hälfte des Ligationsansatzes zu 50 µl Aliquots chemisch-kompetenter *E. coli* Top10 gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Für die DNA-Aufnahme wurden die Zellen einem zweiminütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und sofort danach 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde danach auf eine LB-Agarplatte mit dem Selektionsmarker Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erfolgreiche Transformation wurde mittels Plasmid-Minipräparation und anschließendem Restriktionsverdau überprüft. Von den positiven Plasmiden wurde ein Glycerolstock angefertigt (1 ml *E. coli* Kultur, die das Plasmid trägt und 1 ml 50 %iges Glycerin), welche bei -80 °C gelagert werden.

## Plasmid DNA Präparation

Zur Kontrolle der Transformation in *E. coli*, wurde eine Plasmid-Präparation mit der Methode der alkalischen Lyse durchgeführt. Hierfür wurden über Nacht gewachsene Kolonien einzeln gepickt und in 3 ml flüssigem LB-Medium mit dem passenden

Selektionsmarker (Ampicillin) über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 ml der Übernachtskultur bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Zell-Suspensions-Puffer (**Tabelle 11**) resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl Zell-Lysis-Puffer (**Tabelle 11**). Nach mehrmaligem Invertieren der Proben wurde 200 µl 1,5 M Kaliumacetat-Puffer (**Tabelle 11**) dazugegeben, um die Proteine zu fällen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Proben 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, was zur Pelletierung der ausgefällten Proteine und Zelltrümmer führt. Der klare Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl kaltem 100 %igem Isopropanol überführt, um die DNA auszufällen. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 10 min und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C wurde das DNA-Pellet mit 500 µl kaltem 70 %igem Ethanol und 5 min Zentrifugation bei 13,000 rpm und 4°C gewaschen. Das Pellet wird bei 68 °C auf dem Heizblock getrocknet. Wenn das Pellet trocken ist, wurde es in 50 µl destilliertem Wasser unter leichtem Schütteln auf dem Heizblock gelöst.

#### Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Plasmid–DNA im analytischen Maßstab und Aufreinigung der Plasmide von positiven *E. coli* Klonen wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde in 50 µl destilliertem Wasser gelöst.

**Tabelle 11: Lösungen für die Präparation von Plasmid-DNA.**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung pro 200ml</b>
Mini Lösung 1: Zell-Suspensions-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA 100 µg/ml RNase A
Mini Lösung 2: Zell-Lysis-Puffer	0,2 M NaOH 1 % SDS
Mini-Lösung 3: Kaliumacetat (KAc)-Puffer	1,5 M KAc pH 4,8

#### **DNA-Restriktionsverdau**

Zur Kontrolle der Plasmid-DNA wird eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

Die zur Restriktion von DNA verwendeten Endonukleasen und Puffer stammen von der Firma NEB (New England Biolabs, Frankfurt). Das Endvolumen eines Ansatzes betrug 10  $\mu$ l. Dabei setzte sich der Reaktionsansatz aus folgenden Komponenten zusammen: 3  $\mu$ l Plasmid-DNA, 0,3  $\mu$ l Endonuklease, 1  $\mu$ l 10x Cut-Smart-Puffer und 5,7  $\mu$ l Wasser. In der Regel wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert. Und der Ansatz wurde anschließend auf ein Agarosegel geladen und das Bandenmuster überprüft.

### **Sequenzierung**

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch MWG-Eurofins (Ebersberg) mit der Kettenabbruch Methode.

### **Quantitative Real-Time PCR**

Um die Expression einzelner Gene zu testen, wurde eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Die qRT-PCR wurde mit dem Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (NEB) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktion wurde im iCycler iQ (Bio-Rad) durchgeführt. Die RNA wurde zuvor mit dem DNaseTurbo DNA free kit (Thermo Fischer) von DNA-Resten befreit. In einem Ansatz wurden 50 ng RNA verwendet. Als Haushaltsgen für die Expressionsanalysen in *A. flagrans* wurde das gamma-Aktin Gen (DFL\_002353) verwendet. Für ein Gen wurden biologische und technische Triplikate angefertigt. Die Expression wurde mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode berechnet.

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

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

### **Southern-Hybridisierung**

Zur Überprüfung von genetisch veränderten *A. flagrans* Stämmen wurden Southern Blot Analysen durchgeführt. Hierfür wurden 26  $\mu$ l der zuvor isolierten genomischen DNA in einem Ansatz von 30  $\mu$ l über Nacht bei 37 °C mit einem Restriktionsenzym verdaut, das in einem Bandenmuster resultiert, das sich von dem des Wildtyps unterscheidet. Nach dem Verdau wurden die Proben auf ein 0,8 %iges Agarosegel geladen und bei 100 V für 90 min aufgetrennt. Zum Sichtbarmachen der verdauten DNA wurde ein Midori Green Advance verwendet. Der 1 kb Größenstandard von NEB wurde verwendet. Nachdem die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat, wird der

Verdau der DNA anhand eines Schmiere unter Blaulicht kontrolliert. Der Größenstandard wird durch Durchstechen des Gels markiert. Zur Depurinierung wurde das Gel anschließend mit 0,25 M HCl für 30 Minuten gewaschen. Anschließend wurde es mit dH<sub>2</sub>O abgewaschen und 30 Minuten in Denaturierungspuffer und nochmal 30 Minuten mit Renaturierungspuffer gewaschen. Die DNA wird auf eine Nylonmembran (Nylon plus von Roth) mittels Kapillarkräften übertragen. Dafür wurde mit einem Whatmanpaper eine Salzbrücke über einem Tank mit 20 x SSC gebildet und anschließend das Gel und oben-drauf die Membran platziert. Mit einem Stapel Papiertüchern und einem Gewicht wurde ein Sog gebildet, sodass die DNA auf die Membran übertragen wird. Der Transfer fand über Nacht statt. Nach dem Transfer wurde der Größenstandard und die Gelposition auf der Membran mit einem spitzen Bleistift markiert. Die DNA wurde mittels UV auf der Membran fixiert. Anschließend wurde die Membran mit 40 ml Southern-Hybridisierungs-Puffer bei 65 °C für 30 min prähybridisiert. Für die Detektion der DNA auf der Membran wurde eine Digoxigenin-markierte DNA-Sonde verwendet. Die Sonde wurde nach Herstellerangaben des DIG Probe Synthesis Kits (Roche) hergestellt. Zur Aufreinigung der Sonde wurde die PCR auf ein Agarosegel geladen und die passende Bande ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde in Parafilm umwickelt, 20. Minuten bei -80 °C eingefroren und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß ausgedrückt. Zur Linearisierung wurde die Sonde in 1 ml Southern-Hybridisierungs-Puffer für 10 Minuten bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert. Die linearisierte Sonde wurde in 15 ml vorgewärmtem Southern-Hybridisierungs-Puffer gelöst und zur Membran hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C rotierend im Hybridisierungssofen. Am nächsten Tag wurde die Membran mit 2 x SSPE + 0,1 % SDS-Puffer bei 65 °C für 10 Minuten gewaschen, es folgte ein zweiter 10-minütiger Waschschrift mit 1 x SSPE + 0,1 % SDS-Puffer und ein letzter mit 0,1 x SSPE + 0,1 % SDS-Puffer. Die nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur im Hybridisierungssofen durchgeführt. Die Membran wurde mit 20 ml DIG-Wash Puffer für 5 Minuten gewaschen. Nach der Entfernung aller Flüssigkeit wurde die Membran für 30 Minuten in 25 ml DIG2 geblockt, um die freien DNA-Stellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit dem in DIG2 1:10000 verdünntem DIG-Antikörper für genau 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Antikörper wurde die Membran zweimal mit je 50 ml DIG-Wash für 15 Minuten gewaschen und einmal mit 40 ml DIG3 für 5 Minuten. Zur Entwicklung und Detektion der DNA wurde die Membran mit 2 ml CDP-Star Lösung inkubiert und im Amersham™ ImageQuant™

800 *biomolecular imager* (Cytiva) entwickelt. Bei Bedarf wurde die Sonde von der Membran durch Stripping Puffer und Inkubation bei 37 °C entfernt. Anschließend konnte die Membran erneut prähybridisiert werden. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12: Lösungen für die Southern Hybridisierung.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung für 1l</b>
0,25 M HCl	20,7 ml HCl (37 %) in dH <sub>2</sub> O
Denaturierung-Puffer	87,6 g/l NaCl (1,5 M) 16 g/l NaOH (0,4 M)
Renaturierung-Puffer	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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (1 M) Lösung 2: 156,01 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (1 M) 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 7,4 g/l Na <sub>2</sub> -EDTA x 2H <sub>2</sub> O pH 7,4 mit NaOH einstellen
DIG1	11,61 g/l Maleinsäure 8,77 g/l NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen

DIG Wash	0,3 % (v/v) Tween-20 in DIG1
DIG2	5 % Milchpulver in DIG1
DIG3	5,84 g/l NaCl 10,17 g/l MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O pH 9,5 mit Tris-HCl einstellen autoklavieren
CDP-Star Lösung	4 µl CDP-Star (Roche, Mannheim) in 2 ml DIG3
Stripping Puffer	0,2 M NaOH; 0,1 % SDS

## 4.2 Mikrobiologische Methoden

### Kultivierung *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C über Nacht. Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm inkubiert. Um die positiv transformierten *E. coli* zu selektieren, wurde dem LB-Medium (**Tabelle 13**) das Antibiotikum Ampicillin als Selektionsmarker zugefügt, da die Plasmide, die zur Transformation benutzt wurden, alle eine Ampicillin-Resistenz besitzen.

**Tabelle 13:** Für die Kultivierung von *E. coli* verwendetes Medium.

Nährmedium	Zusammensetzung pro Liter
Luria-Bertani-Medium (LB)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl (14 g Agar-agar) pH 7,5 mit NaOH einstellen

### 4.2.1 *A. flagrans* spezifische Methoden

#### Kultivierung

Flüssigkulturen von *A. flagrans* wurden bei 28 °C und 180 rpm für 24 Stunden inkubiert oder bei 28 °C für 5 - 7 Tage auf festem PDA-Agar (**Tabelle 14**). Um positive *A.*

*flagrans* Transformanten zu selektieren, wurde dem PDA-Medium die benötigten Selektionsmarker wie Hygromycin, Geneticin und Nourseothricin zugesetzt.

**Tabelle 14: Zur Kultivierung von *A. flagrans* verwendetes Medium.**

Nährmedium	Zusammensetzung pro Liter
PDA (Kartoffel-Dextrose Agar)	24 g Kartoffel-Dextrose-Bouillon (15 g Agar-agar) pH 6,6

### Sporensuspension

Um eine Sporensuspension eines *A. flagrans* Stammes herzustellen, wurde der Stamm eine Woche auf einer PDA-Platte bei 28 °C inkubiert. Die Sporen samt Myzel wurden von diesen Platten mit einem Drigalskispatel abgekratzt, in 5 ml steriles destilliertes Wasser überführt und kurz gevortext. Diese Suspension wurde durch einlagiges Miracloth gefiltert und mit 45 ml sterilem destilliertem Wasser auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die nach der 15-minütigen Zentrifugation bei 5000 rpm und Raumtemperatur pelletierten Sporen wurden mit 45 ml sterilem destilliertem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die pelletierten Sporen wurden in 3 bis 5 ml sterilem destilliertem Wasser gelöst und die Sporenkonzentration mittels einer Zählkammer bestimmt. Die Sporensuspension wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### Fallenbildung

Zur Herstellung von Mikroskopieproben wurde flüssiges LNM (**Tabelle 15**) in den Zwischenraum zweier kreuzförmig übereinanderliegenden Objektträger pipettiert. Als Abstandshalter dienten zwei mit Klebeband umwickelte Objektträger. Das so entstandene Agar-Pad wurde mit Hilfe eines Zahnstochers inokuliert. Die Inkubation des inokulierten Agar-Pads fand in einer Petrischale mit zwei blauen Spitzen als Abstandshalter und Wasser statt. Das Wasser diente als Feuchtmittel, sodass das Agar-Pad nicht austrocknet. Um die Fallenbildung zu induzieren, wurden 30 µl Nematoden darauf pipettiert. Über Nacht wurden die Platten in Feuchtekammern bei 28 °C inkubiert und am darauffolgenden Tag mit Hilfe eines Mikroskops untersucht.

**Tabelle 15: Medium für die Herstellung von Agarpads zur Mikroskopie.**

Medium	Zusammensetzung pro Liter
LNA (Low nutrient Agar)	1 g KCl 0,2 g MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O 1 ml Spurenelementlösung (15 g Agar-agar) pH 6

### **Protoplastierung**

In 150 ml PDM wurde das abgekratzte *A. flagrans* Myzel einer halben Platte inokuliert und für 24 Stunden bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Myzel durch steriles einfaches Miracloth filtriert und mit etwas sterilem MN-Puffer gewaschen. Eine Spatelspitze (ca. 0,5 g) des Myzels wurde in 5 ml frischen MN-Puffer mit 5 mg/ml Kitalase und 20 mg/ml GlucanX (Novozym) überführt. Das Myzel wurde in der Enzymlösung bei 70 rpm und 30 °C für mindestens 2 Stunden inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden zur Schonung der Protoplasten auf Eis ausgeführt. Mit Hilfe eines Mikroskops wurde die Menge der freigesetzten Protoplasten ermittelt. Die Suspension wurde durch zweilagiges steriles Miracloth filtriert, wodurch unverdautes Myzel abgetrennt wurde. Das Filtrat wurde mit MN-Puffer auf 50 ml aufgefüllt, und dann bei 4 °C, 5000 rpm und für 18 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurden die Protoplasten mit 50 ml KTC-Puffer gewaschen. Das entstandene Pellet aus Protoplasten wurde in 1 ml KTC-Puffer resuspendiert.

Die Protoplasten wurden mittels einer Zählkammer gezählt und für die Transformation auf circa  $6 \times 10^6$  in 100 µl KTC verdünnt. Es wurden 7 µg DNA dazugegeben. Die Suspension wurde auf Eis für zwei Minuten inkubiert und anschließend 1 ml PTC6000-Lösung dazugegeben und vermischt. Die Inkubation fand nun bei Raumtemperatur für 20 Minuten statt. Mit handwarmem PDASS wurde der Ansatz auf 10 ml aufgefüllt und kurz invertiert. Der Ansatz wurde auf Petrischalen mit PDA mit passendem Selektionsmarker ausgebracht und bei 28 °C für eine Woche inkubiert.

Um die richtigen Transformationen zu selektieren, wurden die gewachsenen Kolonien auf PDA-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmarkern übertragen und wieder für mehrere Tage bei 28 °C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurde genomische DNA extrahiert und durch PCR und anschließende Sequenzierung überprüft, ob die Transformation erfolgreich war. Von den positiven Transformanten

wurde ein Glycerolstock angefertigt. Die für die Protoplastierung verwendeten Medien sind in Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16: Medien für die Protoplastierung und Transformation von *A. flagrans*.**

Medien	Zusammensetzung pro Liter
MN Puffer	0,3 mol/l MgSO <sub>4</sub> 0,3 mol/l NaCl
KTC Puffer	1,2 mol/l KCl 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5 50 mmol/l CaCl <sub>2</sub>
PTC6000	10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5 50 mmol/l CaCl <sub>2</sub> 60 % (w/v) Polyethylenglykol 6000
PDASS-Top-Agar	24 g Kartoffel-Dextrose-Bouillon 205 g Saccharose 0,3 g Hefeextrakt 0,3 g Pepton (15 g Agar-agar) pH 6,6 mit NaOH

### Genomische DNA Isolation

Myzel der zu untersuchenden Stämme wurde in flüssigem PDB für 2 bis 3 Tage bei 28 °C stehend inkubiert. Die gebildete Kahmhaut wurde mittels eines Spatels abgenommen, zwischen zwei Papiertüchern und Miracloth trocken gepresst und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das fein gemahlene Myzel wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 700 µl Extraktionspuffer (**Tabelle 17**) aufgenommen und gevortext. Es folgte eine Inkubation der Probe bei 68 °C für 60 min mit leichtem Schütteln auf dem Heizblock. Danach wurden 200 µl 1,5 M Kaliumacetat-Lösung (**Tabelle 17**) dazugegeben und die Probe für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde die Probe alle 5 min invertiert. Nach Fällung der Proteine wurde die Probe für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, sodass die Proteine pelletiert werden konnten. Zur Fällung der genomischen DNA wurde der klare Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml gekühltem Reinst-Ethanol überführt und invertiert. Nach 15

min Inkubation bei -20 °C und Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C wurde die gefällte DNA in einem Pellet konzentriert. Das DNA Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach den 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C wurde das DNA Pellet bei 68 °C auf dem Heizblock getrocknet und in 100 µl TE-Puffer mit RNase A (**Tabelle 17**) bei 68 °C unter leichtem Schütteln resuspendiert. Die Qualität der genomischen DNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft und die Konzentration am Nanodrop Spektrophotometer gemessen. Die genomische DNA wurde zur Aufbewahrung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### Extraktion genomischer DNA im analytischen Maßstab

Dabei wurde ein Stück einer auf Platte gewachsenen Kolonie ausgeschnitten und in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 750 µl Extraktionspuffer (**Tabelle 17**) zerdrückt und bei 68 °C für 60 min leicht schüttelnd auf einem Heizblock inkubiert. Danach wurden 350 µl einer 1,5 M Kaliumacetat-Lösung dazugegeben und die Probe 15 min auf Eis inkubiert. Nach Fällung der Proteine wurde die Probe 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 700 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 800 µl vorgekühltem 100 % Isopropanol versetzt. Nach Invertieren der Probe wurde diese zur Fällung der DNA für 20 min bei -20 °C inkubiert. Die Proben wurden dann für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 500 µl kaltem 70 % Ethanol 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 68 °C 15 min getrocknet und in 50 µl TE-Puffer plus RNase A (**Tabelle 17**) bei 68 °C unter leichtem Schütteln resuspendiert. Die genomische DNA wurde zur Aufbewahrung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

**Tabelle 17: Lösungen für die Extraktion von genomischer DNA.**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Extraktionspuffer für gDNA	0,2 % SDS 50 mM EDTA auf 200 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
Kaliumacetat 1,5 M pH 4,8 für gDNA-Extraktion	29,4 g KAc in 200 ml dH <sub>2</sub> O lösen pH 4,8 mit Essigsäure einstellen
Ustilago-Lysis Buffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0 1 % (w/v) SDS 50::50 mit 1x TE-Puffer mischen

10x Tris-EDTA (TE) Puffer pH 8,0	100 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0 50 µg/ml RNase A in 50 ml ddH <sub>2</sub> O lösen
----------------------------------	--

### RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolation aus *A. flagrans* wurde die Trizol Methode verwendet. Dafür wurden  $1 \times 10^6$  Sporen auf LNA Cellophan Platten ausplattiert. Die Platten wurden 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Wurde induziertes Myzel benötigt, wurde nach 24 Stunden Inkubation eine gemischte Population von *C. elegans* auf die Platten gegeben und weitere 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Das Myzel wurde mit einem Spatel von den Platten gekratzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Mikropistill gemörsert. Anschließend wurde 1 ml Trizol dazugegeben und 15 Sekunden gevortext. Diese Suspension wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 200 µl Chloroform hinzugefügt. Diese Lösung wurde kurz invertiert und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der 15-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mit 500 µl Isopropanol, einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C gefällt. Der Überstand wurde verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 % eiskalten Ethanol gewaschen und 5 Minuten bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und danach in 30 µl nuklease-freiem Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit wurde mit dem Nanodrop Spektrophotometer gemessen. Die RNA wurde danach von DNA-Resten mit dem DNaseTurbo DNA free kit (Thermo Fischer) nach Herstellerangaben befreit.

#### 4.2.2 *C. elegans* spezifische Methoden Kultivierung

800 µl *E. coli* OP50 wurden als Übernachtskultur auf NGM Agarplatten (**Tabelle 18**) angeimpft und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es bildete sich ein Bakterienrasen, der den Nematoden als Nahrung diente. Für die Subkultivierung wurde ein 0,5 cm großer Agarblock aus einer älteren Kulturplatte von *C. elegans* mit einem sterilen Spatel ausgestochen und auf den Rand einer neuen NGM Agarplatte

mit *E. coli* überführt. Für die Überführung einzelner Nematoden wurden diese mit Hilfe eines Platindrahtes gepickt. Um *C. elegans* für Experimente verwenden zu können, wurden die Platten mit sterilem dH<sub>2</sub>O abgewaschen. Die Würmer wurden bei 2500 rpm 3 min gewaschen.

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

Nährmedium	Zusammensetzung pro Liter
NGM-Agar	3 g NaCl 2,5 g Pepton 17 g Agar-agar Nach dem Autoklavieren hinzufügen, Steril gefiltert: 1 ml CaCl <sub>2</sub> (1 M) 1 ml MgSO <sub>4</sub> (1M) 25 ml KPO <sub>4</sub> Puffer (1M) 1 ml Cholesterol (5 mg/ml in Ethanol)

### **Transformation *C. elegans***

Die Transfektion von *C. elegans* erfolgte mittels Mikroinjektion. Dabei wurde die zu transfizierende DNA in den distalen Arm der Gonade injiziert, was zur Bildung extrachromosomaler DNA Arrays führte. Diese DNA konnte an die Nachkommen vererbt werden. Der zu injizierende Vektor und der Vektor mit dem Markergen wurden vor der Injektion mittels Restriktionsverdau linearisiert und aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA) aufgereinigt. Anschließend wurde der Injektionsmix wie in Tabelle 19 angesetzt. Dieser wurde vor der Injektion 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die F1 Generation wurde dann auf positive Transformanten hin überprüft. Positive Transformanten sind anhand der spezifischen Fluoreszenz, je nach verwendetem Marker, des Pharynx erkennbar und wurden für weitere Verwendung der transgenen Linien vereinzelt.

**Tabelle 19: Mengenangaben für das Ansetzen des Injektionsmixes für *C. elegans*.**

	<b>Konzentration</b>
Plasmid-DNA	5 ng/µl
Marker-Plasmid	5 ng/µl
Füll-DNA (1 kb ladder)	150 ng/µl

### **Synchronisation**

Für die Synchronisation der Würmer wurde eine Platte mit adulten Würmern mit 5 ml sterilem Wasser abgespült und in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Wurmlösung wurde mit sterilem Wasser auf 15 ml aufgefüllt und nach einer einminütigen Zentrifugation bei 2500 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand bis auf 3,5 ml abgenommen. Dann wurden 1 ml Chlorix und 500 µl 5 M NaOH zum Wurmpellet hinzugegeben und für 5 min auf dem Vortexer leicht geschüttelt. Die Kutikula der Nematoden reagiert sensibel auf das Hypochlorit, wodurch sie getötet werden. Die Embryonen in den Eiern überlebten aber, da sie durch die Eihülle geschützt werden. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Zentrifugenröhrchen sofort mit sterilem destilliertem Wasser aufgefüllt, invertiert und bei 2500 rpm 1 min lang zentrifugiert. Die pelletierten Eier wurden zweimal mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen und einmal mit M9 Puffer (**Tabelle 20**). Nach dem letzten Waschschrift wurden die pelletierten Eier in 2 ml M9 resuspendiert und in 35 mm Petrischalen überführt. Im M9 Puffer regenerierten die Embryonen und konnten schlüpfen, die weitere Entwicklung wurde aber aufgrund des Fehlens der Nahrung verhindert, sodass alle im L1-Larvenstadium blieben. Diese wurden für 24 Stunden bei 20 °C inkubiert und anschließend auf NGM-Platten mit OP50 überführt.

Um die Nematodenlinien für längere Zeit aufzuheben, wurden sie eingefroren. Dazu wurden 20 junge adulte Würmer auf je zwei NGM Agar Platten mit OP50 überführt und für 4 Tage bei 20 °C inkubiert. Für den weiteren Fortgang des Einfrierens sollten nun viele L1 und L2 Larven auf den Platten vorhanden sein, da nur diese das Freezing überleben. Ebenso sollte kein Futter mehr vorhanden sein, da die L1/L2 Larven sonst nicht in diesem Stadium überdauern. Die Würmer wurden mit 5 ml M9 Puffer pro Platte abgespült und in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Würmer wurden mittels einer Zentrifugation von 1 min und 5000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Wurmpellet zweimal mit M9 Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Wurmpellet in 3 ml M9 und 3 ml *Freezing*

solution (**Tabelle 20**) resuspendiert und auf 6 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Diese werden in einem Cryo-Container mit Isopropanol bei -80 °C langsam eingefroren.

**Tabelle 20: Lösungen für die Synchronisation und das Einfrieren von *C. elegans*.**

Medium	Zusammensetzung pro Liter
M9	3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 g NaCl 1 ml 1 M MgSO <sub>4</sub>
Freezing solution	5,8 g NaCl 50 ml 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6 240 ml Glycerol 710 ml ddH <sub>2</sub> O nach dem Autoklavieren frisch vor Verwendung zugeben: 30 µl 1 M MgSO <sub>4</sub> für 100 ml

### Genomische DNA

Um genomische DNA aus Nematoden zu isolieren, wurde eine Platte mit einer gemischten Population mit dH<sub>2</sub>O abgespült und mehrmals mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Nematoden wurden bei -80 °C eingefroren und anschließend gemörsert. Zu den gemörserten Nematoden wurde das 5x Volumen an Lysispuffer (**Tabelle 21**) mit 0,1mg/ml Proteinase K dazugegeben und 1 Stunde bei 65 °C und 20 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. 1x Volumen Phenol/Chloroform mit Tris gepuffert wurde dazugegeben und vorsichtig gemischt, Diese Suspension wurde für 4 Minuten bei 4000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 0,1x Volumen 3 M Natriumacetatlösung und mehr als das 2x Volumen 100 % Ethanol wurden zum Überstand hinzugefügt. Das Ganze wurde gemischt und 1 Stunde bei -20 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde es für 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol für 5 Minuten bei 13.000 rpm gewaschen. Der Überstand wurde erneut entfernt und das DNA-Pellet 10 Minuten lang an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde

in 50  $\mu$ l TE+RNase A gelöst. Die DNA-Konzentration wurde anschließend am Nanodrop Spektrophotometer gemessen.

**Tabelle 21: Lösungen für die genomische DNA Extraktion aus *C. elegans*.**

Lösung	Zusammensetzung
Lysispuffer	200 mM NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) 50 mM EDTA (pH 8,0) 0,5 % SDS Direkt vor Verwendung hinzugeben: 0,1 mg/ml Proteinase K

### 4.3 Mikroskopische Methoden

Für konventionelle Fluoreszenzmikroskopie wurde ein AxioImager.Z1 (Zeiss) mit einer MrM Kamera und der ZEN Blue Software (2012) verwendet. Folgende Objektive wurden für die Aufnahmen verwendet: PlanApochromat 63x/1.4 Ölimmersion, ein EC-Plan-Neofluar 40x/0.75, ein EC-Plan-Neofluar 20x/0,5 oder ein EC-Plan-Neofluar 10x/0.3. Zur Langzeitbeobachtung bei einem Virulenzassay wurde ein Zeiss AxioObserver.Z1 Inversmikroskop mit einem 10x/0,30 N.A. Objektiv, einem Zeiss Multi Laser Modul (488 Dioden Laser und 561 nm OPSL Laser), einem Spinning Disk Modul CSU-X1M 5000 und einer Evolve 512 Kamera (Photometrics) verwendet. Für Arbeiten mit *C. elegans* wurde ein SteREO Discovery.V12 (Zeiss) und ein SteREO Lumar.V1 (Zeiss) mit Fluoreszenzfiltern verwendet.

### Virulenzassay

Um die Virulenz von *A. flagrans* zu kontrollieren, wurde ein Virulenzassay durchgeführt. Dazu wurde der zu testende *A. flagrans* Stamm auf dünnen LNA-Agarpads mit einem Zahnstocher angeimpft. Zur Induktion der Fallenbildung wurde eine gemischte Population von *C. elegans* auf die Pads gegeben und diese dann bei 28 °C über Nacht inkubiert. Am Tag des Virulenzassays wurden die Agarpads mit dH<sub>2</sub>O abgespült, um freie Nematoden zu entfernen. Ein Stück des Agarpads mit vielen Fallenstrukturen wurde ausgeschnitten und mit der Oberseite nach unten in eine IBIDI-Kammer gelegt. Dann wurden Positionen mit vielen Fallen am Mikroskop eingespeichert und synchronisierte *C. elegans* im L4 Stadium dazugegeben. Es wurde eine Langzeitaufnahme über 11 Stunden gemacht. Die einzelnen Positionen wurden

später mit ImageJ ausgewertet. Die Paralysezeit wurde vom ersten Kontakt des Nematoden mit der Falle bis zur vollständigen Ruhigstellung des Nematoden gemessen.

### **Mikroskopie der RIS-Neuronen**

Um die Aktivität der RIS-Neuronen in Echtzeit zu messen, wurde das GCaMP System verwendet. Dabei besteht GCaMP unter anderem aus einem GFP und einem Calmodulin, welches die Calciumionen erkennt und dadurch eine Konformationsänderung auslöst, was dann wiederum zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führt. Somit können Neuronenaktivitäten beziehungsweise Calciumionenspiegel in vivo in Echtzeit verfolgt werden (Nakai *et al.*, 2001). Für die Mikroskopie wurden einzelne synchronisierte *C. elegans* L4 Larven, welche GCaMP6 unter dem *flp-11*-Promotor exprimieren auf dünne 3 % Agarosepads überführt. Die Nematoden wurden mit Polystyrol Kügelchen (0,1 µm; Merck) und einem Deckglas immobilisiert. Es wurden Aufnahmen für 30 Minuten gemacht, bei denen alle 5 Sekunden ein Bild im GFP-Kanal aufgenommen wurde. Analysen wurden mit ImageJ durchgeführt, indem die Fluoreszenzintensität des GCaMP des Zellkörpers des RIS-Neurons gemessen wurde. Dieser Wert wurde gegen eine Grundlinie normalisiert. Diese Grundlinie ist der Durchschnitt der Fluoreszenzintensitäten der ersten Minute. Daten wurden wie folgt berechnet:  $(\text{Fluoreszenzintensität jedes Bildes} - \text{Grundlinie}) / \text{Grundlinie}$   $((F(t)-F_0)/F_0)$ . Für statistische Analysen wurden die Durchschnitts Fluoreszenzintensität von GCaMP eines jeden Nematoden, der Netto Bereich und die Anzahl an positiven Spitzen gemessen und verglichen. Um statistische Signifikanzen zu erhalten, wurde ein Kruskal-Wallis Test mit nachfolgendem Dunn's Mehrfachvergleich post-hoc-Test durchgeführt.

### **Bewegungsanalysen von *C. elegans***

Um die Bewegung von *C. elegans* zu analysieren, wurden einminütige Aufnahmen am Binokular gemacht. Jede Sekunde wurde ein Bild im DIC Kanal aufgenommen. Dafür wurden L4 Larven der zu untersuchenden Stämme einzeln auf NGM Platten gepickt, und nach fünfminütiger Akklimatisierung wurde dann die Videoaufnahme gestartet. Analysen wurden in ImageJ durchgeführt, indem der Nematode manuell verfolgt wurde und die durchschnittliche Geschwindigkeit und zurückgelegte Gesamtdistanz gemessen wurde.

#### 4.4 Software und Datenbanken

Für die Analyse der Proteinsequenzen wurde die Datenbank UniProt (UniProt Consortium, 2025) verwendet. Proteinstrukturen wurden mit AlphaFold 3 (Abramson *et al.*, 2024) berechnet und mit ChimeraX Version 1.11 (Meng *et al.*, 2023) dargestellt. Zur Vorhersage von Signalsequenzen und Effektorwahrscheinlichkeiten wurden die Tools SignalP 6.0 (Teufel *et al.*, 2022) und EffectorP 3.0. (Sperschneider and Dodds, 2022) verwendet. Um eine Vorhersage zur Lokalisierung der Proteine zu erhalten, wurde WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007) verwendet. Der Abgleich von homologen Proteinen wurde mit NCBI Blast (McGinnis and Madden, 2004) durchgeführt. ExPasy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) wurde zur Berechnung von physikochemischen Eigenschaften benutzt. Die Bearbeitung der Nukleotidsequenzen erfolgte mit Hilfe von Ape (*A Plasmid Editor*) (Davis and Jorgensen, 2022). Für die Bearbeitung von Mikroskopiebildern wurde ImageJ/Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) verwendet. Statistische Auswertungen wurden mit GraphPad Prism 10 (GraphPad Software LLC) durchgeführt. Signifikanzen wurden wie folgt verwendet: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ,  $p > 0,05$  ns = nicht-signifikant.

#### Phylogenetische Analysen

Die phylogenetischen Analysen wurden mit MAFFT (v7.511) und MEGA 12 durchgeführt. Die multiplen Sequenzalignments wurden mit MAFFT (v7.511) mit Standardeinstellungen durchgeführt. Die phylogenetische Rekonstruktion erfolgte mit der Maximum-Likelihood-Methode (ML) in MEGA 12. Das geeignete Aminosäure Substitutionsmodell wurde in MEGA mit der implementierten Modelltest-Funktion bestimmt. Zur Abschätzung der statistischen Unterstützung der Knoten wurde jeweils 1000 Bootstrap-Replikate berechnet. Die Bootstrap-Werte sind als Prozentangaben an den entsprechenden Verzweigungen dargestellt. Positionen mit fehlenden Daten oder Lücken wurden mittels *Partial deletion* mit 95 % Cutoff behandelt.

Die Aminosäuresequenzen der identifizierten PDI-ähnlichen Proteine aus *A. flagrans* sowie ausgewählter PDI1-Proteine anderer Organismen wurden aus der NCBI-Datenbank bezogen und sind in Tabelle 22 dargestellt.

**Tabelle 22: Accession Nummern der für die phylogenetische Analyse verwendeten Proteine.**  
 Angegeben ist das Protein, der Organismus, die im Stammbaum verwendete Abkürzung und die NCBI-  
 Accession-Nummer.

<b>Organismus</b>	<b>Protein</b>	<b>Accession Nummer</b>	<b>Abkürzung</b>
<i>A. flagrans</i>	DFL_002885	RVD88709.1	AflPDI1
<i>A. flagrans</i>	DFL_004145	RVD85840.1	-
<i>A. flagrans</i>	DFL_004795	RVD86524.1	-
<i>A. flagrans</i>	DFL_007768	RVD83381.1	-
<i>A. flagrans</i>	DFL_003235	RVD84898.1	-
<i>A. flagrans</i>	DFL_007810	RVD83424.1	-
<i>A. oligospora</i> ATCC2497	AOL_s00083g18	XP_011123500.1	AolPDI1
<i>Homo sapiens</i>	Proteindisulfidomerase A4 Isoform 2	NP_004902.1	HsPDIA4
<i>S. cerevisiae</i>	PDI1	NP_009887.1	ScPDI1
<i>U. maydis</i>	Putative Proteindisulfidomerase	XP_011388837.1	UmPDI1
<i>M. oryzae</i> 70-15	Proteindisulfidomerase	XP_003710672.1	MoPDI1
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	PDI1	XP_680705.1	AnPDI1
<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	PDI1	XP_749744.1	AfuPDI1
<i>Candida albicans</i> SC5314	Proteindisulfidomerase	XP_716953.2	CaPDI1
<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	Proteindisulfidomerase	XP_006966396.1	TrPDI1
<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i> PH-1	Disulfidomerase	XP_011317022.1	FgPDI1
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	Proteindisulfidomerase	XP_959167.1	NcPDI1
<i>Botrytis cinera</i> B05.10	Bcpdi1	XP_024549412.1	BcPDI1

## 5. Literaturverzeichnis

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., Beattie, C., Bertolli, O., Bridgland, A., Cherepanov, A., Congreve, M., Cowen-Rivers, A. I., Cowie, A., Figurnov, M., Fuchs, F. B., Gladman, H., Jain, R., Khan, Y. A., Low, C. M. R., Perlin, K., Potapenko, A., Savy, P., Singh, S., Stecula, A., Thillaisundaram, A., Tong, C., Yakneen, S., Zhong, E. D., Zielinski, M., Židek, A., Bapst, V., Kohli, P., Jaderberg, M., Hassabis, D., and Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, **630**, 493–500.
- Ahmad, G., Khan, A., Khan, A. A., Ali, A., and Mohhamad, H. I. (2021). Biological control: A novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **114**, 885–912.
- Åhman, J., Johansson, T., Olsson, M., Punt, P. J., Van Den Hondel, C. A. M. J. J., and Tunlid, A. (2002). Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3408–3415.
- Ali Khan, H. and Mutus, B. (2014). Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Front. Chem.*, **2**:70, 1-9.
- Andersson, K. M., Kumar, D., Bentzer, J., Friman, E., Åhrén, D., and Tunlid, A. (2014). Interspecific and host-related gene expression patterns in nematode-trapping fungi. *BMC Genomics*, **15**, 968.
- Arioka, M., Hirata, A., Takatsuki, A., and Yamasaki, M. (1991). Brefeldin A blocks an early stage of protein transport in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 1253–1262.
- Barker, K. R. and Koenning, S. R. (1998). Developing sustainable systems for nematode management. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **36**, 165–205.
- Barron, G. (2003). Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. *Biodiversity*, **4**, 3–9.
- Brefort, T., Tanaka, S., Neidig, N., Doehlemann, G., Vincon, V., and Kahmann, R. (2014). Characterization of the largest effector gene cluster of *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog.*, **10**, e1003866.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **77**, 71–94.
- Bringmann, H. (2018). Sleep-active neurons: Conserved motors of sleep. *Genetics*, **208**, 1279–1289.
- Busack, I. and Bringmann, H. (2023). A sleep-active neuron can promote survival while sleep behavior is disturbed. *PLoS Genet.*, **19**, e1010665.

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802–805.
- Chang, H.-W., Lin, H.-C., Yang, C.-T., Tay, R. J., Chang, D.-M., Tung, Y.-C., and Hsueh, Y.-P. (2025).** Cuticular collagens mediate cross-kingdom predator–prey interactions between trapping fungi and nematodes. *PLoS Biol.*, **23**, 1–21.
- Conesa, A., Punt, P. J., Van Luijk, N., and Van Den Hondel, C. A. M. J. J. (2001).** The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. *Fungal Genet. Biol.*, **33**, 155–171.
- Corsi, A. K., Wightman, B., and Chalfie, M. (2015).** A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **200**, 387–407.
- Darby, N. J., Kemmink, J., and Creighton, T. E. (1996).** Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, **35**, 10517–10528.
- Davis, M. W. and Jorgensen, E. M. (2022).** ApE, a plasmid editor: A freely available DNA manipulation and visualization program. *Front. Bioinforma.*, Volume 2-2022.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I. A., Ayliffe, M. A., Kobe, B., and Ellis, J. G. (2006).** Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 8888–8893.
- Doehlemann, G., Linde, K. van der, Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., and Kahmann, R. (2009).** Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog.*, **5**, e1000290.
- Edman, J. C., Ellis, L., Blacher, R. W., Roth, R. A., and Rutter, W. J. (1985).** Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature*, **317**, 267–270.
- Emser, J., Seidler, L., Kovačević, E., Yu, K., Rudolf, T., Wohlmann, E., and Fischer, R. (2025).** The Egh16-like virulence factor TrsA of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys flagrans* facilitates intrusion into its host *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog.*, **21**, e1013370.
- Emser, J., Wernet, N., Hetzer, B., Wohlmann, E., and Fischer, R. (2024).** The cysteine-rich virulence factor NipA of *Arthrobotrys flagrans* interferes with cuticle integrity of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.*, **15**, 5795.
- Erickson, B. (2010).** PESTICIDES Bayer CropScience, EPA agree to phase out use of aldicarb. *Chem. Eng. News*, **88**, 11.
- Ermolaeva, M. A. and Schumacher, B. (2014).** Insights from the worm: The *C. elegans* model for innate immunity. *Semin. Immunol.*, **26**, 303–9.
- Escoubas, P. (2000).** Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*, **82**, 893–907.

- Fares, H. and Greenwald, I. (2001).** Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: Coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics*, **159**, 133–145.
- Farquhar, R., Honey, N., Murant, S. J., Ellis, R. W., Freedman, R. B., and Tuite, M. F. (1991).** Protein disulfide isomerase is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **108**, 81–89.
- Fekete, C., Tholander, M., Rajashekar, B., Ahrén, D., Friman, E., Johansson, T., and Tunlid, A. (2008).** Paralysis of nematodes: Shifts in the transcriptome of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium haptotylum* during infection of *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Microbiol.*, **10**, 364–375.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806–811.
- Fischer, R. and Requena, N. (2022).** Small-secreted proteins as virulence factors in nematode-trapping fungi. *T. Microbiol.*, **30**, 615–617.
- Flor, H. H. (1971).** Current status of the Gene-for-Gene concept. **9**, 275-296.
- Fresenius, G. (1852).** Beitrage zur Mykologie (Heft 1-2).
- Gallotta, I., Sandhu, A., Peters, M., Haslbeck, M., Jung, R., Agilkaya, S., Bliersch, J. L., Rödelberger, C., Röseler, W., Huang, C., Sommer, R. J., and David, D. C. (2020).** Extracellular proteostasis prevents aggregation during pathogenic attack. *Nature*, **584**, 410–414.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005).** Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *Proteomics Protoc. Handb.*, 571–607.
- Goldberger, R. F., Epstein, C. J., and Anfinsen, C. B. (1963).** Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **238**, 628–635.
- Hatahet, F. and Ruddock, L. W. (2009).** Protein disulfide isomerase: A critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 2807–2850.
- Haynes, C. M., Titus, E. A., and Cooper, A. A. (2004).** Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol. Cell*, **15**, 767–776.
- Healey, K., Lawlor, C., Knox, M. R., Chambers, M., and Lamb, J. (2018).** Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep. *Vet. Parasitol.*, **253**, 48–54.
- Heijne, G. von. (1990).** The signal peptide. *J. Membr. Biol.*, **115**, 195–201.

- Hill, A. J., Mansfield, R., Lopez, J. M. N. G., Raizen, D. M., and Van Buskirk, C. (2014).** Cellular stress induces a protective sleep-like state in *C. elegans*. *Curr. Biol.*, **24**, 2399–2405.
- Hood, H. M., Neafsey, D. E., Galagan, J., and Sachs, M. S. (2009).** Evolutionary roles of upstream open reading frames in mediating gene regulation in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.*, **63**, 385–409.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., and Nakai, K. (2007).** WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.*, **35**, W585-587.
- Hsueh, Y.-P., Gronquist, M. R., Schwarz, E. M., Nath, R. D., Lee, C.-H., Gharib, S., Schroeder, F. C., and Sternberg, P. W. (2017).** Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. *Elife*, **6**, e20023.
- Hsueh, Y.-P., Mahanti, P., Schroeder, F. C., and Sternberg, P. W. (2013).** Nematode-trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones. *Curr. Biol.*, **23**, 83–86.
- Hu, X. (2022).** Interaction of *Arthrobotrys flagrans* with *Caenorhabditis elegans* involves G-protein dependent signaling. Doktorarbeit, KIT
- Huang, T.-Y., Lee, Y.-Y., Vidal-Diez De Ulzurrun, G., and Hsueh, Y.-P. (2021).** Forward genetic screens identified mutants with defects in trap morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *G3 GenesGenomesGenetics*, **11**, jkaa022.
- Jiang, X., Xiang, M., and Liu, X. (2017).** Nematode-Trapping Fungi. *Microbiol. Spectr.*, **5**, 1: FUNK-0022–2016.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-Lopez, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., and Perry, R. N. (2013).** Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. PLANT Pathol.*, **14**, 946–961.
- Kim, H.-M. and Colaiácovo, M. P. (2019).** CRISPR-Cas9-guided genome engineering in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, **129**, e106.
- Kim, K. T., Jeon, J., Choi, J., Cheong, K., Song, H., Choi, G., Kang, S., and 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.
- Knobel, K. M., Davis, W. S., Jorgensen, E. M., and Bastiani, M. J. (2001).** UNC-119 suppresses axon branching in *C. elegans*. *Development*, **128**, 4079–4092.
- Konietzka, J., Fritz, M., Spiri, S., McWhirter, R., Leha, A., Palumbos, S., Costa, W. S., Oranth, A., Gottschalk, A., Miller, D. M., Hajnal, A., and Bringmann, H. (2020).** Epidermal growth factor signaling promotes sleep through a combined series and parallel neural circuit. *Curr. Biol.*, **30**, 1-16.e13.

- Kozlov, G., Määttänen, P., Thomas, D. Y., and Gehring, K. (2010).** A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS J.*, **277**, 3924–3936.
- Kuo, C.-Y., Tay, R. J., Lin, H.-C., Juan, S.-C., Vidal-Diez de Ulzurrun, G., Chang, Y.-C., Hoki, J., Schroeder, F. C., and Hsueh, Y.-P. (2024).** The nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* detects prey pheromones via G protein-coupled receptors. *Nat. Microbiol.*, **9**, 1738–1751.
- LaMantia, M., Miura, T., Tachikawa, H., Kaplan, H. A., Lennarz, W. J., and Mizunaga, T. (1991).** Glycosylation site binding protein and protein disulfide isomerase are identical and essential for cell viability in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 4453–4457.
- Liang, L.-M., Zou, C.-G., Xu, J., and Zhang, K.-Q. (2019).** Signal pathways involved in microbe–nematode interactions provide new insights into the biocontrol of plant-parasitic nematodes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **374**, 20180317.
- Lin, T.-H., Chang, H.-W., Tay, R. J., and Hsueh, Y.-P. (2025).** Predation by nematode-trapping fungus triggers mechanosensory-dependent quiescence in *Caenorhabditis elegans*. *iScience*, **28**, 112792.
- Liu, K., Tian, J., Xiang, M., and Liu, X. (2012).** How carnivorous fungi use three-celled constricting rings to trap nematodes. *Protein Cell*, **3**, 325–328.
- Liu, K., Wang, X., Li, Y., Shi, Y., Ren, Y., Wang, A., Zhao, B., Cheng, P., and Wang, B. (2023).** Protein disulfide isomerase FgEps1 is a secreted virulence factor in *Fusarium graminearum*. *J. Fungi*, **9**, 1009.
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., and Kahmann, R. (2015).** Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 513–545.
- Maduro, M. and Pilgrim, D. (1995).** Identification and cloning of *unc-119*, a gene expressed in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Genetics*, **141**, 977–988.
- Marín-Menguiano, M., Moreno-Sánchez, I., Barrales, R. R., Fernández-Álvarez, A., and Ibeas, J. I. (2019).** N-glycosylation of the protein disulfide isomerase Pdi1 ensures full *Ustilago maydis* virulence. *PLoS Pathog.*, **15**, e1007687.
- Markaki, M. and Tavernarakis, N. (2020).** *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **63**, 118–125.
- Mathews, E. A., García, E., Santi, C. M., Mullen, G. P., Thacker, C., Moerman, D. G., and Snutch, T. P. (2003).** Critical residues of the *Caenorhabditis elegans* *unc-2* voltage-gated calcium channel that affect behavioral and physiological properties. *J. Neurosci.*, **23**, 6537–6545.
- McGinnis, S. and Madden, T. L. (2004).** BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **32**, W20-25.

- Megen, Elsen, den, van, Holterman, M., Karssen, G., Mooijman, P., Bongers, A. M. T., Holovachov, O., Bakker, J., and Helder, J. (2009).** A phylogenetic tree of nematode based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematol.* **11** 2009 6, 11.
- Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H., and Ferrin, T. E. (2023).** UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Sci.*, **32**, e4792.
- Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P., and Talbot, N. J. (2012).** Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell*, **24**, 322–35.
- Mueller, A. N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D., and 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.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001).** A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 137–141.
- Nath, R. D., Chow, E. S., Wang, H., Schwarz, E. M., and Sternberg, P. W. (2016).** *C. elegans* stress-induced sleep emerges from the collective action of multiple neuropeptides. *Curr. Biol. CB*, **26**, 2446–2455.
- Niu, X.-M. and Zhang, K.-Q. (2011).** *Arthrobotrys oligospora*: A model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology*, **2**, 59–78.
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H.-B., and Tunlid, A. (2006).** Nematophagous Fungi. *Encycl. LIFE Sci.* 1-11.
- Park, J. Y., Joo, H.-J., Park, S., and Paik, Y.-K. (2019).** Ascaroside pheromones: Chemical biology and pleiotropic neuronal functions. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3898.
- Park, S., Link, C. D., and Johnson, T. E. (2010).** Life-span extension by dietary restriction is mediated by NLP-7 signaling and coelomocyte endocytosis in *C. elegans*. *FASEB J.*, **24**, 383–392.
- Peberdy, J. F. (1994).** Protein secretion in filamentous fungi—Trying to understand a highly productive black box. *T. Biotechnol.*, **12**, 50–57.
- Pop, M., Klemke, A.-L., Seidler, L., Wernet, N., Steudel, P. L., Baust, V., Wohlmann, E., and Fischer, R. (2024).** *Caenorhabditis elegans* neuropeptide NLP-27 enhances neurodegeneration and paralysis in an opioid-like manner during fungal infection. *iScience*, **27**, 109484.
- Pramer, D. (1964).** Nematode-Trapping Fungi. *Science*, **144**, 382-388.

- Pujol, N., Zugasti, O., Wong, D., Couillault, C., Kurz, C. L., Schulenburg, H., and Ewbank, J. J. (2008).** Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.*, **4**, 1–12.
- Rothman, J. E. (1994).** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, **372**, 55–63.
- Schafer, W. R. (1995).** A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. **375**, 73-78.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012).** Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 676–682.
- Schmidt, A. R., Dörfelt, H., and Perrichot, V. (2007).** Carnivorous fungi from Cretaceous amber. *Science*, **318**, 1743.
- Shaw, P. J., Cirelli, C., Greenspan, R. J., and Tononi, G. (2000).** Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**, 1834–1837.
- Sperschneider, J. and Dodds, P. N. (2022).** EffectorP 3.0: Prediction of apoplasmic and cytoplasmic effectors in fungi and oomycetes. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, **35**, 146–156.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Singh, K. B., and Taylor, J. M. (2015).** Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLoS Pathog.*, **11**, e1004806.
- Stergiopoulos, I. and De Wit, P. J. G. M. (2009).** Fungal Effector Proteins. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **47**, 233–263.
- Studel, P. L. (2022).** Untersuchung der Immunantwort von *Caenorhabditis elegans* nach dem Angriff durch den Pilz *Arthrobotrys flagrans*. Bachelorarbeit, KIT.
- Steuer Costa, W., Van Der Auwera, P., Glock, C., Liewald, J. F., Bach, M., Schüler, C., Wabnig, S., Oranath, A., Masurat, F., Bringmann, H., Schoofs, L., Stelzer, E. H. K., Fischer, S. C., and Gottschalk, A. (2019).** A GABAergic and peptidergic sleep neuron as a locomotion stop neuron with compartmentalized Ca<sup>2+</sup> dynamics. *Nat. Commun.*, **10**, 4095.
- Sulston, J. E. and 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., and Thomson, J. N. (1983).** The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, **100**, 64–119.
- Tachikawa, H., Miura, T., Katakura, Y., and Mizunaga, T. (1991).** Molecular structure of a yeast gene, PDI1, encoding protein disulfide isomerase that is essential for cell growth. *J. Biochem. (Tokyo)*, **110**, 306–313.

- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., Heijne, G. von, and Nielsen, H. (2022).** SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat. Biotechnol.*, **40**, 1023–1025.
- Trojanowski, N. F., Nelson, M. D., Flavell, S. W., Fang-Yen, C., and Raizen, D. M. (2015).** Distinct mechanisms underlie quiescence during two *Caenorhabditis elegans* sleep-like states. *J. Neurosci.*, **35**, 14571–14584.
- Trojanowski, N. F. and Raizen, D. M. (2016).** Call it worm sleep. *Trends Neurosci.*, **39**, 54–62.
- Tunlid, A., Jansson, H.-B., and Nordbring-Hertz, B. (1992).** Fungal attachment to nematodes. *Mycol. Res.*, **96**, 401–412.
- Tunlid, A., Johansson, T., and Nordbring-Hertz, B. (1991).** Surface polymers of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 1231–1240.
- Turek, M., Besseling, J., Spies, J.-P., König, S., and Bringmann, H. (2016).** Sleep-active neuron specification and sleep induction require FLP-11 neuropeptides to systemically induce sleep. *eLife*, **5**, e12499.
- Turek, M., Lewandrowski, I., and Bringmann, H. (2013).** An AP2 transcription factor is required for a sleep-active neuron to induce sleep-like quiescence in *C. elegans*. *Curr. Biol.*, **23**, 2215–2223.
- Van Der Does, H. C. and Rep, M. (2007).** Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi. *Mol. Plant-Microbe Interactions®*, **20**, 1175–1182.
- Van Valen, L. (1973).** A new evolutionary law. **1**, 1–30.
- Veenhuis, M., Nordbring-Hertz, B., and Harder, W. (1985).** Development and fate of electron-dense microbodies in trap cells of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **51**, 399–407.
- Vidal-Diez de Ulzurrun, G. and Hsueh, Y.-P. (2018).** Predator-prey interactions of nematode-trapping fungi and nematodes: Both sides of the coin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 3939–3949 .
- Wang, Y., Kang, X., Cui, X., Hu, J., Pan, Y., Deng, Y., and Zhang, S. (2025a).** Protein disulfide isomerase MoPdi1 regulates fungal development, virulence, and endoplasmic reticulum homeostasis in *Magnaporthe oryzae*. *J. Integr. Agric.*, **24**, 4670–4689.
- Wang, Z., Li, W., Kang, G., Deng, J., Qin, S., and Cai, Q. (2025b).** Fungal extracellular vesicles mediate cross-kingdom trafficking of virulence effectors into plant cells to promote infection. *Mol. Plant*, **18**, 1369–1389.
- Wernet, N., Wernet, V., and 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. and Fischer, R. (2022).** Establishment of *Arthrobotrys flagrans* as biocontrol agent against the root pathogenic nematode *Xiphinema index*. *Environ. Microbiol.*, **25**, 283–293.
- Wernet, V., Wäckerle, J., and Fischer, R. (2022).** The STRIPAK component SipC is involved in morphology and cell-fate determination in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *Genetics*, **220**, iyab153.
- Wernet, V., Wernet, N., and Fischer, R. (2021b).** Räuberische Pilze mit Anwendungspotenzial. *BIOspektrum*, **07.21**, 686–689.
- Wilkinson, B. (2004).** Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Proteins Proteomics*, **1699**, 35–44.
- Xie, M., Bai, N., Yang, X., Liu, Y., Zhang, K.-Q., and Yang, J. (2023).** Fus3 regulates asexual development and trap morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *iScience*, **26**, 107404.
- Yang, C.-T., Vidal-Diez De Ulzurrun, G., Gonçalves, A. P., Lin, H.-C., Chang, C.-W., Huang, T.-Y., Chen, S.-A., Lai, C.-K., Tsai, I. J., Schroeder, F. C., Stajich, J. E., and Hsueh, Y.-P. (2020).** Natural diversity in the predatory behavior facilitates the establishment of a robust model strain for nematode-trapping fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **117**, 6762–6770.
- Yang, J., Tian, B., Liang, L., and Zhang, K.-Q. (2007a).** Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 21–31.
- Yang, J., Wang, L., Ji, X., Feng, Y., Li, X., Zou, C., Xu, J., Ren, Y., Mi, Q., Wu, J., Liu, S., Liu, Y., Huang, X., Wang, H., Niu, X., Li, J., Liang, L., Luo, Y., Ji, K., Zhou, W., Yu, Z., Li, G., Liu, Y., Li, L., Qiao, M., Feng, L., and Zhang, K.-Q. (2011).** Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PLoS Pathog.*, **7**, e100217
- Yang, Y., Yang, E., An, Z., and Liu, X. (2007b).** 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., Hetzer, B., and Fischer, R. (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., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Keller, J., Bunzel, M., and Fischer, R. (2021).** Fatal attraction of *Caenorhabditis elegans* to predatory fungi through 6-methyl-salicylic acid. *Nat. Commun.*, **12**, 5462.
- Zhang, K.-Q. and Hyde, K. D. (2014).** Nematode-Trapping Fungi. *Fungal Diversity Research Series* **23**, 1-392.

**Zhang, S. and Xu, J.-R. (2014).** Effectors and effector delivery in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog.*, **10**, e1003826.

**Zhdanova, I. V., Wang, S. Y., Leclair, O. U., and Danilova, N. P. (2001).** Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.*, **903**, 263–268.

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer bedanken für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Möglichkeit diese Arbeit dort anzufertigen sowie für die hilfreichen Ratschläge und Tipps.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Kämper für die Übernahme des Korreferats.

Vielen Dank auch an alle aus der Wurm-Gruppe, die die Zeit im Labor immer angenehm gemacht haben. Danke für die schönen gemeinsamen Stunden, die guten Diskussionen und auch die Unterstützung im Labor. Ein besonderer Dank gilt Jennifer Emser, die mich während der Betreuung meiner Masterarbeit super auf die darauffolgende PhD-Zeit und die Nematoden und Pilze vorbereitet hat. Dank gebührt natürlich auch Marius Kriegler, Kaiwei Yu, Lena Seidler, Pietrina Steudel, Paula Bretschneider und Maria Stroe, ohne euch wäre der Labor-Alltag nicht halb so lustig gewesen.

Ein großer Dank gilt auch Elke Wohlmann, die jede Injektion, auch wenn sie noch so kurzfristig angemeldet wurde, immer perfekt durchgeführt hat. Ohne dich wäre die Arbeit nie so weit gekommen.

Ein besonderer Dank gebührt auch Helena Hoang, beste Laborpartnerin. Auch wenn wir nicht mehr im selben Labor waren, so hatten wir doch immer viele lustige Stunden zusammen, ich sage nur EMB-Platten, Weihnachtsadventskalender, Snacks und auch die eine oder andere schöne Diskussion. Ohne dich hätte es nicht so viel Spaß gemacht.

Danken möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern des IAB für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Vor allem möchte ich mich bei meiner Familie, besonders bei meiner Mutter und meinem Bruder, für die Unterstützung in den letzten drei Jahren bedanken. Sie haben immer an mich geglaubt und sich mit mir über Erfolge gefreut. Ebenso haben sie mich bei Misserfolgen aufgebaut und gestärkt.