

**Molekulare Mechanismen der Fallenbildung und Hyphenfusion  
im Nematoden-fangenden Pilz *Arthrobotrys flagrans*:  
Die Rolle von Zellendmarkern und NADPH-Oxidasen**

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. Marius Kriegler**

KIT-Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

2. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2026

## **Eidesstattliche Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Zeitraum von 2022 bis 2026 am Institut für Angewandte Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt. Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich übernommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht und die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie wurden beachtet. Zudem versichere ich, dass die elektronische Version der vorliegenden Arbeit mit der schriftlichen übereinstimmt.

---

Ort / Datum

---

Kriegler, Marius

## Publikationsliste

**Kriegler, M.**, Wernet, V., Fischer, R. (2026). Spatiotemporal compartmentalization of NADPH oxidase signalling coordinates cell fusion and predatory behaviour in nematode-trapping fungi. *mBio*, in revision.

**Kriegler, M.**, Herrero, S., Fischer, R. (2025). Where to grow and where to go. *Fungal Genet. Biol.* 178: 103103983.

**Kriegler, M.**, Wernet, V., Hetzer, B., Herrero, S., Wei, A., Wäckerle, J., Dewein, I., Fischer, R. (2025). Cell-end marker proteins are required for hyphal ring formation and size determination of traps of *Arthrobotrys flagrans*. *J. Cell Sci.*, 138(8): jcs263744.

Wernet, V., **Kriegler, M.**, Kumpost, V., Mikut, R., Hilbert, L., Fischer, R. (2023). Synchronization of oscillatory growth prepares fungal hyphae for fusion. *eLife*, 12: e83310.

Youssar, L., Wernet, V., Hensel, N., Yu, X., Hildebrand, H.-G., Schreckenberger, B., **Kriegler, M.**, Hetzer, B., Frankino, P., Dillin, A., Fischer, R. (2019). Intercellular communication is required for trap formation in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *PLoS Genet.*, 15(3): e1008029.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
<b>1. Abstract</b> .....	3
<b>2. Einleitung</b> .....	5
2.1 Falleninduktion und Morphogenese .....	7
2.2 Virulenzfaktoren .....	8
2.3 Polares Wachstum.....	12
2.4 Zellendmarkerproteine.....	14
2.5 Reaktive Sauerstoffspezies und NADPH-Oxidasen.....	16
2.6 Zell-Zell-Kommunikation .....	20
<b>3. Ergebnisse</b> .....	25
<b>3.1 Zellendmarker</b> .....	25
3.1.1 Die Zellendmarker von <i>S. pombe</i> und <i>A. nidulans</i> sind in <i>A. flagrans</i> konserviert. ....	25
3.1.2 TeaA, TeaC und TeaR lokalisieren an Hyphenspitzen und Septen und kolokalisieren mit Chitinsynthasen .....	28
3.1.3 Zellendmarker repositionieren sich während Richtungsänderungen der Hyphen ...	31
3.1.4 Die Deletion der CEMPs und die Überexpression von <i>teaA</i> führen zu veränderter Morphologie der Kolonie.....	33
3.1.5 Die Deletion von <i>teaR</i> führt zu mäanderndem Hyphenwachstum, während die Deletion von <i>teaA</i> und <i>teaC</i> sowie die Überexpression von <i>teaA</i> Defekte in der Hyphenfusion verursachen.....	35
3.1.6 Die Deletion von <i>teaA</i> , <i>teaC</i> und <i>teaR</i> sowie die Überexpression von <i>teaA</i> führen zu veränderter Fallenmorphologie .....	37
<b>3.2 NADPH-Oxidasen</b> .....	39
3.2.1 Das Genom von <i>A. flagrans</i> enthält 2 konservierte NADPH-Oxidasen sowie ein Tetraspanin PlsA und den Aktivator NoxR .....	39
3.2.2 Die Genexpression von <i>noxB</i> , <i>plsA</i> und <i>noxR</i> ist während der pathogenen Phase hochreguliert, während <i>noxA</i> herunterreguliert ist.....	41
3.2.3 NoxA lokalisiert an der Zytoplasmamembran in vegetativen Hyphen, während NoxB und PlsA in vesikelförmigen Strukturen in Fallen lokalisieren.....	44
3.2.4 Die Deletion von <i>noxA</i> und <i>noxR</i> führt zu einer Beeinträchtigung der Hyphenfusion .....	47
3.2.5 NoxB, PlsA und NoxR sind essenziell für die Virulenz, während NoxA keinen signifikanten Einfluss zeigt.....	49

3.2.6 Die Deletion von <i>noxA</i> , <i>noxB</i> , <i>noxR</i> oder <i>plsA</i> führt zu keiner Beeinträchtigung der Fallenproduktion oder der Nematodenpenetration .....	50
3.2.7 Die Überexpression von <i>noxA</i> und <i>noxR</i> zeigt eine geringe Beeinträchtigung des Wachstums .....	52
3.2.8 Verschiedene Gene werden durch NoxA und NoxB reguliert .....	53
3.2.9 Visualisierung der ROS-Konzentration mithilfe von CellROX Orange, OxyBURST Green H <sub>2</sub> HFF-BSA und Nitroblautetrazoliumchlorid .....	55
3.2.10 NoxR oszilliert an der Hyphenspitze .....	56
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>58</b>
4.1 Die Zellendmarker TeaA, TeaC und TeaR weisen eine dynamische Lokalisation an der Hyphenspitze auf .....	58
4.2 Die Deletion der CEMPs führt zu einer veränderten Fallenmorphogenese .....	61
4.3 Expressions- und Lokalisationsanalysen zeigen eine räumlich-zeitliche Differenzierung der NADPH-Oxidasen .....	65
4.4 Die Oszillation von NoxR an der Hyphenspitze deutet auf eine Oszillation von ROS hin .....	67
4.5 Die Deletion von <i>noxA</i> und <i>noxB</i> führt zu unterschiedlichen Phänotypen.....	69
4.6 Korrelationen zwischen Zellendmarkern und NADPH-Oxidasen an der Hyphenspitze	72
4.7 Fazit .....	75
<b>5. Material &amp; Methoden</b> .....	<b>76</b>
5.1 Chemikalien und Geräte .....	76
5.2 Kultivierung von Organismen .....	77
5.3 Molekularbiologische Methoden .....	86
5.4 Mikroskopie-, Bild- und Datenanalyse.....	101
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>103</b>

# 1. Zusammenfassung

Pilze stellen eine anpassungsfähige Gruppe von Mikroorganismen dar, die eine Vielzahl von Überlebensstrategien verfolgen. Eine besondere Gruppe bilden die Nematoden-fangenden Pilze (*nematode-trapping fungi*, NTF), die unter nährstoffarmen Bedingungen die Fähigkeit besitzen, von einem saprotrophen zu einem räuberischen Lebensstil zu wechseln. Kennzeichnend für diesen Übergang ist die Ausbildung spezialisierter Fallenstrukturen, mit deren Hilfe Nematoden gefangen und verdaut werden können. Die Differenzierung vegetativer Hyphen zu diesen komplexen Fangstrukturen wird durch zelluläre Signalkaskaden reguliert, wobei die Wahrnehmung von Ascarosiden, einer Gruppe von Pheromonen, die von den Nematoden sekretiert werden, eine zentrale Rolle spielt.

Der NTF *Arthrobotrys flagrans* bildet charakteristische ringförmige, adhäsive Fallennetzwerke aus. Die Krümmung der Hyphe zu einer geschlossenen Ringstruktur erfordert eine präzise Steuerung des polaren Wachstums. Ein zentraler Faktor ist hierbei das Zytoskelett. Experimente mit Aktin-Inhibitoren zeigten, dass eine Störung des Aktinzytoskeletts die Ringbildung verhindert und stattdessen zur Ausbildung gerader, stäbchenförmiger Strukturen führt. Polaritätsvermittelnde Proteine wie Zellendmarker sind an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt und stellen somit potenzielle zentrale Faktoren für die morphologische Differenzierung während der Fallenbildung dar.

Um die Rolle von Zellendmarkern während der Fallenbildung zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit TeaA, TeaC und TeaR charakterisiert. Es handelt sich um eine Gruppe von Proteinen, die bereits in *Schizosaccharomyces pombe* und in filamentösen Pilzen wie *Aspergillus nidulans* beschrieben wurden und die Wachstumsrichtung der Hyphen beeinflussen. Mittels GFP-Lokalisation wurde gezeigt, dass die Zellendmarker in *A. flagrans* an den Hyphenspitzen und Septen akkumulieren. Die Deletion von *teaA* oder *teaC* sowie die Überexpression von *teaA* führten zu einem Verlust der Ringkrümmung, wodurch säulenförmige Fallen entstanden. Die Deletion von *teaR* resultierte in Fallen mit reduziertem Durchmesser, die jedoch weiterhin Ringstrukturen ausbilden konnten.

Für die Ausbildung einer geschlossenen Ringfalle muss die differenzierte Fallenhyphe mit der vegetativen Hyphe fusionieren. Während dieses Prozesses erfolgt ein Signalaustausch zwischen den fusionierenden Hyphen, der ihr gerichtetes Wachstum aufeinander koordiniert. Das in *Neurospora crassa* beschriebene Zelldialog-Modell erklärt diesen Vorgang durch ein oszillierendes Wechseln der Hyphen zwischen den Zuständen eines Signalsenders und eines Signalempfängers. Dabei oszilliert die Lokalisation von MAPK-assoziierten Proteinen wie SO

und MAK-2 an der Hyphenspitze. Diese Proteine stehen im Zusammenhang mit der Sekretion eines Signalmoleküls, das der Informationsübertragung zwischen den Hyphen dient, dessen Identität jedoch bislang ungeklärt ist.

An der Hyphenfusion sind zudem reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) beteiligt. Wird dem Medium experimentell ROS entzogen, verliert der Pilz die Fähigkeit zur Hyphenfusion. Die genaue Wirkungsweise von ROS während dieses Prozesses ist jedoch bislang nicht vollständig verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden die NADPH-Oxidase NoxA und NoxB in *A. flagrans* charakterisiert, ebenso der Aktivator NoxR sowie das Tetraspanin PlsA, das putativ mit NoxB interagiert. Die Deletion von *noxA* oder *noxR* führte zu einem vollständigen Verlust der Hyphenfusionsfähigkeit, sodass keine geschlossenen Fallen mehr gebildet werden konnten. Dagegen zeigte die Deletion von *noxB* oder des putativen Interaktionspartners *plsA* keine Beeinträchtigung der Hyphenfusion, jedoch war die Fangeffizienz von Nematoden signifikant reduziert. Expressionsanalysen ergaben außerdem, dass *noxA* während der pathogenen Phase herunterreguliert ist, während *noxR*, *noxB* und *plsA* hochreguliert wurden. Lokalisationsstudien mit GFP-Fusion zeigten eine Membranlokalisation von NoxA im vegetativen Myzel, während NoxB und PlsA in vesikelförmigen Strukturen an der Innenseite der Fallen lokalisiert waren. NoxR wurde überwiegend an der Hyphenspitze nachgewiesen, wo es analog zu SofT (SO) und MakB (MAK-2) antiphasische Oszillationen aufwies. Die Oszillation von NoxR ist ein deutlicher Hinweis auf eine ROS-Oszillation während des polaren Wachstums von Hyphen.

## 1. Abstract

Fungi represent a highly adaptable group of microorganisms that employ a wide range of survival strategies. A particular group is formed by the nematode-trapping fungi (NTF), which under nutrient-limited conditions possess the ability to switch from a saprotrophic to a predatory lifestyle. A characteristic feature of this transition is the formation of specialized trapping structures that enable the capture and digestion of nematodes. The differentiation of vegetative hyphae into these complex trapping structures is regulated by cellular signalling cascades, in which the perception of ascarosides, a group of pheromones secreted by nematodes, plays a central role.

The NTF *Arthrobotrys flagrans* forms characteristic ring-shaped adhesive trapping networks. The bending of the hypha into a closed ring structure requires precise control of polar growth. A central factor in this process is the cytoskeleton. Experiments with actin inhibitors have shown that disruption of the actin cytoskeleton prevents ring formation and instead leads to the development of straight, rod-shaped structures. Polarity-regulating proteins such as cell-end marker proteins are involved in the regulation of the cytoskeleton and therefore represent potential key factors for morphological differentiation during trap formation.

To investigate the role of cell-end marker proteins during trap formation, TeaA, TeaC, and TeaR were characterized in this study. These proteins belong to a group that has previously been described in *Schizosaccharomyces pombe* and in filamentous fungi such as *Aspergillus nidulans*, where they influence the growth direction of hyphae. GFP localization experiments demonstrated that the cell-end markers accumulate at hyphal tips and septa in *A. flagrans*. Deletion of *teaA* or *teaC*, as well as overexpression of *teaA*, resulted in a loss of ring curvature, leading to the formation of column-shaped traps. Deletion of *teaR* produced traps with a reduced diameter that were still able to form ring structures.

For the formation of a closed ring trap, the differentiated trapping hypha must fuse with the vegetative hypha. During this process, signal exchange occurs between the fusing hyphae, coordinating their directed growth toward each other. The cell-dialogue model described in *Neurospora crassa* explains this process by an oscillatory switching of hyphae between the states of signal sender and signal receiver. During this process, the localization of MAPK-associated proteins such as SO and MAK-2 oscillates at the hyphal tip. These proteins are associated with the secretion of a signalling molecule that mediates information transfer between the hyphae, although its identity remains unknown.

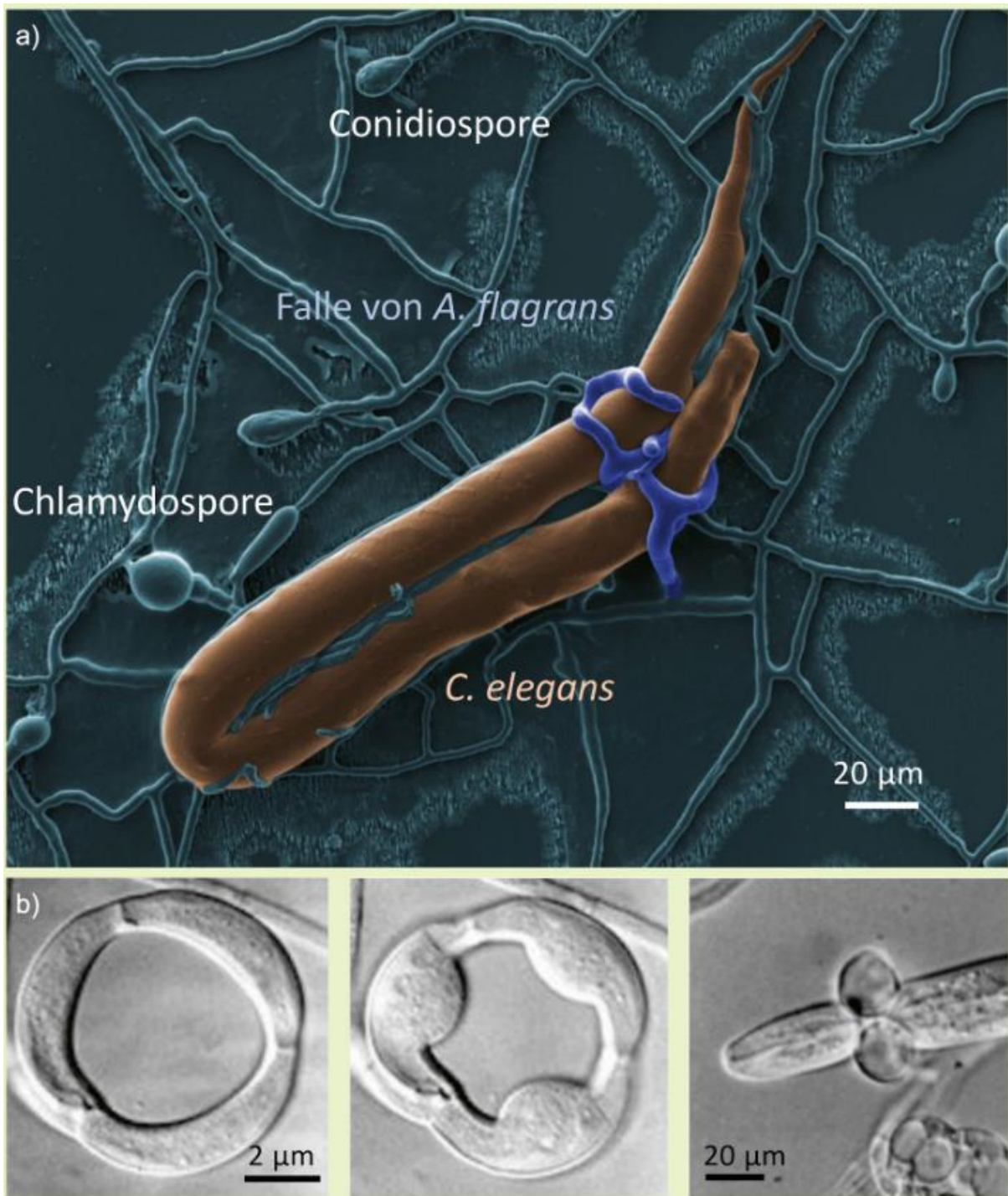
Reactive oxygen species (ROS) are also involved in hyphal fusion. When ROS are experimentally removed from the medium, the fungus loses its ability to undergo hyphal fusion.

However, the precise mechanism by which ROS function during this process is still not fully understood. In this study, the NADPH oxidases NoxA and NoxB in *A. flagrans* were characterized, as well as the activator NoxR and the tetraspanin PlsA, which putatively interacts with NoxB. Deletion of *noxA* or *noxR* resulted in a complete loss of hyphal fusion capability, preventing the formation of closed traps. In contrast, deletion of *noxB* or the putative interaction partner *plsA* did not impair hyphal fusion, although the trapping efficiency of nematodes was significantly reduced. Expression analyses further revealed that *noxA* is downregulated during the pathogenic phase, whereas *noxR*, *noxB*, and *plsA* are upregulated. Localization studies using GFP fusions showed membrane localization of NoxA in the vegetative mycelium, whereas NoxB and PlsA were localized in vesicle-like structures at the inner side of the traps. NoxR was predominantly detected at the hyphal tip, where it exhibited antiphase oscillations similar to SofT (SO) and MakB (MAK-2). The oscillation of NoxR provides strong evidence for ROS oscillations during the polar growth of hyphae.

## 2. Einleitung

Pilze gelten als ubiquitär vorkommende Mikroorganismen, die in der Lage sind, nahezu jede ökologische Nische zu besiedeln. Dies spiegelt sich in der enormen Vielfalt der Spezies wider, die sich in unterschiedlichste Formen und Überlebensstrategien entwickelt haben. Es existieren Arten, die Symbiosen eingehen, ebenso wie solche, die als Pathogene agieren. Viele Pilze sind Saprobionten, die sich von totem organischem Material ernähren und dabei eine wichtige Rolle im Nährstoffkreislauf spielen. Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich Pilze zur Untersuchung verschiedenster ökologischer Interaktionen auf mikrobieller Ebene. Eine besondere Überlebensstrategie zeigt sich bei der Gruppe der Nematoden-fangenden Pilze (*nematode-trapping fungi*, NTF). Dabei handelt es sich um eine polyphyletische Gruppe aus Basidiomyceten, Ascomyceten und Zygomyceten, die sich als Anpassung an stickstoffarme Lebensräume entwickelt hat (Barron, 2003). Unter günstigeren Nährstoffbedingungen leben diese Pilze saprotroph. Wenn sich die Nährstoffbedingungen verschlechtern und die Pilze Nematoden aus der Umgebung wahrnehmen, können sie in einen räuberischen Lebensstil wechseln, wobei je nach Spezies unterschiedliche Fallenstrukturen ausgebildet werden (Jiang et al., 2017). Fossile Funde belegen, dass dieser räuberische Lebensstil vor etwa 419 Millionen Jahren entstand, kurz nach dem Auftreten der Nematoden vor rund 550–600 Millionen Jahren (Jansson und Poinar, 1986). Durch die Möglichkeit, zusätzliche Stickstoffquellen zu nutzen, konnte sich dieser Lebensstil gegenüber rein saprotrophem Wachstum in der Evolution durchsetzen (Barron, 2003). Zu den bekannten Fallentypen zählen kontraktile Ringe, adhäsive Fallennetzwerke, gestielte adhäsive Fangknoten, adhäsive Säulen und gestielte nicht-kontraktile Ringe (Su et al., 2017) (**Abb. 1**). Mithilfe dieser Strukturen können NTF Nematoden fangen und innerhalb kurzer Zeit verdauen.

Nematoden bilden ebenfalls ein vielfältiges Phylum mit etwa 20.000 Spezies (Hugot et al., 2001). Darunter befinden sich zahlreiche Arten, die Pflanzen und Tiere als Pathogene infizieren. Der weltweite Schaden, der durch Nematoden in der Landwirtschaft verursacht wird, beläuft sich auf etwa 157 Mrd. US-Dollar pro Jahr (Abad et al., 2008). Zwar existiert bereits ein breites Spektrum chemischer Mittel zur Bekämpfung von Nematoden, jedoch stellen NTF aufgrund ihrer Fähigkeit, die Nematodenkonzentration ohne den Einsatz von Pestiziden zu reduzieren, eine biologische Alternative zum Schutz von Agrarprodukten dar.



**Abbildung 1: Fallenstrukturen verschiedener NTF.** (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Myzels von *A. flagrans* mit adhäsiven Fallen und gefangenen *Caenorhabditis elegans* Nematoden. *A. flagrans* produziert zwei Arten von Sporen: Chlamydosporen und Konidiosporen. (b) Fallenstruktur von *Drechslerella dactyloides*. Im Gegensatz zu *A. flagrans* sind die Fallen nicht adhäsiv, sondern verdicken sich bei Kontakt mit Nematoden durch osmotische Mechanismen (Emser et al., 2022).

## 2.1 Falleninduktion und Morphogenese

Da die Fallenbildung bei NTF mit erheblichen energetischen Kosten verbunden ist, wird dieser Prozess nur unter Umweltbedingungen ausgelöst, die dem Pilz einen entsprechenden Vorteil verschaffen. Unter günstigen Nährstoffbedingungen bilden NTF keine Fallen, da keine Notwendigkeit besteht, zusätzliche Ressourcen zu investieren. Zudem wird die Fallenproduktion nur eingeleitet, wenn der Pilz Moleküle wahrnimmt, die von Nematoden stammen. Hierbei handelt es sich um sogenannte Ascaroside, von Nematoden sezernierte Glykolipide, die als Signalmoleküle zwischen Individuen fungieren (Ludewig, 2013). Es sind über 150 verschiedene Ascaroside bekannt, die unterschiedliche soziale Interaktionen beeinflussen, wie Sexualverhalten, aber auch Stressreaktionen und Nahrungsantworten (Choe et al., 2012). NTF besitzen spezielle G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), welche die Induktion der Fallen regulieren (Kuo et al., 2024). Diese können Ascaroside binden und dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen, welche die Fallenbildung einleitet. Für *A. flagrans* konnte gezeigt werden, dass GprC nach Ascarosidbindung von der Zellmembran in die Mitochondrien transloziert und dort die ATP-Produktion steigert, wodurch zusätzliche Energie für die Fallenbildung bereitgestellt wird (Hu et al., 2024). In *A. oligospora* wurde zudem nachgewiesen, dass bestimmte Bakterienkulturen die Fallenproduktion induzieren (Wang et al., 2014). Es wird angenommen, dass von Bakterien freigesetzter Harnstoff als Signal wirkt und NTF zur Fallenbildung stimuliert, wodurch Nematoden als bakterielle Fressfeinde eliminiert werden.

Durch Aktivierung von GPCR-Untereinheiten werden verschiedene Signalkaskaden ausgelöst, die die Fallenbildung einleiten. In *A. oligospora* konnte gezeigt werden, dass mehrere Signalwege essenziell für diesen Prozess sind, darunter die mitogen-aktivierten Proteinkinasen Slt2 (MAK-1, *cell wall integrity pathway*, CWI), Fus-3 (MAK-2, Pheromon-Signalweg) und Hog1 (HOG-Signalweg, *high osmolarity glycerol*) (Chen et al., 2021; Kuo et al., 2020; Zhen et al., 2018). Dabei ist zu beachten, dass die Funktion homologer Proteine je nach NTF-Spezies variieren kann. Während die Deletion des Proteins Fus3 in *A. oligospora* (AoFus3) zu einer signifikanten Reduktion der Fallenproduktion führt, verursacht die Deletion des homologen Proteins in *A. flagrans* (MakB) primär einen Verlust der Zellfusion, ohne die Fallenzahl drastisch zu reduzieren (Haj Hammadeh et al., 2022). Zusätzlich werden über den cAMP- (zyklisches Adenosinmonophosphat) und PKA- (Proteinkinase A) Signalweg weitere Prozesse der Fallenformation reguliert, die vermutlich wachstumssteuernde Funktionen erfüllen (Chen et al., 2022; Zhu et al., 2022). Auch die Deletion der Proteine Pex1, Pex6 und Hex1 führt zum Verlust der Fallenbildung, was darauf hindeutet, dass korrekt ausgebildete Peroxisomen und

Woronin-Bodies für die Generierung eines erhöhten Turgordrucks in Fallenzellen notwendig sind (Liang et al., 2017; Liu et al., 2022). RNA-Seq-Analysen zeigten zudem eine Beteiligung zahlreicher Autophagie-Gene. Entsprechend verhindert die Deletion der Autophagosom-assoziierten Proteine Atg1, Atg4 und Atg5 ebenfalls die Fallenbildung (Zhou et al., 2022b, 2022a, 2020). Darüber hinaus blockieren die vom Pilz produzierten Sekundärmetabolite 6-MSA und Arthrosporol die Fallenformation in *A. flagrans* (Yu et al., 2021). Der Pilz kann über die Expression von Polyketidsynthasen, die an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sind, die Anzahl der gebildeten Fallen regulieren. Diese Enzyme sind nahe der Hyphenspitze sowie in der Nähe von Sporen hochreguliert. Die Wahrnehmung von Ascarosiden hemmt anschließend die Expression der Polyketidsynthasen, wodurch die Fallenbildung ausgelöst wird.

Die Fallenzellen weisen charakteristische morphologische Merkmale auf, darunter einen vergrößerten Durchmesser und eine umgebende adhäsive Schicht. Fertige Fallen bestehen typischerweise aus zwei bis vier Kompartimenten und die vollständige Ausbildung dauert etwa ein bis zwei Stunden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten außerdem zahlreiche noch unidentifizierte Organellen, die als *electron-dense bodies* bezeichnet werden (Veenhuis et al., 1984). Für die Krümmung der Fallen muss der Pilz das polare Wachstum präzise regulieren. Zentraler Akteur ist hierbei das Zytoskelett, das die gerichtete Vesikelsekretion und damit das polare Wachstum steuert. Frühere Studien zeigten, dass die Behandlung mit Cytochalasin während der Fallenbildung zu geraden, stabförmigen statt schlingenförmigen Fallen führt (Wernet et al., 2022). Ähnliche Phänotypen treten nach Deletion von Komponenten des STRIPAK-Komplexes (*striatin-interacting phosphatase and kinase*) auf, einem multiproteinären Regulationskomplex, der in Eukaryoten als Schalter für Signalwege und Zytoskelettorganisation fungiert (Wernet et al., 2022). Am Ende der Entwicklung muss die Fallenhyphe mit der basalen Hyphe fusionieren, um eine geschlossene Ringfalle zu bilden.

## 2.2 Virulenzfaktoren

Im Verlauf der Evolution kam es bei NTF zu einer Expansion von Genfamilien, die mit der Pathogenität assoziiert sind und an der Erkennung, dem Fang und der Verdauung von Nematoden beteiligt sind. Eine gängige Methode, um diese Proteine zu identifizieren, besteht in Transkriptomanalysen. Dabei werden Datensätze erstellt, die die Genexpression des Pilzes während der saprotrophen und während der pathogenen Phase abbilden. Analysen zeigten, dass Adhäsine, Polyketidsynthasen, extrazelluläre Peptidasen, lytische Enzyme, WSC-Proteine,

Lektine und eine Vielzahl an SSPs (*small secreted proteins*) hochreguliert sind (Andersson et al., 2014).

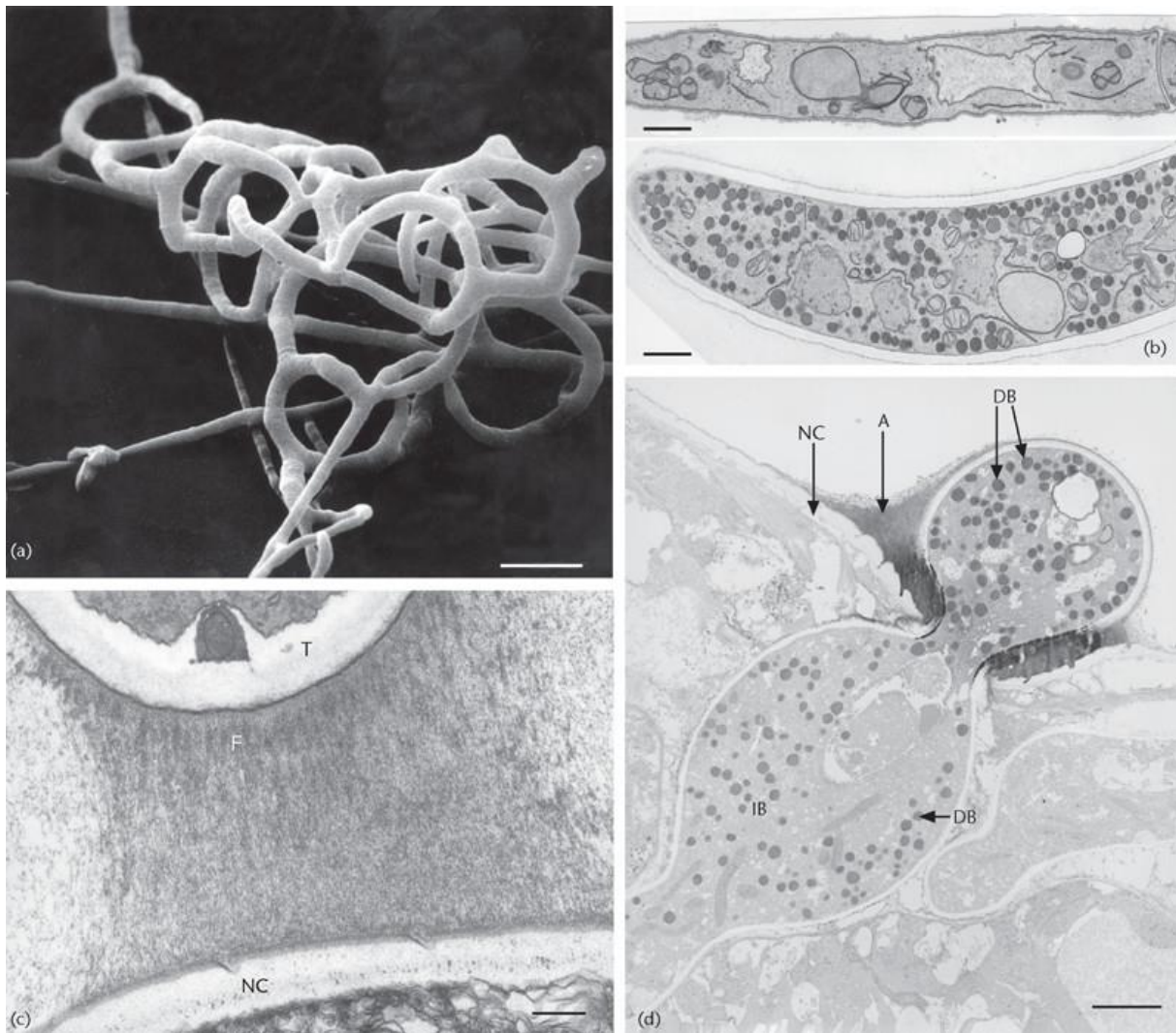
Um Nematoden in die Falle zu locken, produzieren NTF volatile Lockstoffe wie Methyl-3-methyl-2-butenolat (MMB), Dimethyl-Disulfid (DMDS), 2-Methyl-1-butanol (MB), *S*-Methylthioacetat (SMT), 2,4-Dithiapentan (DTP) und 6-Methylsalicylsäure (6-MSA) (Hsueh et al., 2017; Yu et al., 2021). Es wurde gezeigt, dass diese Substanzen die Geruchsneuronen in *C. elegans* aktivieren und von den Tieren als attraktiv wahrgenommen werden.

Die meisten NTF-Spezies, wie auch *A. flagrans*, besitzen eine adhäsive Schicht auf der Fallenoberfläche (**Abb. 2**). In dieser Schicht wurden spezielle Fibrillen beschrieben, die zwischen Pilz und Nematode vorkommen, deren Natur jedoch ungeklärt ist (Nordbring-Hertz et al., 2006). Nematoden, die mit dieser Schicht in Kontakt kommen, bleiben schnell daran haften, auch wenn sie sich nicht direkt in der Schlingfalle befinden. Dabei weisen Fallen mit adhäsiven Knoten die dickste adhäsive Schicht auf, mit einer Dicke von 20 µm, während Fallen mit der Form von adhäsiven Säulen eine Schicht mit 2 µm Dicke besitzen. Spezies wie *A. flagrans* mit adhäsiven Fallennetzwerken besitzen mit 0,1–0,2 µm die dünnste adhäsive Schicht (Ji et al., 2020). Es wird vermutet, dass sich im Laufe der Evolution die Morphologie der Fallen immer weiter vereinfacht hat und die Anzahl der Gene, die mit Adhäsion assoziiert sind, zugenommen hat. Massenspektrometrische Analysen ergaben, dass der Klebstoff größtenteils aus neutralen Zuckern (75 %), Uronsäure (6 %) und Proteinen (19 %) besteht (Tunlid et al., 1992). Bis heute ist jedoch unklar, welche Proteine konkret am Aufbau des Klebstoffs beteiligt sind. Lange Zeit wurde angenommen, dass Lektinproteine eine zentrale Rolle spielen (Nordbring-Hertz und Mattiasson, 1979; Rosén et al., 1992). Deletionsmutanten der entsprechenden Gene zeigten jedoch keinen auffälligen Phänotyp (Balogh et al., 2003). Stattdessen konnte eine Proteingruppe mit DUF3129-Domäne identifiziert werden, die in Fallen von *A. oligospora* stark exprimiert ist (TEP, *trap-enriched proteins*) (Lin et al., 2023). Für den  $\Delta tep1$ -Stamm wurde gezeigt, dass im Vergleich zum Wildtyp (WT) nur etwa 10 % der Nematoden gefangen wurden, obwohl die Fallenzahl unverändert blieb. Die genaue Funktion dieses Proteins ist bislang unbekannt, es wird jedoch ein Zusammenhang mit der Adhäsion vermutet.

Nachdem Nematoden gefangen wurden, treten diese in einen Zustand der Paralyse ein, in dem sie zwar noch leben, sich jedoch nicht mehr bewegen können. Es wird angenommen, dass NTF Substanzen sekretieren, die diesen Zustand auslösen, wobei die chemische Identität dieser Faktoren bislang ungeklärt ist. Möglicherweise spielen körpereigene Neuropeptide der Nematoden eine Rolle, die einen schlafähnlichen Zustand induzieren (Sinner et al., 2021).

Hinweise deuten darauf hin, dass dieser Zustand über Opioidrezeptor-abhängige Signalwege vermittelt wird (Pop et al., 2024). Dabei werden Schlafneuronen wie ALA und RIS aktiviert, deren Aktivität als Marker für den Schlafzustand dient (Lin et al., 2025). Unklar ist jedoch weiterhin, in welchem Ausmaß der Pilz aktiv in diesen Prozess eingreift oder ob die Nematoden beim Eindringen des Pilzes automatisch in einen stressinduzierten Schlafzustand übergehen.

Bei NTF wurden bereits Exoenzyme charakterisiert, die bei der Paralyse und der Verdauung der Nematoden helfen (Tunlid und Jansson, 1991). Das Egh16-ähnliche Protein TrsA besitzt beispielsweise charakteristische Eigenschaften einer lytischen Polysaccharid-Monooxygenase (LPMO) und hilft dem Pilz dabei, in den Nematoden einzudringen (Emser et al., 2025). NTF nutzen zudem zahlreiche SSPs, die ausschließlich während der Fallenbildung exprimiert werden. Diese Proteine lassen sich grob nach ihrem zeitlichen Einsatz während der Infektion in frühe, mittlere und späte Stadien einteilen (Fischer und Requena, 2022). Früh exprimierte Proteine lokalisieren überwiegend an der Grenzfläche zwischen Nematode und Pilz und sind vermutlich an der Degradation der Cuticula beteiligt. NipA (*nematode-induced protein*) ist ein SSP des frühen Stadiums, dessen Deletion zu einer Verzögerung des Verdauungsprozesses führt (Emser et al., 2024). Dringt der Pilz in den Wirt ein, bildet er innerhalb des Nematoden einen Infektionsbulbus, der funktionell dem Appressorium anderer phytopathogener Pilze ähnelt. SSPs, die sich dort anreichern, werden direkt in den Nematoden sezerniert und könnten an der Paralyse, der Immunsuppression oder dem anschließenden Verdauungsprozess beteiligt sein. Die Deletion von CyrA (*cysteine-rich protein*), einem im Infektionsbulbus konzentrierten SSP, führt zu einer verzögerten Paralyse der Nematoden (Wernet et al., 2021). Die heterologe Expression von *cyrA* in Nematoden verkürzt zudem signifikant deren Lebensspanne. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist bislang ungeklärt.



**Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Fangprozesses von NTF.** (a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (SEM) eines adhäsiven Fallennetzwerks von *A. oligospora*. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ . (b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (TEM) einer vegetativen Hyphe (oben) und einer verdickten Fallenhyphe (unten). Maßstabsbalken: 1  $\mu\text{m}$ . (c) TEM-Aufnahme der adhäsiven Schicht zwischen Nematode und Falle. Fibrillen (F) im Klebstoff sind erkennbar und verlaufen von der Falle (T) zur Nematodenkutikula (NC). Maßstabsbalken: 1  $\mu\text{m}$ . (d) TEM-Aufnahme einer Falle, die in den Nematoden eindringt. Die Falle ist anhand zahlreicher elektronendichter Körper (DB) erkennbar. Zwischen Falle und Nematodenkutikula (NC) ist eine adhäsive Schicht (A) sichtbar. Ein Infektionsbulbus (IB) dringt in den Nematoden ein und ermöglicht die Ausbreitung des Pilzes im Wirtsorganismus. Maßstabsbalken: 1  $\mu\text{m}$  (Nordbring-Hertz et al., 2006).

## 2.3 Polares Wachstum

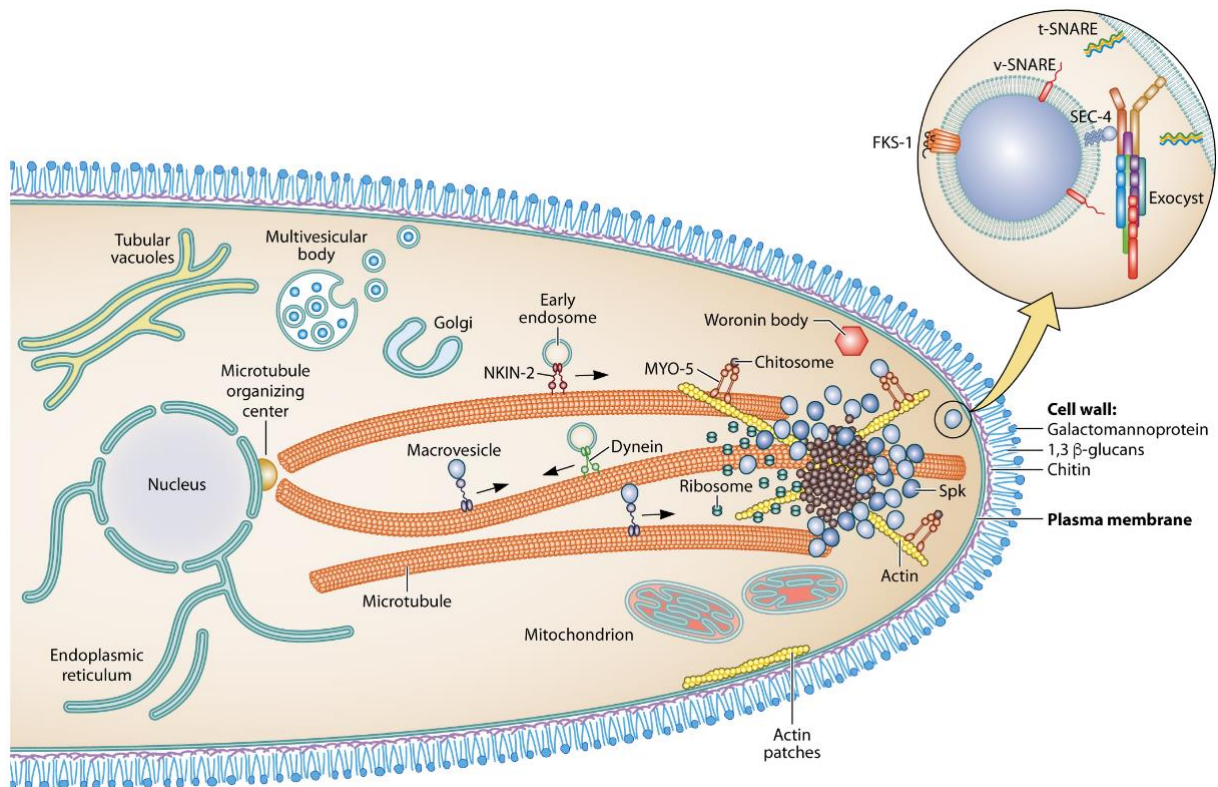
Unter Polarität versteht man in der Biologie eine räumliche Asymmetrie innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes. Beispiele hierfür sind in der Entwicklungsbiologie die Ausbildung dorso-ventraler und anterior-posteriorer Achsen oder die apikal-basale Orientierung von Epithelzellen (Nelson, 2003). Eine spezielle Form der Polarität stellt das polare Wachstum dar, bei dem sich eine Zelle nicht gleichmäßig in alle Richtungen ausdehnt, sondern ihr Wachstum auf eine definierte Stelle konzentriert und dadurch gerichtetes Wachstum ermöglicht. Ein klassisches Beispiel sind Axone von Neuronen, die abhängig von chemischen und physikalischen Signalen gezielt in eine bestimmte Richtung wachsen (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

Auch Hyphen filamentöser Pilze zeigen polares Wachstum, da ihre Expansion ausschließlich an der Hyphenspitze stattfindet. Zahlreiche zellbiologische Prozesse dieser Organismen sind auf dieses Wachstumsmuster abgestimmt (Fischer et al., 2008) (**Abb. 3**). Eine zentrale Rolle spielt dabei das Zytoskelett. Mikrotubuli, die an *microtubule organizing centers* (MTOCs) gebildet werden, dienen als Transportbahnen für den intrazellulären Langstreckentransport. Motorproteine wie Kinesin und Dynein bewegen Vesikel entlang dieser Strukturen (Konzack et al., 2005; Steinberg, 2007). Ein großer Anteil dieser Vesikel enthält wachstumsrelevante Proteine, die über Mikrotubuli zur Hyphenspitze transportiert werden. Dazu zählen unter anderem Chitinsynthasen (Chs), die in spezielle Mikrovesikel verpackt sind, sowie 1,3- $\beta$ -Glucan-Synthasen (Fks) in Makrovesikeln, die das Glucangerüst der Zellwand aufbauen (Sánchez-León et al., 2011; Sánchez-León und Riquelme, 2015). Zusätzlich sind Glycosyltransferasen und Hydrolasen beteiligt, die die Zellwandstruktur modulieren, indem sie bestehende Polymere auflockern und neu vernetzen (Mouyna und Fontaine, 2014). Die Exozytose ist auf den apikalen Bereich beschränkt und wird durch den wenige Mikrometer hinter der Spitze lokalisierten endozytotischen Ring räumlich definiert (Shaw et al., 2011). An der Hyphenspitze sammeln sich die Vesikel zu einer Struktur, die als Spitzenkörper bezeichnet wird. In diesem Bereich ist auch das Aktinzytoskelett besonders stark ausgeprägt und vermittelt den Kurzstreckentransport (Riquelme und Sánchez-León, 2014). Myosinmotorproteine transportieren Vesikel vom Spitzenkörper zur Plasmamembran, wo diese fusionieren und ihre Fracht freisetzen, beispielsweise Zellwandsyntheseenzyme wie Chitinsynthasen. Dieser Sekretionsprozess erfolgt nicht kontinuierlich, sondern pulsatil (López-Franco et al., 1994). Dabei kommt es zu periodischen Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration. Ein Calciumanstieg, ausgelöst durch Calciumkanäle und nachgeschaltete calciumabhängige Signalwege, führt zum lokalen Abbau von Aktinstrukturen und ermöglicht die Fusion der Vesikel mit der Membran (Hyde und Heath, 1997; Takeshita et al., 2017). Entsprechend verläuft

auch das Wachstum der Hyphe nicht stetig, sondern in rhythmischen Schüben, die mit messbaren Calciumoszillationen korrelieren.

Die Hyphenspitze wächst zudem nicht homogen über ihre gesamte Oberfläche. Untersuchungen zur Lokalisation von Polaritätsproteinen wie CEMPs (*cell-end marker proteins*) zeigen, dass sich dort räumlich begrenzte Areale befinden, in denen gezielt neues Zellwandmaterial synthetisiert und gleichzeitig bestehende Zellwandstrukturen aufgelockert werden (Chevalier et al., 2023; Ishitsuka et al., 2015). Für ein stabiles Wachstum muss die Zelle dabei ein Gleichgewicht zwischen Zellwandsynthese und -remodellierung aufrechterhalten. Eine zu starke Synthese würde die Zellwand zu starr machen und die Expansion verhindern, während eine zu dünne Zellwand dem inneren Turgordruck nicht standhalten könnte (Wessels et al., 1990). Diese dynamischen Wachstumszonen werden vermutlich durch Faktoren wie Zellwand-Stresssensorproteine der WSC-Familie reguliert (Valiante et al., 2015). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass schnell wachsende Pilze wie *N. crassa* einen erhöhten Turgordruck aufweisen, der die Ausdehnung der Hyphe mechanisch antreibt (Fukuda et al., 2021).

An der Hyphenspitze befinden sich außerdem verschiedene Polaritätsregulatoren, die Zytoskelettorganisation und Vesikelsekretion koordinieren. Rho-GTPasen wie Cdc42 und Rac1 fungieren hierbei als zentrale Steuerproteine (Harris, 2011; Johnson, 1999). Die Aktivität von Cdc42 hängt vom gebundenen Guanosin triphosphat (GTP) ab. In GTP-gebundener Form ist es aktiv. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) fördern die Aktivierung durch Austausch von GDP gegen GTP, während GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) durch Beschleunigung der GTP-Hydrolyse eine negative Regulation vermitteln (Scheffzek und Ahmadian, 2005). Aktivierte Rho-GTPasen können unter anderem Formine rekrutieren und dadurch die Aktinpolymerisation initiieren. Darüber hinaus interagieren sie mit Komponenten des Exocyst-Komplexes, etwa Sec3 und Exo70, einem multiproteinären Tethering-Komplex, der die zielgerichtete Vesikelsekretion an der Wachstumsstelle steuert und damit zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität beiträgt (Riquelme et al., 2014; Zuriegat et al., 2024).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Komponenten des polaren Wachstums an der Hyphenspitze filamentöser Pilze.** Vesikel werden über Motorproteine zum Spitzenkörper transportiert. Dort befinden sich Makrovesikel, die 1,3-β-Glucan-Synthasen enthalten, sowie Mikrovesikel mit Chitinsynthasen. Entlang von Aktinfilamenten werden die Vesikel anschließend zum Exocyst-Komplex weitergeleitet. Spezifische Erkennungsproteine, die v-SNAREs und t-SNAREs, vermitteln die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran, wodurch deren Inhalt extrazellulär freigesetzt wird (Riquelme et al., 2018).

## 2.4 Zellendmarkerproteine

Zellendmarkerproteine (CEMPs, *cell-end marker proteins*) wurden erstmals in *S. pombe* beschrieben (Mata und Nurse, 1997; Snell und Nurse, 1994). Dieser Organismus wächst typischerweise stäbchenförmig und besitzt zwei Zellenden. Nach der Zellteilung entstehen neue Zellpole, an denen die Polarität zunächst neu etabliert werden muss, bevor dort Wachstum einsetzen kann. Dieser Prozess wird als NETO (*new end take off*) bezeichnet (Martin und Chang, 2005).

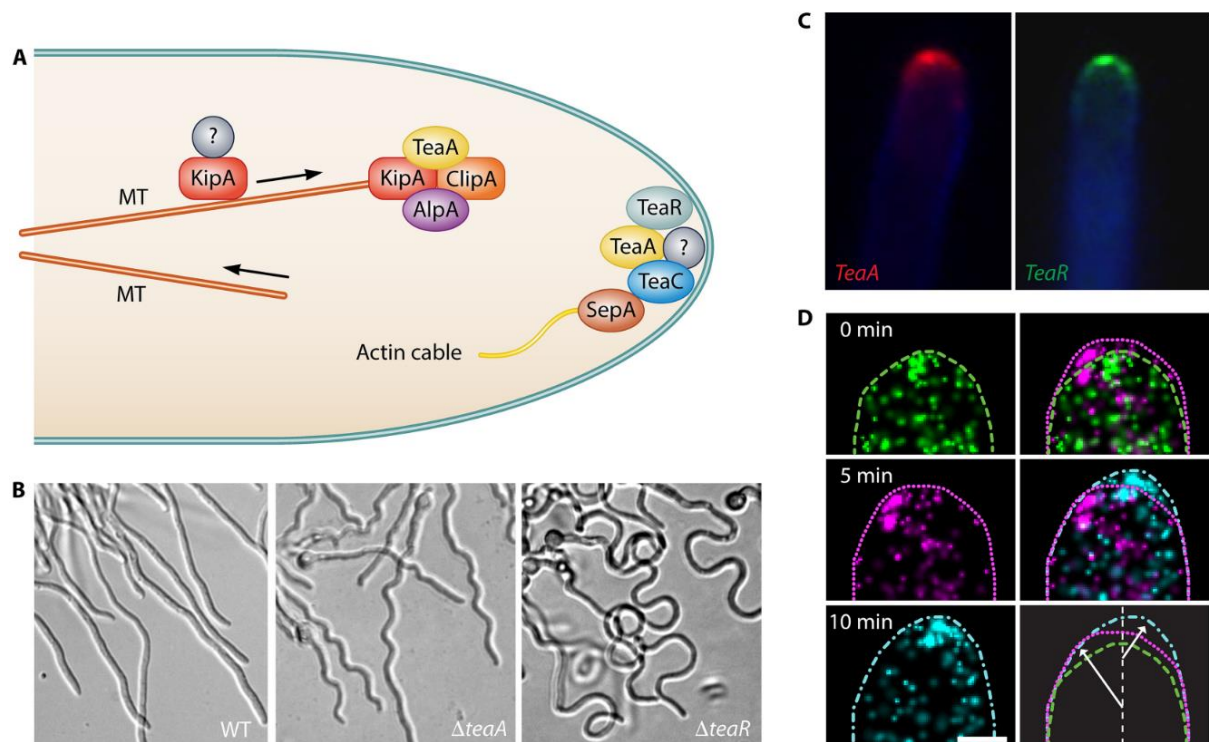
In Mutagenese-Screenings, bei denen gezielt nach temperatursensitiven Mutanten mit morphologischen Veränderungen gesucht wurde, konnten mehrere Proteine identifiziert werden, die für die Ausbildung der Zellpolarität essenziell sind. Darunter befand sich eine Gruppe sogenannter Tea-Proteine (*tip elongation aberrant*) (Mata und Nurse, 1997). Diese Proteine bilden einen Polaritätskomplex, zu dem unter anderem Tea1 gehört, ein Kelch-Domänen-Protein, das über das Kinesin Tea2 entlang von Mikrotubuli an die Zellspitze

transportiert wird (Browning et al., 2000). Dort bindet Tea1 an das prenylierte Membranprotein Mod5 und rekrutiert anschließend Tea4/Wsh3 (Snaith und Sawin, 2003; Tatebe et al., 2005). Dieses wiederum bindet das Forminprotein For3, welches die Polymerisation von Aktinfilamenten vermittelt. Die lokale Anreicherung von Aktin an der Membran bestimmt schließlich die Position, an der Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren (Ishitsuka et al., 2015; Martin et al., 2005).

In *S. pombe* wurde außerdem gezeigt, dass Tea4 sowohl die Phosphatase Dis2 als auch die DYRK-Kinase Pom1 rekrutiert (Kokkoris et al., 2014; Tatebe et al., 2008). Diese Proteine regulieren die Lokalisation von GAP- und GEF-Faktoren, welche wiederum die Aktivität der Rho-GTPase Cdc42 modulieren, einem zentralen Regulator der Etablierung polarer Wachstumszonen. Ein vergleichbarer Mechanismus konnte in filamentösen Pilzen bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden.

In filamentösen Pilzen wurden CEMPs erstmals in *A. nidulans* beschrieben (Takeshita et al., 2008) (**Abb. 4**). Diese Proteine weisen auf Sequenzebene nur geringe Ähnlichkeit zu ihren homologen Proteinen aus *S. pombe* auf, was ihre Identifikation durch rein bioinformatische Ansätze erschwerte. Dennoch zeigen sie eine vergleichbare funktionelle Organisation. TeaA besitzt ebenfalls Kelch-Domänen, TeaC enthält eine SH3-Domäne und TeaR verfügt über ein C-terminales CAAX-Motiv (Higashitsuji et al., 2009; Takeshita et al., 2008). Die Deletion dieser Proteine in *A. nidulans* führt zu Defekten im polaren Wachstum, die sich unter anderem in sehr kurvigem Hyphenwachstum äußern. Dieser Phänotyp ist besonders ausgeprägt bei Verlust von TeaR, dem Ortholog von Mod5. Untersuchungen in *A. nidulans* zeigten zudem, dass diese Proteine dynamische Akkumulationen bilden, die an der Hyphenspitze lokalisiert sind (Ishitsuka et al., 2015). Dabei können ein oder mehrere konzentrierte Areale entstehen, deren Position mit der Wachstumsrichtung der Hyphe korreliert. Vermutlich wird dieser Prozess durch eine positive Rückkopplungsschleife gesteuert, bei der neu gebildetes Aktin die Rekrutierung zusätzlicher Mikrotubuli fördert. Es wurde gezeigt, dass das Mikrotubuli-Leitprotein MigA, welches sich am Plus-Ende von Mikrotubuli befindet, mit Myosin-V am Aktin interagiert und so zur Wachstumsstelle transportiert wird (Manck et al., 2015). Dies führt zu einer verstärkten Anlieferung von Zellendmarkern und weiteren wachstumsrelevanten Vesikeln. Darüber hinaus interagieren CEMPs mit der Mikrotubuli-Polymerase AlpA und beeinflussen dadurch direkt die Dynamik des Mikrotubuliwachstums (Takeshita et al., 2013). In Abwesenheit von TeaA krümmen sich Mikrotubuli um die Hyphenspitze und wachsen in Richtung des subapikalen Bereichs. Diese Befunde legen nahe,

dass CEMPs essenziell für die koordinierte Organisation des Zytoskeletts sind und dadurch ein gerichtetes sowie oszillierendes Wachstum ermöglichen.



**Abbildung 4: Lokalisation der Zellendmarker und Phänotyp der Deletionsstämme in *A. nidulans*.** (A) Schematische Darstellung der Interaktionspartner der Zellendmarker. KipA transportiert den Zellendmarker TeaA zur Hyphenspitze. AlpA (Mikrotubuli-Polymerase) und ClipA (*plus-end tracking protein*) fördern das gerichtete Wachstum der Mikrotubuli zur Spitze. TeaA interagiert dort mit dem membranverankerten Protein TeaR und rekrutiert TeaC, welches anschließend das Formin SepA bindet. Dadurch kommt es zur Polymerisation von Aktinfilamenten, entlang derer weitere Vesikel transportiert werden. (B) Phänotyp der Deletionsstämme  $\Delta teaA$  und  $\Delta teaR$  in *A. nidulans*. Im Vergleich zum WT zeigen die  $\Delta teaA$ - und  $\Delta teaR$ -Stämme ein kurvig-wachsendes Hyphenwachstum. (C) Lokalisation von TeaA und TeaR an der Hyphenspitze. (D) Dynamik der TeaR-Lokalisation über einen Zeitraum von 10 Minuten. Die Wachstumsrichtung der Hyphe korreliert mit der Position des Zellendmarkers (Riquelme et al., 2018).

## 2.5 Reaktive Sauerstoffspezies und NADPH-Oxidasen

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) sind eine Klasse von Molekülen, die eine reaktive Form von Sauerstoff enthalten. Dazu zählen Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ), Hydroxylradikale ( $\bullet OH$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Aguirre und Lambeth, 2010; Temple et al., 2005). Obwohl sie ursprünglich als toxisches Nebenprodukt der Atmungskette entdeckt wurden, sind sie heute als wichtige Signalmoleküle für diverse zelluläre Prozesse in Eukaryoten bekannt. Sie sind in Entwicklungsprozessen, Wirt-Pathogen-Interaktionen und Stressantworten involviert (De Gara et al., 2003; Hansberg und Aguirre, 1990). Die meisten ROS entstehen während der mitochondrialen Atmungskette und gelten als potenziell schädliche Nebenprodukte, die durch Enzyme wie Peroxidasen oder Katalasen zu  $H_2O$  entgiftet werden

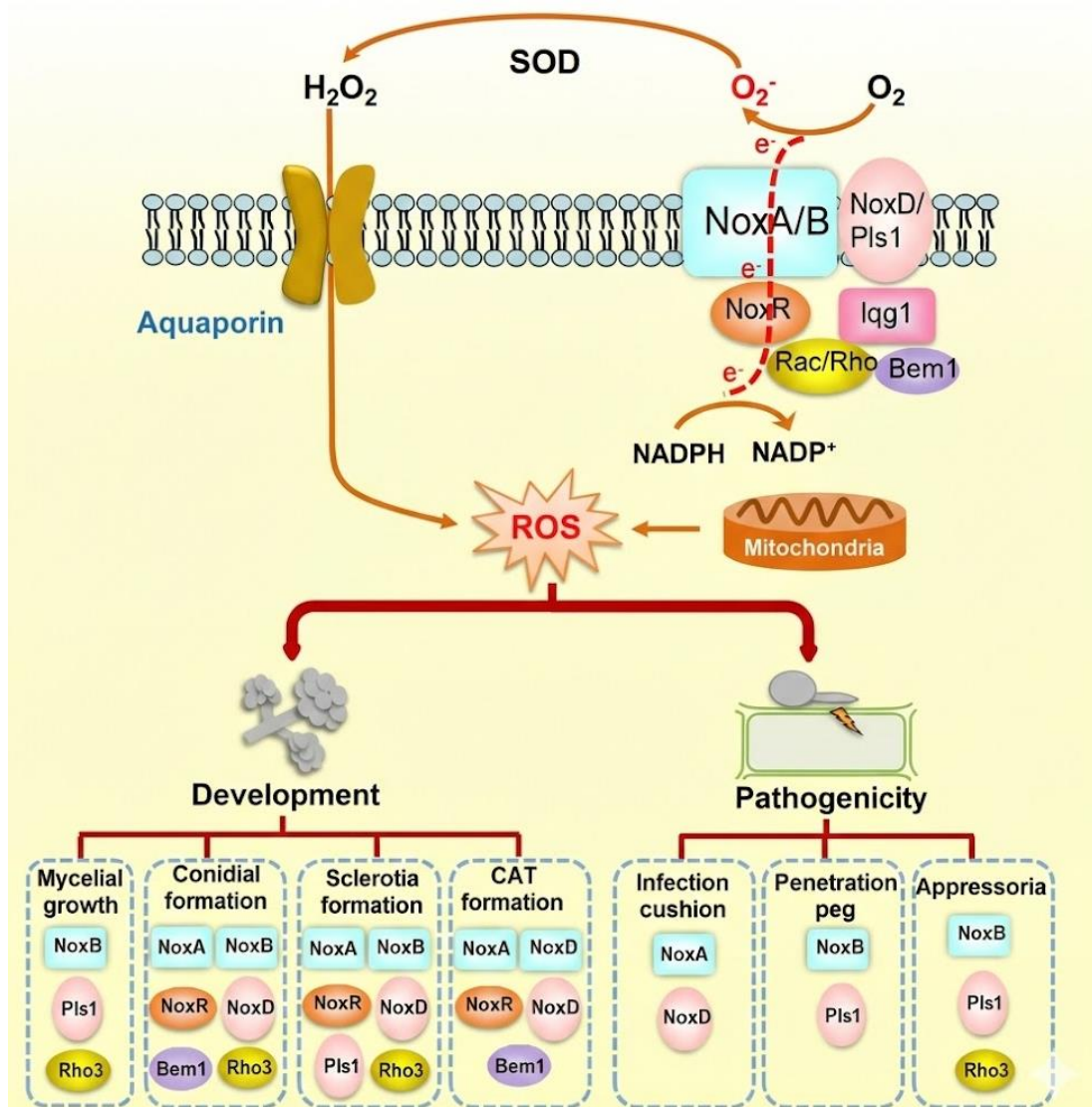
(Chelikani et al., 2004; Conesa et al., 2002).

Es existieren jedoch auch Proteine in Eukaryoten, die ROS gezielt produzieren, sogenannte NADPH-Oxidasen (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidasen, NOX) (Segal und Jones, 1979). Dabei handelt es sich um membranständige Flavocytochrome, die Häm-Gruppen enthalten. Für die ROS-Produktion wird NADPH oxidiert und gibt ein Elektron ab, das anschließend auf molekularen Sauerstoff übertragen wird. Dabei entsteht  $O_2^-$ , das mithilfe von Superoxiddismutasen (SOD) in  $H_2O_2$  umgewandelt wird (Begum et al., 2022).

In Säugetieren existieren sieben Isoformen von NADPH-Oxidasen. Dazu gehören NOX1-5 sowie DUOX1 und DUOX2 (Bedard und Krause, 2007). Sie sind in verschiedenen Geweben und Zelltypen aktiv und unter anderem an Immunabwehr, Zellproliferation und Apoptose beteiligt. Niedere Tiere wie Invertebraten besitzen dagegen meist nur 1 oder 2 *nox*-Gene, die jedoch ähnlich Funktionen erfüllen (Aguirre und Lambeth, 2010). In Pflanzen existieren ebenfalls NOX-Homologe, die als *respiratory burst oxidase homologs* (RBOHs) bezeichnet werden, wobei die Anzahl der RBOH-Gene je nach Spezies stark variiert (Bhattacharjee, 2012). Ein wesentlicher Unterschied liegt in der Aktivierung dieser Enzyme. Während tierische NOX-Proteine meist durch mehrere in einem Komplex gebundene Aktivatoren reguliert werden, ist das System in Pflanzen reduziert (Sumimoto, 2008). Stattdessen besitzen pflanzliche RBOHs eine verlängerte N-terminale Domäne mit EF-Hand-Motiven, die durch Calcium-Bindung aktiviert wird. Dadurch entstehen oszillatorische Rückkopplungsschleifen an Orten des polaren Wachstums, etwa in Wurzelhaaren (Monshausen et al., 2007). RBOHs regulieren darüber hinaus Prozesse wie Pathogenabwehr, Entwicklungsprogramme und Stressantworten (Bhattacharjee, 2012).

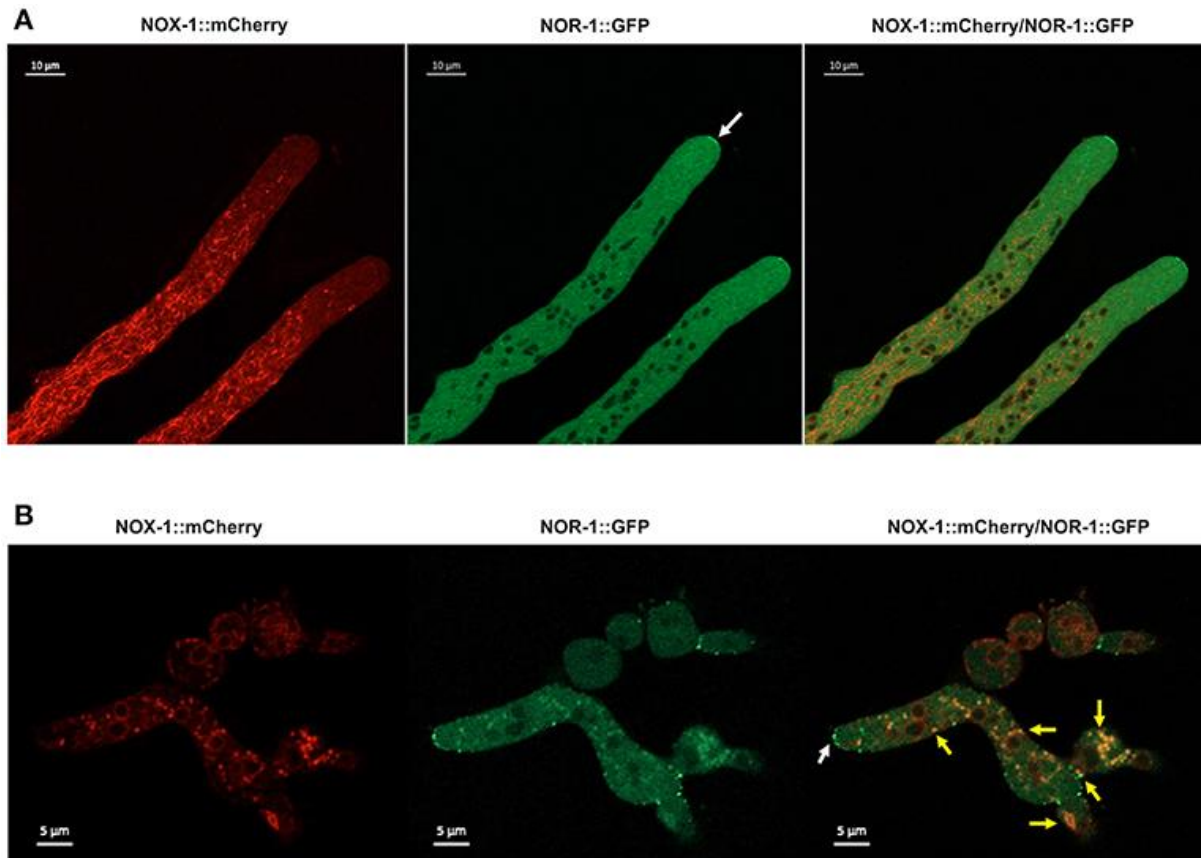
In Pilzen wurden bisher 3 verschiedene NOX-Proteine identifiziert: NoxA, NoxB und NoxC (Aguirre et al., 2005). NoxA und NoxB ähneln strukturell stark dem NOX2-Protein aus Säugetieren, das in Immunzellen an der Abtötung von Pathogenen durch ROS-Produktion beteiligt ist. NoxA und NoxB sind strukturell sehr ähnlich. Beide Proteine besitzen N-terminal meist sechs Transmembrandomänen, gefolgt von zwei FAD-Bindedomänen und vier NADPH-Bindedomänen (Zhang et al., 2020). NoxB weist zusätzlich eine kurze N-terminale Verlängerung auf. NoxC unterscheidet sich deutlich von NoxA und NoxB und wurde ursprünglich nur in acht Pilzarten beschrieben (Takemoto et al., 2007). Es enthält eine charakteristische EF-Hand-Domäne und ähnelt damit den pflanzlichen RBOH-Proteinen. Die Nox-Proteine von Pilzen fungieren als Proteinkomplex, bei dem unterschiedliche Faktoren involviert sind, um die Aktivität zu regulieren (**Abb. 5**). Ein zentraler Aktivator ist das Protein NoxR, ein Homolog des menschlichen p67<sup>phox</sup> (Takemoto et al., 2006). Weitere regulatorische

Komponenten sind Cdc24, die kleine GTPase Rac sowie die Gerüstproteine Bem1 und Iqg1, die als Signalverknüpfungspunkte verschiedener Signalwege fungieren (Marschall und Tudzynski, 2016; Takemoto et al., 2011; Tanaka et al., 2008). Zusätzlich interagieren die Transmembranproteine Pro41 (NoxD) mit NoxA und Pls1 mit NoxB. Ihre genaue Funktion ist bislang jedoch nicht vollständig geklärt (Clergeot et al., 2001; Fu et al., 2011; Nowrousian et al., 2007).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der NADPH-Oxidasen NoxA und NoxB.** NoxA und NoxB sind in der Membran verankert und interagieren dort mit weiteren Transmembranproteinen. Regulatorische Proteine wie Rac/Rho, Bem1 und Iqg1 sowie der Aktivator NoxR stimulieren die Enzymaktivität. NADPH bindet an den Komplex und wird zu NADP<sup>+</sup> oxidiert, wobei ein Elektron über das Enzym auf molekularen Sauerstoff (O<sub>2</sub>) übertragen wird und Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) entsteht. Durch Superoxiddismutasen (SOD) wird O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt, welches durch Aquaporine wieder in das Zellinnere gelangen kann. O<sub>2</sub><sup>-</sup> kann jedoch auch spontan (ohne enzymatische Katalyse durch SOD) zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagieren. Im Zellinneren regulieren ROS verschiedene Prozesse der Entwicklung und Pathogenität von Pilzen (Zhang et al., 2020).

Nox-Proteine wurden bereits in verschiedenen Pilzen wie *Botrytis cinerea*, *N. crassa*, *Magnaporthe grisea* und *Verticillium dahliae* untersucht (Cano-Domínguez et al., 2008; Egan et al., 2007; Siegmund et al., 2013; Vangalis et al., 2021) (**Abb. 6**). Die Deletion von NoxA und NoxB führt je nach Spezies zu unterschiedlichen Phänotypen, wobei primär Störungen in der Zelldifferenzierung auftreten. Dies betrifft beispielsweise die Bildung sexueller Organe (Sporen) oder spezialisierter Infektionsstrukturen wie dem Appressorium (Egan et al., 2007; Hansberg et al., 1993; Vangalis et al., 2021). Ebenfalls beeinträchtigt sind die Fähigkeit zur Hyphenfusion, das polare Wachstum und die Fähigkeit, eine Symbiose einzugehen (Cano-Domínguez et al., 2008; Semighini und Harris, 2008; Tanaka et al., 2008). Pflanzenpathogene Pilze wie *M. grisea* bilden an der Penetrationsstelle einen Aktin-Septin-Ring, um mechanisch in das Wirtsgewebe einzudringen. Da die Bildung dieses Ringes in  $\Delta noxA$ - und  $\Delta noxB$ -Mutanten gestört ist, wird vermutet, dass ROS essenziell für die Modulation des Zytoskeletts sind, was auch den Defekt im polaren Wachstum erklärt (Ryder et al., 2013). Parallel dazu wurde nachgewiesen, dass Deletionen der assoziierten Transmembranproteine Pro41 (NoxD) und Pls1 zu identischen Phänotypen führen, was deren fundamentale Bedeutung für die Nox-Funktion unterstreicht (Nowrousian et al., 2007; Zhao et al., 2016). Im NTF *Arthrobotrys oligospora* führt die Deletion von *noxA* zu einer signifikanten Reduktion der Fallenbildung (Li et al., 2017). ROS-Färbemethoden bestätigen eine gezielte Akkumulation an den Hyphenspitzen sowie an den Entstehungsorten neuer Fallen. Eine Charakterisierung von NoxB und NoxR bei NTF liegt bislang nicht vor.



**Abbildung 6: Lokalisation von NoxA (NOX-1) und NoxR (NOR-1) in *N. crassa*.** In *N. crassa* lokalisiert NoxA an der Membran von Vakuolen und der Zellmembran. NoxR weist eine zytoplasmatische Lokalisation mit verstärkter Konzentration an der Hyphenspitze auf (Cano-Domínguez et al., 2019).

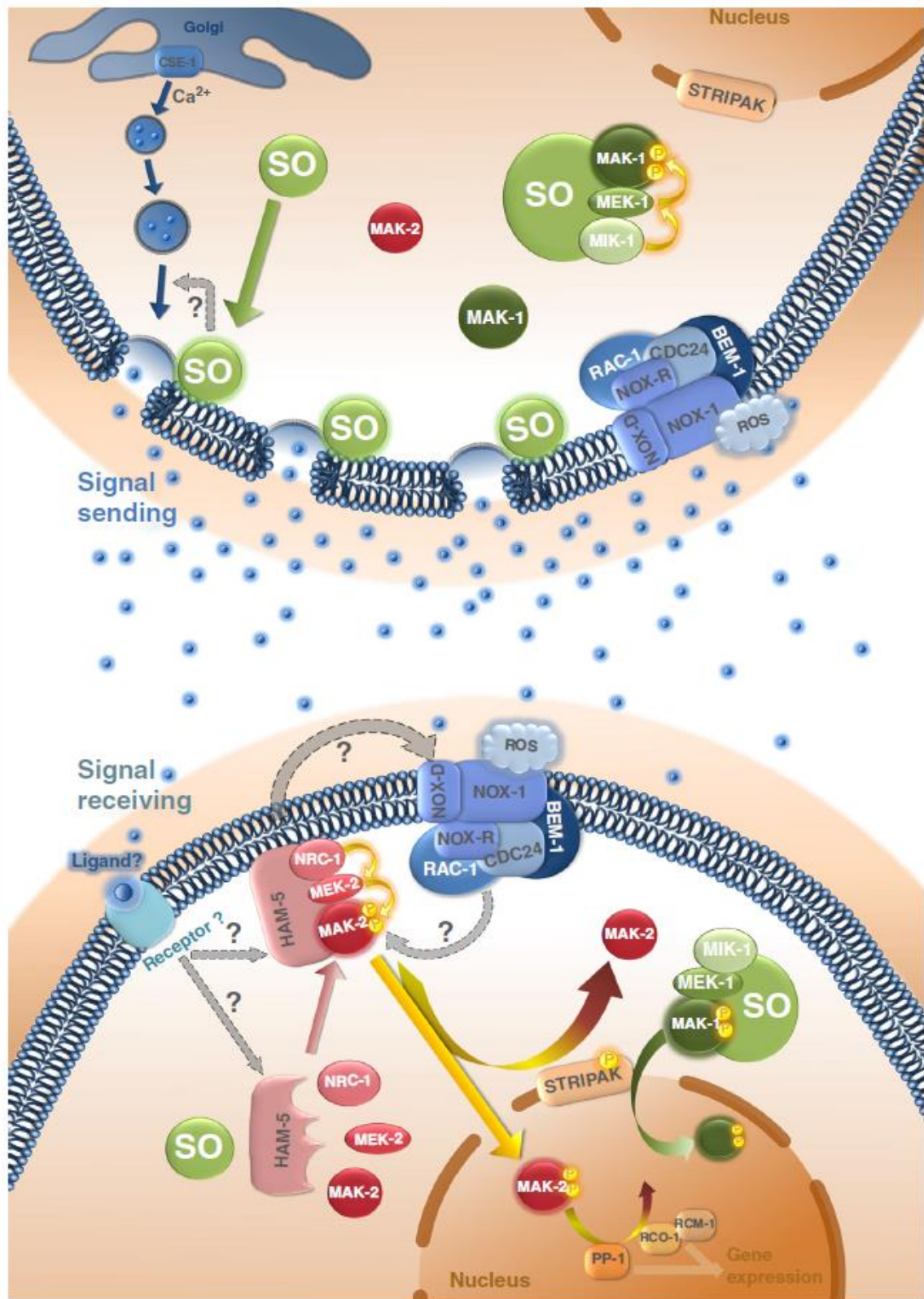
## 2.6 Zell-Zell-Kommunikation

Die Kommunikation zwischen Zellen ist ein fundamentales Werkzeug, um in multizellulären Organismen Entwicklungsprozesse zu steuern und schnell auf unterschiedliche Umstände zu reagieren (Scott und Pawson, 2009). Hierbei werden verschiedene Moleküle als Informationsüberträger genutzt. Ein bekanntes Beispiel sind Nervenzellen, die kontinuierlich miteinander kommunizieren und ihre Aktivität dynamisch anpassen (Citri und Malenka, 2008). Dabei agieren verschiedene Neurotransmitter als Informationsüberträger an benachbarte Nervenzellen (Südhof, 2013). ROS sind ebenfalls bekannte Signalmoleküle. In Fischzellen konnte gezeigt werden, dass lokal freigesetztes ROS in einer Wunde automatisch Leukozyten an die betroffene Stelle rekrutiert (Niethammer et al., 2009). In Pflanzen führt Stress zu einer ROS-Welle (Miller et al., 2010). Eine gestresste Zelle produziert ROS, das die ROS-Bildung benachbarter Zellen stimuliert. Auf diese Weise wird die gesamte Pflanze auf den Stressfaktor vorbereitet.

Auch in niederen Organismen wie Pilzen findet Zellkommunikation statt. Ein

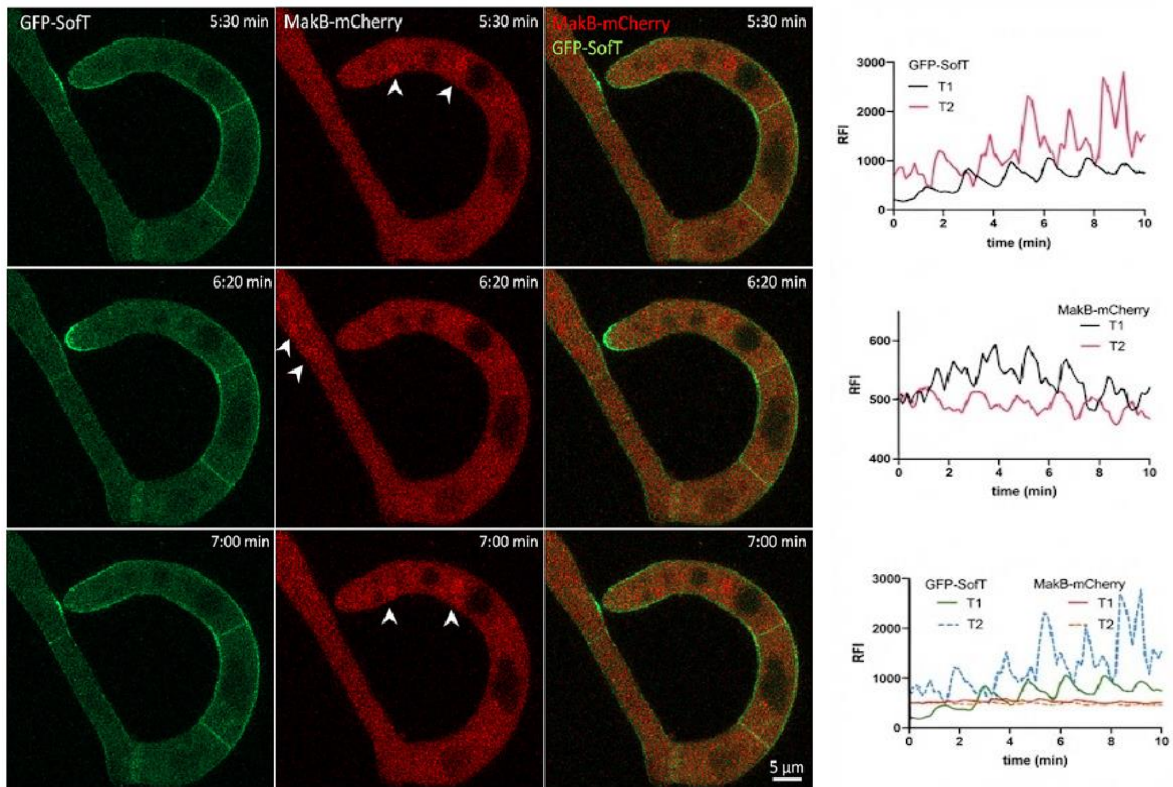
anschauliches Beispiel ist dabei die Fusion somatischer Zellen (Anastomose), wie sie bei filamentösen Pilzen auftritt (Fleißner et al., 2008) (**Abb. 7**). Dabei verschmelzen Hyphen miteinander, um ein vernetztes Hyphensystem auszubilden, das einen effizienten Austausch von Nährstoffen ermöglicht und die Stabilität innerhalb der Kolonie erhöht. Die molekularen Grundkenntnisse wurden vor allem in *N. crassa* erforscht. Der Pilz bildet in der frühen Wachstumsphase von Sporen häufig *conidial anastomosis tubes* (CATs) aus. Die Hyphen wachsen automatisch aufeinander zu, um zu fusionieren, was darauf hindeutet, dass ein Informationsaustausch zwischen den Zellen erfolgt (Fischer und Glass, 2019).

Es wurden verschiedene Gene und Signalwege identifiziert, die für die somatische Hyphenfusion essenziell sind. Der Rezeptor oder das Molekül, das die Signale überträgt, konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden. Das zugrunde liegende Prinzip wird als „Ping-Pong“-Modell bezeichnet, bei dem die interagierenden Hyphen beim Aufeinanderzuwachsen abwechselnd die Rollen von „Sender“ und „Empfänger“ einnehmen (Fleissner et al., 2009). Dieses System ist durch die abwechselnde Rekrutierung der Proteine MAK-2 (MakB) und SO (Soft) an die Hyphenspitze gekennzeichnet. In *N. crassa* akkumulieren beide Proteine an der Spitze, sobald potenzielle Fusionspartner in die Nähe gelangen. Die Rekrutierung erfolgt gegenphasig in Intervallen von 6 bis 12 Minuten. MAK-2 ist eine hochkonservierte MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) in Eukaryoten, die an verschiedenen Signalprozessen wie der Entwicklung von Sporen, Wachstum und Pathogenität beteiligt ist (Kamei et al., 2016; Román et al., 2007; Zhao et al., 2007). SO ist ein Gerüstprotein für verschiedene Proteine des *cell wall integrity*-Signalwegs (CWI) und reguliert somit den Aufbau der Zellwand (Fleißner et al., 2005). Es wird vermutet, dass SO die Sekretion des noch unbekanntes Informationsmoleküls unterstützt, jedoch ist noch wenig bekannt über die genaue Funktion des Proteins. Zudem legen Befunde nahe, dass Komponenten des MAK-2-Signalwegs auf die Bindung des Informationsmoleküls reagieren, wodurch MAK-2 in den Zellkern transportiert wird und dort Genregulation beeinflusst. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sowohl der STRIPAK-Komplex als auch NADPH-Oxidasen eine essenzielle Rolle bei der Hyphenfusion spielen (Herzog et al., 2015). Die spezifische Funktion der NADPH-Oxidasen in diesem Prozess ist jedoch weitgehend ungeklärt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Hyphenfusion zwischen zwei interagierenden Hyphen.** In der Signalsender-Hyphe (oben) wird ein bislang unbekanntes Signalmolekül mithilfe des Proteins Soft (SO) sekretiert. In der Signalempfänger-Hyphe (unten) wird ein potenzieller Rezeptor postuliert, der dieses Molekül bindet und eine Signalkaskade auslöst. Diese könnte zum Transport von MAK-1 und MAK-2 in den Zellkern führen und dort Veränderungen der Genexpression bewirken. Die molekulare Verknüpfung zwischen den MAPK-Signalwegen und NADPH-Oxidasen ist weitgehend ungeklärt (Herzog et al., 2015).

In NTF wurden bisher verschiedene Komponenten untersucht, die bei der Hyphenfusion eine Rolle spielen. Interessanterweise unterscheiden sich die Phänotypen der Deletionsstämme je nach Spezies deutlich. Während in *A. oligospora* die Deletion von SofT und Fus3 zu einer reduzierten Fallenbildung führt, zeigt sich in *A. flagrans* lediglich ein Ausfall der Hyphenfusion (Chen et al., 2021; Youssar et al., 2019). Dennoch konnte auch während der Fallenbildung von *A. flagrans* eine Oszillation von SofT und MakB beobachtet werden, wobei die Oszillationsfrequenz mit durchschnittlich 2 Minuten deutlich kürzer ist als bei *N. crassa* (Haj Hammadeh et al., 2022) (**Abb. 8**). Zudem wurde festgestellt, dass die Deletion einer Komponente des STRIPAK-Komplexes nicht zum vollständigen Ausfall der Hyphenfusion führt, sondern lediglich die Morphologie der Fallen beeinflusst (Wernet et al., 2022). Versuche in *A. flagrans* zeigten, dass während der Fallenmorphogenese nicht nur SofT und MakB an der Hyphenspitze oszillieren, sondern auch die Calciumkonzentration sowie Aktin und Chitinsynthasen (Wernet et al., 2023). Ein weiterer Unterschied zu *N. crassa* besteht darin, dass SofT und MakB auch ohne Fusionspartner an der Hyphenspitze oszillieren. In *A. flagrans* oszillieren SofT und MakB ohne Fusionspartner (Monolog) synchron und erst bei Erkennung eines Fusionspartners (Dialog) verschiebt sich die Oszillation gegenphasig. Daher wurden verschiedene Phasen der Hyphenfusion definiert: zunächst die Orientierungsphase, gefolgt von einer kurzen Transitionsphase, dann der eigentliche Zell-Zell-Dialog und schließlich die Fusion. Basierend auf der Berechnung der Oszillationsfrequenz wird geschätzt, dass das Informationsmolekül einen Durchmesser von 3 nm oder kleiner haben muss, was auf kleine, kompakte Proteine oder Moleküle wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder ROS hindeutet (Wernet et al., 2023). Wie genau dieser Informationsmechanismus funktioniert, bleibt jedoch noch ungeklärt.



**Abbildung 8: Lokalisation von SofT (SO) und MakB (MAK-2) in *A. flagrans* während der Fallenformation.** Links: SofT (grün) lokalisiert abwechselnd an der Zellmembran an der Hyphenspitze zwischen den fusionierenden Hyphen. MakB (rot) oszilliert abwechselnd in den Zellkern der beiden Hyphen. Rechts: Quantifikation der Fluoreszenzintensität (Haj Hammadeh et al., 2022).

## Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung zentraler Aspekte der Fallenmorphogenese, des polaren Wachstums, der Hyphenfusion und der Virulenz im Nematoden-fangenden Pilz *A. flagrans*. Ein besonderer Fokus liegt auf der Analyse der Zellendmarker TeaA, TeaC und TeaR hinsichtlich ihrer möglichen Beteiligung an der Fallenmorphogenese. Hierzu werden Lokalisationsstudien mittels GFP-markierter Fusionsproteine durchgeführt, um deren Dynamik während des polaren Wachstums zu charakterisieren und mit bereits publizierten Daten aus *A. nidulans* zu vergleichen. Ergänzend werden Deletionsstämme dieser Zellendmarker generiert und phänotypisch analysiert. Darüber hinaus sollen die NADPH-Oxidasen NoxA und NoxB sowie ihr regulatorischer Aktivator NoxR und das Tetraspanin PlsA hinsichtlich ihrer Expression, subzellulären Lokalisation und der Auswirkungen der Deletionen untersucht werden.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Zellendmarker

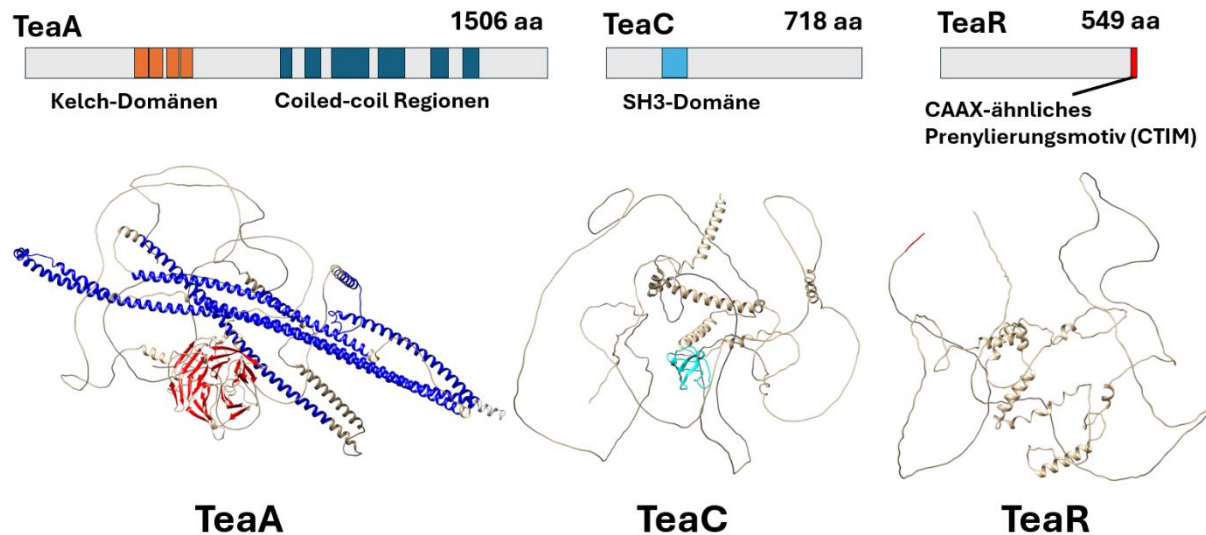
#### 3.1.1 Die Zellendmarker von *S. pombe* und *A. nidulans* sind in *A. flagrans* konserviert

Während der Fallenbildung muss die Hyphe gekrümmt wachsen, um eine Ringfalle zu bilden. Für die Steuerung des polaren Wachstums ist das Zytoskelett essenziell. CEMPs sind Proteine, die die Aktinpolymerisation beeinflussen und dadurch das polare Wachstum regulieren. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der CEMPs in *A. flagrans* auf die Fallenmorphogenese zu untersuchen. Vorarbeiten von Valentin Wernet sowie Anlun Wei, Jan Wäckerle und Imane Bouabdallah lieferten bereits Hinweise darauf, dass die Deletion von *tea*-Genen die Fallenmorphogenese beeinträchtigt. Mit Ausnahme des *teaC*-Deletionsstammes mussten jedoch alle Stämme für die vorliegende Arbeit erneut generiert werden.

CEMPs wurden bereits in mehreren Pilzarten charakterisiert (Higashitsuji et al., 2009; Patkar et al., 2010; Takeshita et al., 2008; Valinluck et al., 2014). Zur Identifizierung entsprechender Proteine in *A. flagrans* wurde eine BLAST-Suche unter Verwendung der Zellendmarker aus *A. nidulans* als Referenzsequenzen durchgeführt (**Abb. 9**). Der Zellendmarker TeaA in *A. flagrans* (DFL\_1085) besitzt eine Länge von 1506 Aminosäuren und zeigt eine Sequenzidentität von 44,14 % zum homologen Protein aus *A. nidulans* bei 99 % Sequenzabdeckung (*query coverage*) und einem E-Wert von  $< 1 \times 10^{-100}$ . TeaC (DFL\_008576) weist eine Länge von 718 Aminosäuren auf und zeigt 44,19 % Sequenzidentität bei 60 % Sequenzabdeckung und einem E-Wert von  $2 \times 10^{-90}$ . TeaR (DFL\_006018) ist 549 Aminosäuren lang und besitzt 29 % Sequenzidentität bei 82 % Sequenzabdeckung und einem E-Wert von  $7 \times 10^{-26}$  im Vergleich zu seinem Homolog aus *A. nidulans*.

Coiled-Coil-Regionen wurden mit MARCOIL vorhergesagt (Delorenzi und Speed, 2002). Kelch-Repeats und SH3-Domänen wurden mittels der *Conserved Domain Database* identifiziert (Lu et al., 2020). Alle drei Proteine zeigen die für diese Familie typische Domänenarchitektur. TeaA enthält N-terminal mehrere Kelch-Repeats sowie C-terminale Coiled-Coil-Regionen, während TeaC eine SH3-Domäne besitzt. TeaR aus *A. nidulans* verfügt am C-Terminus über ein CA<sub>1</sub>A<sub>2</sub>X-Motiv, das eine Farnesylierung durch die Farnesyltransferase ermöglicht. In *A. flagrans* wurde am C-Terminus die Sequenz CTIM (Cystein, Threonin, Isoleucin, Methionin) vorhergesagt. Während das Methionin an Position X mit einer Farnesylierung kompatibel ist, entspricht das Threonin an Position A<sub>1</sub> nicht der Anforderung

eines aliphatischen Restes, was auf eine möglicherweise reduzierte oder veränderte Prenylierungseffizienz hinweisen könnte.


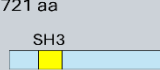
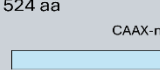
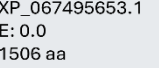
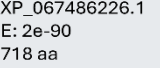
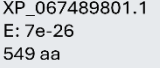

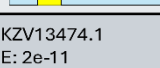
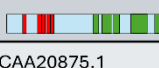
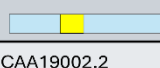
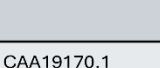
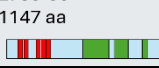
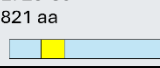
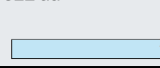
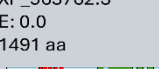
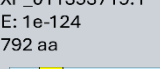
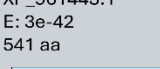
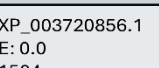
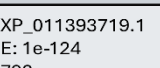
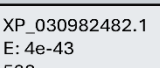
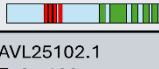
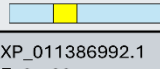
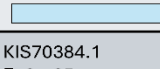
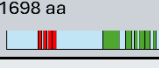
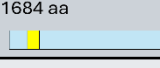
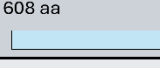
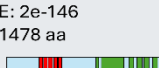
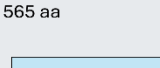

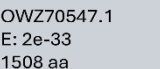
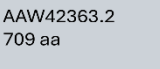
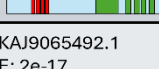
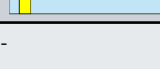
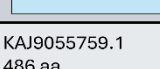
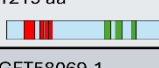
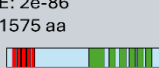
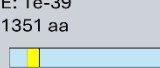
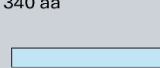


**Abbildung 9: Proteinstruktur der Zellendmarker.** TeaA ist 1506 Aminosäuren lang und besitzt N-terminal vier Kelch-Repeats (orange) sowie C-terminal sechs Coiled-Coil-Regionen (dunkelblau), die mithilfe von MARCOIL vorhergesagt wurden. TeaC ist 718 Aminosäuren lang und trägt N-terminal eine SH3-Domäne (blau). TeaR ist 549 Aminosäuren lang und weist ein CAAX-ähnliches Prenylierungsmotiv am C-Terminus auf. Die dreidimensionale Struktur der Proteine wurde mit AlphaFold modelliert und mit UCSF Chimera visualisiert (Abramson et al., 2024; Pettersen et al., 2021). Die pTM-Werte waren dabei: TeaA pTM = 0,36, TeaC pTM = 0,21 und TeaR pTM = 0,19.

Um CEMPs in einem breiteren Spektrum zu analysieren, wurden Orthologe in jedem Pilz-Phylum gesucht und bioinformatisch untersucht. Dafür wurden die CEMPs aus *A. nidulans* als Query-Sequenz für BLAST-Suchen verwendet. Orthologe CEMPs konnten in allen untersuchten Phyla gefunden werden (**Tabelle 1**).

Die Zellendmarker der Pilze aus den Phyla Ascomycota und Basidiomycota weisen weiterhin eine hohe Sequenzähnlichkeit auf, wobei jedoch kein klares Ortholog von TeaR in allen Basidiomyceten identifiziert werden konnte. Durch die Analyse von CAAX-Proteinen aus verschiedenen Spezies konnten jedoch potenzielle TeaR-Kandidaten vorgeschlagen werden. Dabei wurde nur nach Proteinlänge und CAAX-Motiv aussortiert. In den Phyla Zoopagomycota und Glomeromycota zeigen die orthologen Proteine bereits größere Unterschiede und auch hier konnte kein eindeutiges TeaR-Ortholog gefunden werden. Aus dem Phylum Chytridiomycota wurden einige potenzielle Kandidaten für alle CEMPs identifiziert, ihre Sequenzähnlichkeiten waren jedoch gering und die Domänenstrukturen unterschieden sich häufig stärker als in den anderen Phyla.

Tabelle 1: Putative CEMPs verschiedener Pilzphyla im Überblick

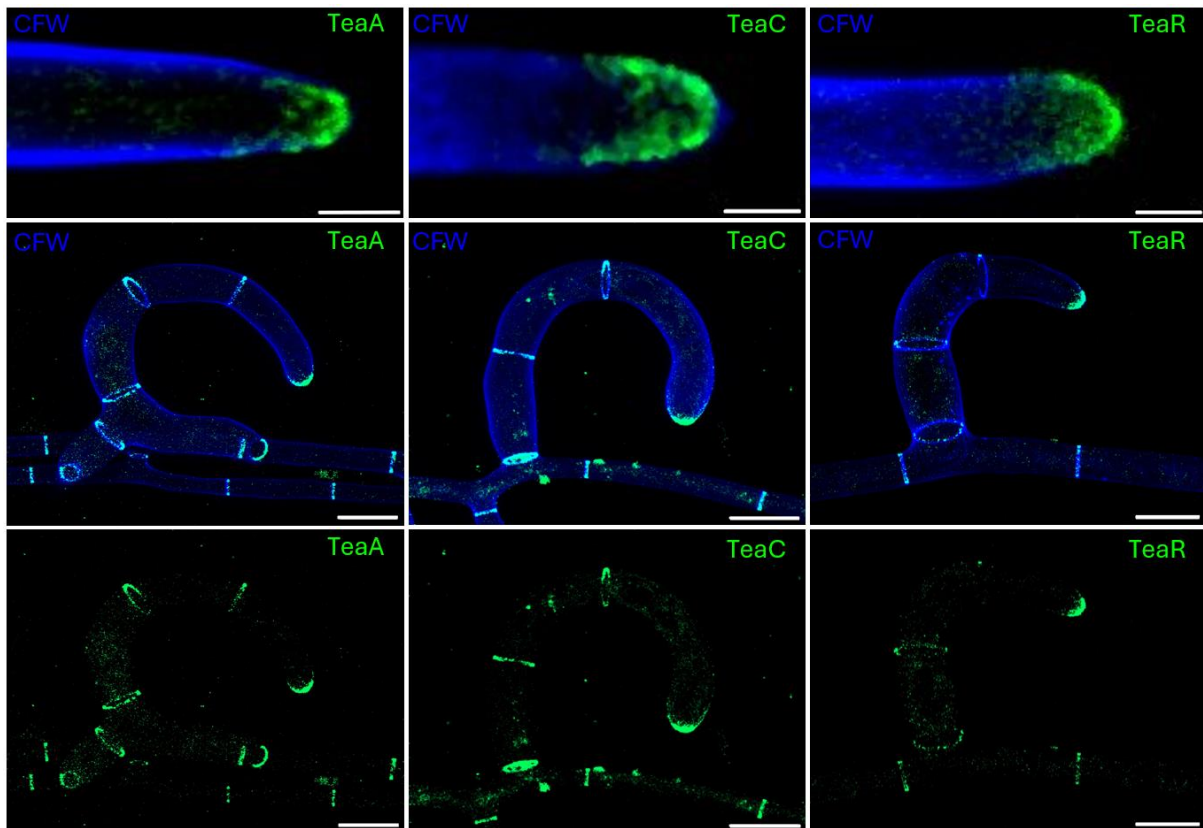
	Klasse	Spezies	TeaA	TeaC	TeaR
Ascomycota	Eurotiomycetes	<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_662168.1 1474 aa 	XP_658703.1 721 aa 	XP_050467330.1 524 aa 
	Orbiliomycetes	<i>Arthrobotrys fragrans</i>	XP_067495653.1 E: 0.0 1506 aa 	XP_067486226.1 E: 2e-90 718 aa 	XP_067489801.1 E: 7e-26 549 aa 
	Saccharomycetes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KZV10896.1 E: 3e-78 1164 aa 	KZV13474.1 E: 2e-11 709 aa 	-
	Schizosaccharomycetes	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CAA20875.1 E: 3e-56 1147 aa 	CAA19002.2 E: 2e-30 821 aa 	CAA19170.1 522 aa 
	Sordariomycetes	<i>Neurospora crassa</i>	XP_965762.3 E: 0.0 1491 aa 	XP_011393719.1 E: 1e-124 792 aa 	XP_961443.1 E: 3e-42 541 aa 
	Sordariomycetes	<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_003720856.1 E: 0.0 1504 aa 	XP_011393719.1 E: 1e-124 792 aa 	XP_030982482.1 E: 4e-43 583 aa 
Basidiomycota	Ustilaginomycetes	<i>Ustilago maydis</i>	AVL25102.1 E: 2e-108 1698 aa 	XP_011386992.1 E: 8e-38 1684 aa 	KIS70384.1 E: 6e-05 608 aa 
	Agaricomycetes	<i>Schizophyllum commune</i>	KAL1737553.1 E: 2e-146 1478 aa 	KAL1718566.1 E: 3e-33 1345 aa 	KAI5886859.1 565 aa 
	Tremellomycetes	<i>Cryptococcus neoformans</i>	OWZ61961.1 E: 6e-96 1531 aa 	OWZ70547.1 E: 2e-33 1508 aa 	AAW42363.2 709 aa 
Zoopagomycota	Entomophthoromycetes	<i>Entomophthora muscae</i>	KAJ9065492.1 E: 2e-17 1219 aa 	-	KAJ9055759.1 486 aa 
Glomeromycota	Glomeromycetes	<i>Rhizophagus irregularis</i>	GET58069.1 E: 2e-86 1575 aa 	EXX62187.1 E: 1e-39 1351 aa 	UZO26834.1 340 aa 
Chytridiomycota	Chytridiomycetes	<i>Polyrhizophyidium stewartii</i>	KAL2914784.1 E: 1e-18 813 aa 	KAL2916387.1 E: 2e-30 1271 aa 	KAL2919465.1 493 aa 
	Chytridiomycetes	<i>Gaertneriomyces semiglobifer</i>	KAI9014631.1 E: 6e-18 1028 aa 	-	-
	Chytridiomycetes	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	KAH9253039.1 E: 2e-24 888 aa 	KAH6575176.1 E: 3e-27 964 aa 	KAJ1344093.1 365 aa 

### 3.1.2 TeaA, TeaC und TeaR lokalisieren an Hyphenspitzen und Septen und kolokalisieren mit Chitinsynthasen

In *A. nidulans* lokalisieren die Zellendmarker an der Hyphenspitze und regulieren dort das polare Wachstum. Um das System von *A. flagrans* mit dem von *A. nidulans* zu vergleichen, wurden alle CEMPs mittels GFP-Fusion analysiert. Hierzu wurden die Gene durch homologe Rekombination in den Locus unter Kontrolle ihres nativen Promotors fusioniert.

Die Zellendmarker TeaA (*teaA(p)::teaA::GFP*) und TeaC (*teaC(p)::teaC::GFP*) wurden C-terminal mit GFP fusioniert, während TeaR (*teaR(p)::GFP::teaR*) N-terminal fusioniert wurde, um das C-terminale CAAX-Motiv nicht zu beeinträchtigen. Die C-terminalen Fusionskassetten bestanden aus einem 1 kb langen Fragment des 3'-Bereichs des ORFs, gefolgt von GFP, der Hygromycin-Resistenzkassette und einer 1 kb langen 3'-flankierenden Sequenz zur homologen Integration. Für das N-terminale GFP-Fusionsplasmid wurde 1 kb der 5'-flankierenden Sequenz des *teaR*-ORFs mit der GFP-Sequenz verknüpft, gefolgt von 1 kb des 5'-ORF-Bereichs von *teaR* und anschließend der Hygromycin-Resistenzkassette (1 kb *teaR(p)::GFP::1 kb teaR-ORF::hph*). Die Integration erfolgte hierbei über nur eine homologe Flanke.

Die transformierten Pilze zeigten keinen auffälligen Phänotyp, was auf die Funktionalität der Fusionsproteine hinweist. Bei allen GFP-Fusionen wurde eine halbmondförmige Struktur an den Hyphenspitzen beobachtet (**Abb. 10**). Zusätzlich zeigte sich ein Signal in allen Septen von *A. flagrans*, ähnlich wie in *A. nidulans*. Auch in Fallen war dieses Signal sichtbar und unterschied sich nicht von dem in vegetativen Hyphen.



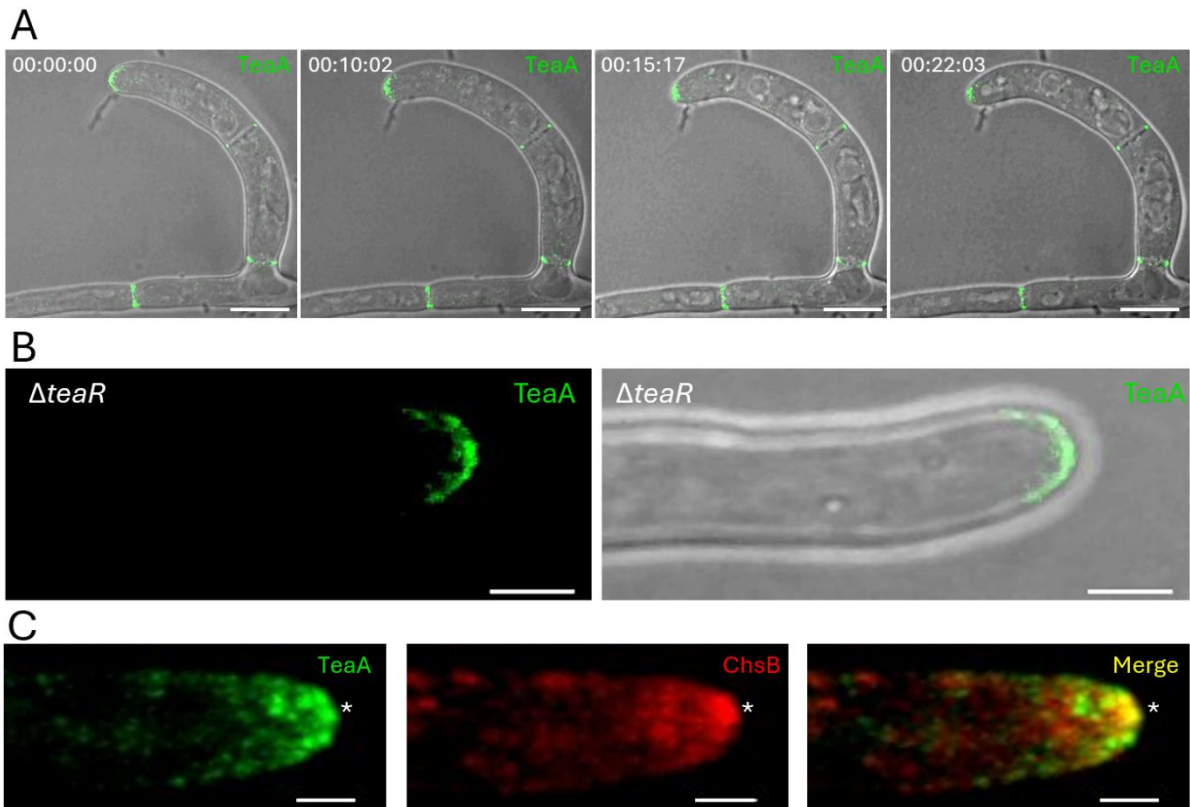
**Abbildung 10: Lokalisation der CEMP-GFP-Fusionsproteine in *A. flagrans*.** TeaA, TeaC und TeaR lokalisieren an der Hyphenspitze und den Septen von vegetativen Hyphen und Fallen. Die Form der Hyphen wurde mit Calcofluor White (CFW) sichtbar gemacht. Maßstabsbalken Fallen: 10  $\mu\text{m}$ . Maßstabsbalken vegetative Hyphen: 2  $\mu\text{m}$ .

Es wurden Zeitrafferaufnahmen der TeaA-Lokalisation während der Fallenbildung durchgeführt (**Abb. 11 A**). Dabei konnte keine Veränderung der Lokalisation im Vergleich zu vegetativen Hyphen beobachtet werden. Längere Aufnahmen erwiesen sich jedoch als schwierig, da die kontinuierliche Laserbestrahlung die Hyphen stark beeinträchtigte, sodass sie meist bereits nach etwa 10 Minuten ihr Wachstum einstellten. Nur bei reduzierter Laserintensität und günstigen Aufnahmebedingungen konnten längere Sequenzen aufgezeichnet werden.

In *A. nidulans* wurde gezeigt, dass im  $\Delta\text{teaR}$ -Stamm kein TeaA-Signal mehr an der Hyphenspitze detektierbar ist (Takeshita et al., 2008). Um zu prüfen, ob dies auch für *A. flagrans* gilt, wurde TeaA-GFP in den  $\Delta\text{teaR}$ -Stamm transformiert. Dabei zeigte sich keine Beeinträchtigung der Spitzenlokalisation, was darauf hindeutet, dass der in *A. nidulans* beschriebene Mechanismus nicht direkt auf *A. flagrans* übertragbar ist (**Abb. 11 B**).

Für *A. nidulans* wurde zudem gezeigt, dass CEMPs das polare Wachstum vermitteln, indem sie zur Organisation des Aktinzytoskeletts beitragen und den Vesikeltransport zum Wachstumszentrum steuern. Eine Kollokalisierung wurde dort bereits mittels FM4-64-Färbung sowie durch die gemeinsame Lokalisation von TeaR und der  $\beta$ -Glukosidase BglA nachgewiesen

(Higashitsuji et al., 2009; Ishitsuka et al., 2015). Zur Überprüfung dieses Zusammenhangs in *A. flagrans* wurde die im Spitzenkörper akkumulierte Chitinsynthase B (ChsB) mit mCherry fusioniert (*chsB(p)::chsB::mCherry*) und im TeaA-GFP-Stamm ektopisch exprimiert. Dabei wurde eine Kolokalisation von TeaA und ChsB an der Hyphenspitze beobachtet, was mit dem für *A. nidulans* vorgeschlagenen Modell übereinstimmt (Abb. 11 C). Diese Überlappung war jedoch nicht vollständig, da ChsB stark punktuell lokalisiert, während TeaA häufig eine fluktuative halbmondförmige Verteilung zeigt.



**Abbildung 11: Lokalisation von TeaA-GFP in Fallen und im  $\Delta teaR$ -Deletionsstamm sowie Kolokalisation mit Chitinsynthasen (ChsB).** (A) Zeitrafferaufnahme der TeaA-GFP-Lokalisation während der Fallenbildung. (B) TeaA-Lokalisation im  $\Delta teaR$ -Stamm. (C) Kolokalisation von TeaA-GFP und ChsB-mCherry. Die Asterisken markieren die Punkte, an denen die Kolokalisation auftritt. Maßstabsbalken Fallen: 10  $\mu\text{m}$ . Maßstabsbalken Hyphen: 2  $\mu\text{m}$ .

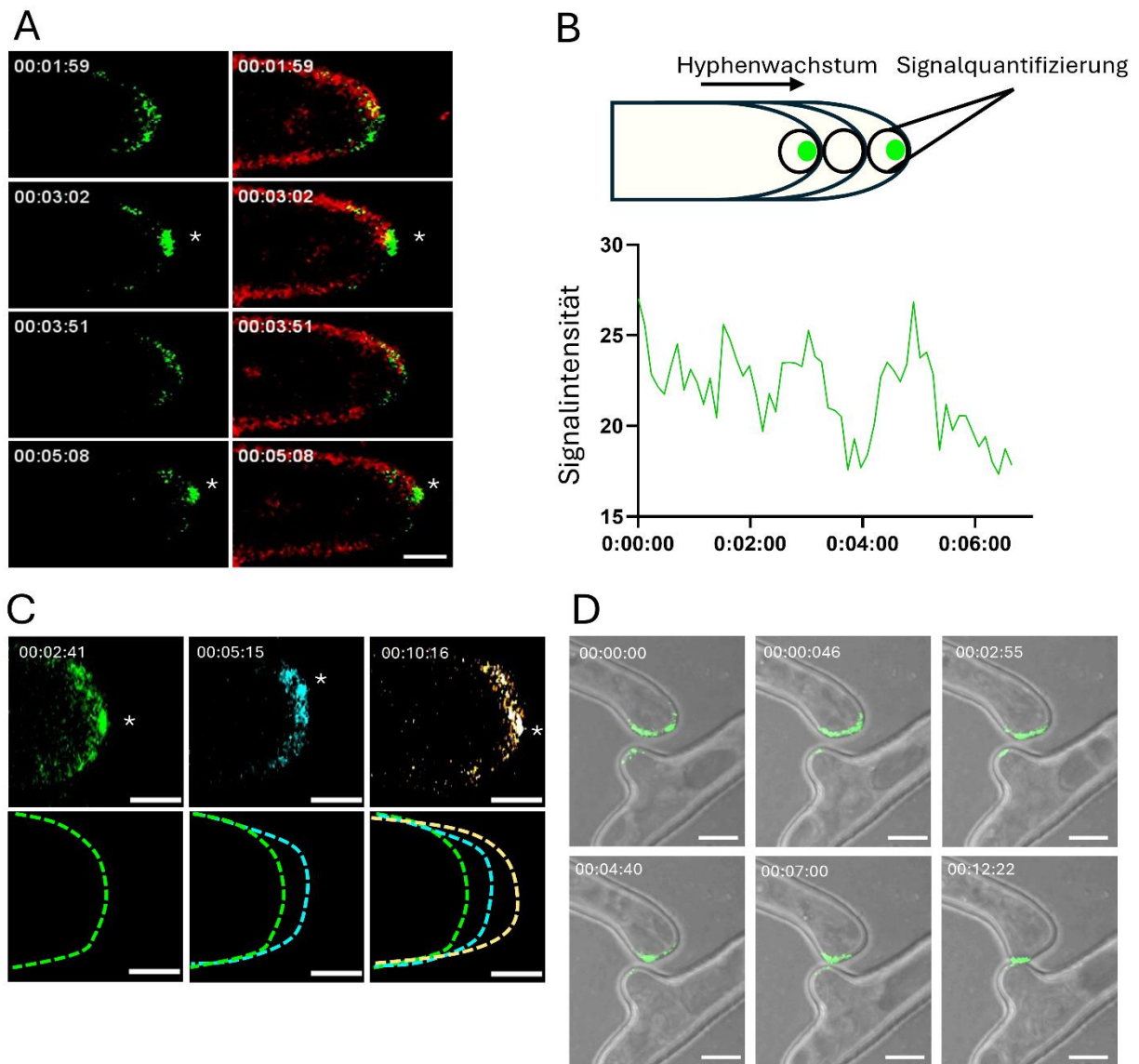
### 3.1.3 Zellendmarker repositionieren sich während Richtungsänderungen der Hyphen

In *A. nidulans* wurde die Dynamik der CEMPs bereits beschrieben (Ishitsuka et al., 2015; Takeshita et al., 2008). Dabei zeigte sich, dass die Fluoreszenz von TeaR nicht konstant ist, sondern zeitlichen Fluktuationen unterliegt. Zudem lokalisierten CEMPs teilweise in einer halbmondförmigen Anordnung und teilweise in stärker konzentrierten Akkumulationen. Diese Dynamik erscheint jedoch unstrukturiert und unterscheidet sich deutlich von den klar definierten Oszillationen, wie sie beispielsweise für SofT oder MakB beschrieben wurden (Wernet et al., 2023).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Dynamik der CEMPs in *A. flagrans* mit dem Modell aus *A. nidulans* vergleichbar ist. Hierzu wurden Zeitrafferaufnahmen von TeaA-GFP durchgeführt. Zusätzlich wurde bei Bedarf die Plasmamembran mit niedriger Konzentration von FM4-64 angefärbt, um die Hyphenform besser sichtbar zu machen. Analog zu *A. nidulans* wurden auch in *A. flagrans* Fluktuationen der Fluoreszenz beobachtet (**Abb. 12 A, B**). Die Lokalisation erschien dabei teils halbmondförmig, teils punktuell konzentriert in einem oder mehreren Arealen.

Für *A. nidulans* wurde beschrieben, dass die Konzentration solcher Cluster-Areale mit Wachstumszonen an der Hyphe korreliert (Ishitsuka et al., 2015). Daher wurde untersucht, ob auch in *A. flagrans* ein Zusammenhang zwischen Wachstum und TeaA-Akkumulation besteht. Es zeigte sich zwar eine ausgeprägte räumlich-zeitliche Dynamik der Akkumulationen, jedoch nur eine geringe Ausrichtung des Hyphenwachstums zu diesen Bereichen (**Abb. 12 C**). Insgesamt wuchsen die Hyphen in *A. flagrans* gleichmäßiger und ohne ausgeprägte Ausdehnungen an der Hyphenspitze.

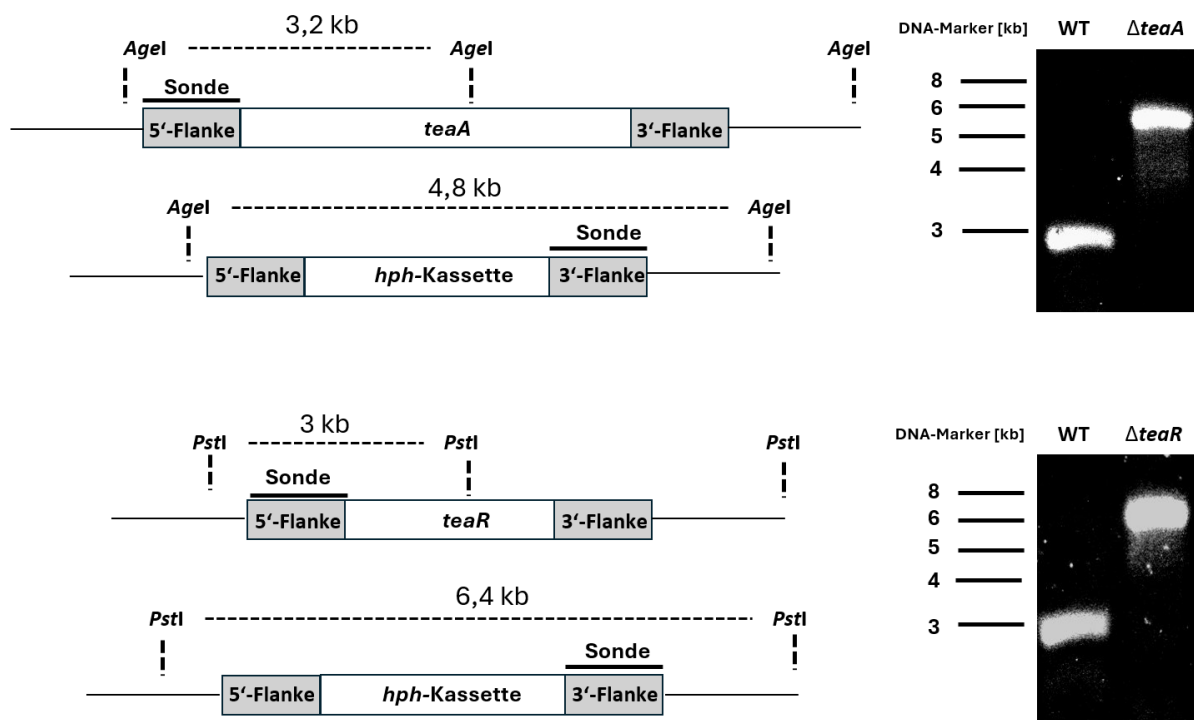
Um dennoch mögliche Zusammenhänge zwischen CEMP-Lokalisation und Wachstumsrichtung zu analysieren, wurden Situationen untersucht, in denen Hyphen einen deutlichen Richtungswechsel vollziehen. Dies tritt insbesondere während des Kommunikationsprozesses vor der Hyphenfusion auf, wenn potenzielle Fusionspartner einander erkennen und gezielt aufeinander zuwachsen. Zeitrafferaufnahmen der TeaA-GFP-Lokalisation während dieses Prozesses zeigten, dass sich zunächst halbmondförmig verteilte Tea-Cluster rasch in Richtung des Fusionspartners verlagerten (**Abb. 12 D**). Je stärker diese Umlagerung ausgeprägt war, desto deutlicher orientierte sich das Hyphenwachstum in diese Richtung. Somit konnte eine Korrelation zwischen Wachstumsrichtung und der Lokalisation der Tea-Cluster festgestellt werden.



**Abbildung 12: Dynamik und Lokalisation von TeaA-GFP.** (A) Zeitrafferaufnahme von TeaA-GFP an der Hyphenspitze mit FM4-64-Färbung (rot). Zur besseren Darstellung der Dynamik zwischen Clusterbildung und -auflösung wurde ein erhöhter Kontrast verwendet. (B) Quantifizierung der Signalintensität aus der in (A) gezeigten Zeitrafferaufnahme. Die Messung erfolgte wie im Schema dargestellt. (C) Obere Panels: TeaA-GFP-Lokalisation zu verschiedenen Zeitpunkten. Untere Panels: Umriss der Hyphe zu denselben Zeitpunkten. Die Farbmarkierung kennzeichnet die Zeitpunkte (grün = erster Zeitpunkt, blau = zweiter Zeitpunkt, orange = dritter Zeitpunkt). (D) Zeitrafferaufnahme von TeaA-GFP während der Hyphenfusion. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ . Asterisken markieren in allen Bildern die Position von TeaA-GFP und die wahrscheinliche Wachstumszone der Hyphe.

### 3.1.4 Die Deletion der CEMPs und die Überexpression von *teaA* führen zu veränderter Morphologie der Kolonie

Um den Einfluss der CEMPs auf das polare Wachstum zu untersuchen, wurden Deletionsstämme von *teaA* und *teaR* mittels homologer Rekombination generiert. Für *teaC* lag bereits ein Deletionsstamm aus einer früheren Arbeit vor (Bachelorarbeit Jan Wäckerle). Für die Konstruktion der Deletionskassetten wurden jeweils 1 kb lange Sequenzen *upstream* und *downstream* des *Open Reading Frame* (ORF) in den Vektor pJET1.2 kloniert, sodass sie die Hygromycin-Resistenzkassette (*hph*) flankierten. Die Transformationsfragmente wurden per PCR amplifiziert und anschließend in *A. flagrans* transformiert. Der erfolgreiche Austausch der ORFs von *teaA* und *teaR* wurde mittels Southern-Blot-Analyse verifiziert (**Abb. 13**).



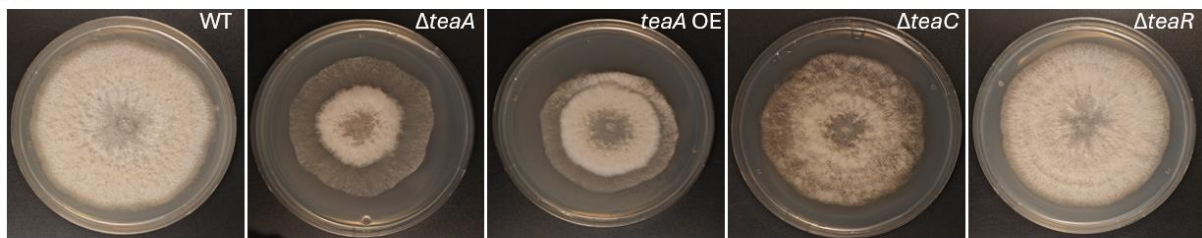
**Abbildung 13: Schema der homologen Rekombination und Southern-Blot-Analyse.** Der ORF von *teaA* und *teaR* wurde jeweils durch eine *hph*-Resistenzkassette ersetzt. Für *teaA* wurde genomische DNA mit *AgeI* verdaut und eine zur 3'-Flanke komplementäre Sonde verwendet. Der Southern Blot zeigte Banden bei etwa 3,2 kb und 4,8 kb. Für *teaR* wurde die genomische DNA mit *PstI* verdaut und ebenfalls eine zur 3'-Flanke komplementäre Sonde eingesetzt. Das Bandenmuster zeigte beim WT ein Fragment von etwa 3 kb und beim  $\Delta teaR$ -Stamm ein Fragment von etwa 6,4 kb.

Die Deletion von *teaA* und *teaC* führte zu signifikanten Beeinträchtigungen des vegetativen Wachstums auf PDA-Platten, wobei die *teaA*-Deletion den stärksten Effekt zeigte und die *teaR*-Deletion den geringsten (**Abb. 14 A**). Aus diesem Grund wurde für *teaA* zusätzlich eine

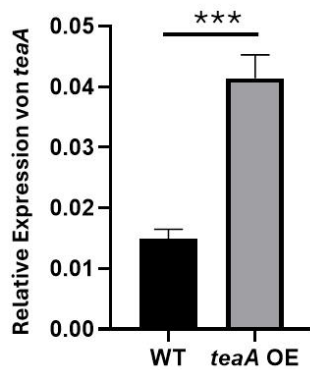
Überexpression in *A. flagrans* unter Kontrolle des *oliC*-Promotors generiert (*oliC(p)::teaA::gluC(t)*), die ektopisch ins Genom integriert wurde. Die Überexpression wurde mittels Real-Time-qPCR (RT-qPCR) verifiziert und zeigte eine etwa dreifach erhöhte Expression von *teaA* im Vergleich zum WT. Das *h2b*-Gen diente dabei als Haushaltsgen (**Abb. 14 B**).

Der WT, die *teaA*-Überexpressionslinie (*teaA*-OE) sowie alle Deletionsstämme wurden anschließend in Triplikaten auf PDA ausplattiert und fünf Tage inkubiert. Danach wurde der Koloniedurchmesser bestimmt (**Abb. 14 C**). Dabei zeigte die *teaA*-Überexpression die stärkste Wachstumsbeeinträchtigung, gefolgt von den Deletionsstämmen  $\Delta teaA$  und  $\Delta teaC$ . Die Deletion von *teaR* hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Koloniedurchmesser. Allerdings waren auf den Platten schwach ausgeprägte konzentrische Ringe um die Kolonien erkennbar, die auf ein verändertes Wachstumsmuster hinweisen.

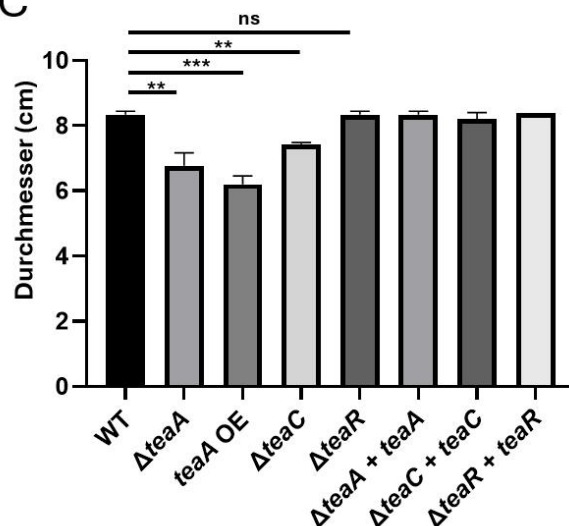
A



B



C



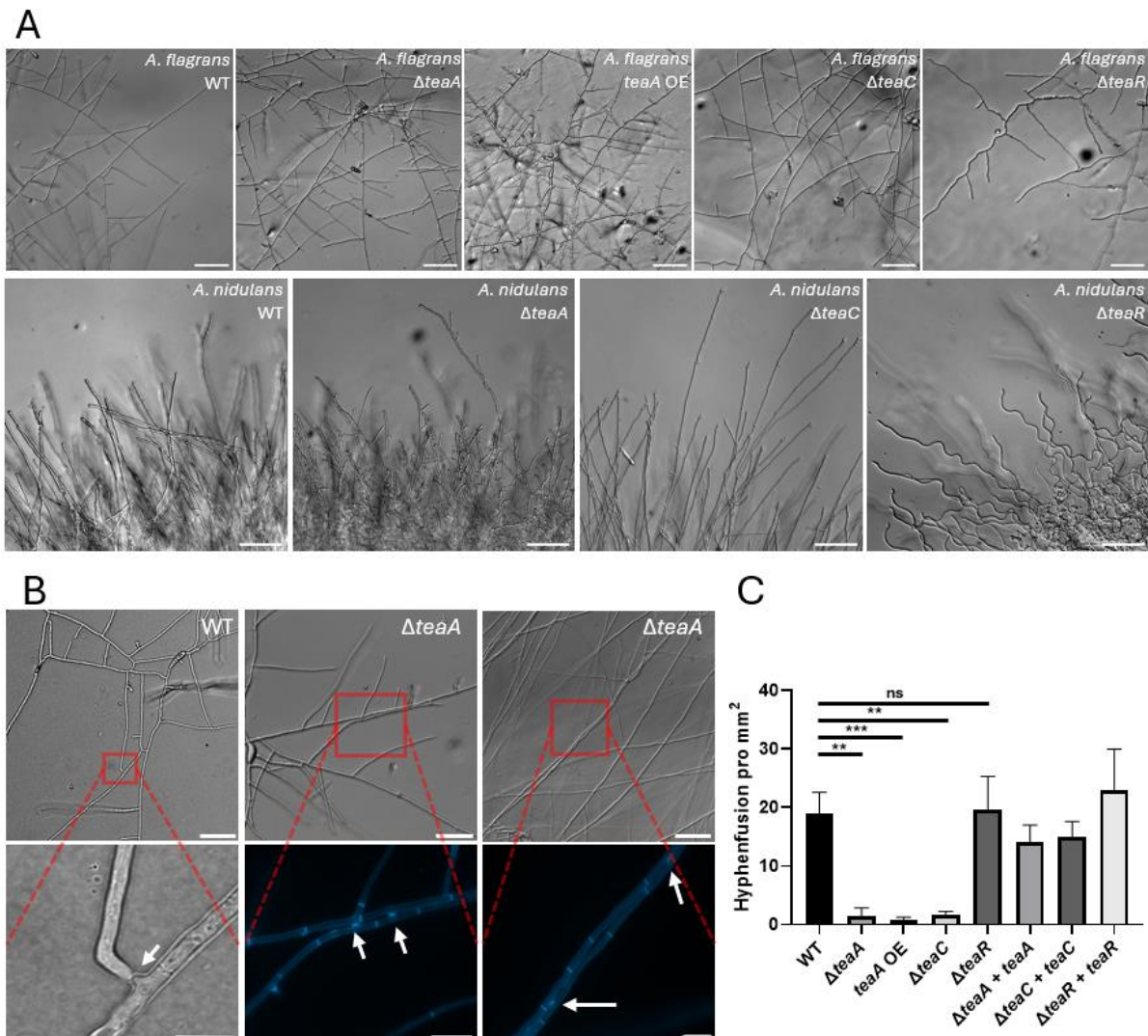
**Abbildung 14: Phänotypen der CEMP-Deletionsstämme und *teaA*-OE.** (A) Wachstum der Kolonie des WT,  $\Delta teaA$ ,  $\Delta teaC$ ,  $\Delta teaR$  und der *teaA*-OE auf PDA-Platten nach fünf Tagen Inkubation. (B) Relative Expression von *teaA* im WT und der *teaA*-OE quantifiziert mittels RT-qPCR. (C) Quantifizierung des Koloniedurchmessers nach fünf Tagen Inkubation auf PDA-Medium. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ns = nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger t-Test).

### 3.1.5 Die Deletion von *teaR* führt zu mäanderndem Hyphenwachstum, während die Deletion von *teaA* und *teaC* sowie die Überexpression von *teaA* Defekte in der Hyphenfusion verursachen

In *A. nidulans* wurde bei den  $\Delta teaA$ -,  $\Delta teaC$ - und insbesondere  $\Delta teaR$ -Stämmen eine Abweichung vom normalen Hyphenwachstum beobachtet (Higashitsuji et al., 2009; Takeshita et al., 2008). Während WT-Hyphen geradlinig wachsen, zeigten diese Mutanten ein mäanderndes, kurvenförmiges Wachstum. Daher sollte untersucht werden, ob dieses Phänomen auch in *A. flagrans* reproduzierbar ist. Zu diesem Zweck wurden die CEMP-Deletionsstämme von *A. nidulans* sowie die entsprechenden Deletionsstämme von *A. flagrans* auf Minimalmedium (MM) angeimpft und mikroskopisch analysiert (**Abb. 15 A**). Die Experimente wurden unter verschiedenen Inkubationsbedingungen durchgeführt, wobei Zeiträume zwischen 12 und 24 Stunden sowie Temperaturen von 10 °C bis 37 °C getestet wurden. Diese Parameter beeinflussten das beobachtete Wachstumsverhalten jedoch nicht grundlegend. In beiden Spezies zeigten ausschließlich die  $\Delta teaR$ -Stämme ein deutlich mäanderndes Hyphenwachstum. Die Deletion von *teaA* sowie die Überexpression von *teaA* führten zusätzlich zu *hyperbranching*, das besonders bei der Überexpression ausgeprägt war. Die Analyse der Hyphenmorphologie ergab zudem, dass sowohl die *teaA*-Überexpression als auch die  $\Delta teaA$ - und  $\Delta teaC$ -Deletionsstämme ein verändertes Wachstum innerhalb der Kolonie aufweisen.

Während der WT ein dichtes, vernetztes Myzel bildet, in dem Hyphen regelmäßig fusionieren, trat dieses Muster bei den Mutanten deutlich seltener auf. Stattdessen zeigten diese häufig ein unorganisiertes Wachstum, bei dem Hyphen ungeordnet übereinander verlaufen, was vermutlich auf eine reduzierte Hyphenfusion zurückzuführen ist. Allerdings wurde vermehrt beobachtet, dass Hyphen parallel wachsen und über kurze Distanzen weiterhin fusionieren können (**Abb. 15 B**). Zur quantitativen Analyse wurden Sporensuspensionen mit identischer Sporenanzahl auf LNA-Gelkissen inokuliert und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden aus verschiedenen Koloniebereichen mikroskopische Aufnahmen erstellt und die Anzahl der Hyphenfusionen bestimmt (**Abb. 15 C**). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Hyphendichte auf allen Bildern annähernd gleich ist und es wurden ausschließlich typische Fusionsereignisse berücksichtigt. Fusionen zwischen parallel verlaufenden Hyphen über sehr kurze Distanz wurden nicht in die Auswertung einbezogen ( $n = 3$  Positionen). Der WT zeigte durchschnittlich  $19 (\pm 2,94)$  Fusionen pro circa  $1 \text{ mm}^2$ , während beim  $\Delta teaR$ -Stamm mit  $19,67 (\pm 4,64)$  keine signifikante Veränderung festgestellt wurde. Dagegen war die Fusionsrate in den übrigen Mutanten stark reduziert von  $\Delta teaA$  mit  $1,33 (\pm 1,24)$ ,  $\Delta teaC$  mit  $1,66 (\pm 0,47)$  und der *teaA*-

Überexpression mit  $0,66 (\pm 0,47)$  Fusionsereignissen. Somit weist die *teaA*-Überexpression den stärksten Phänotyp auf, während die Deletion von *teaR* den geringsten Effekt zeigt.



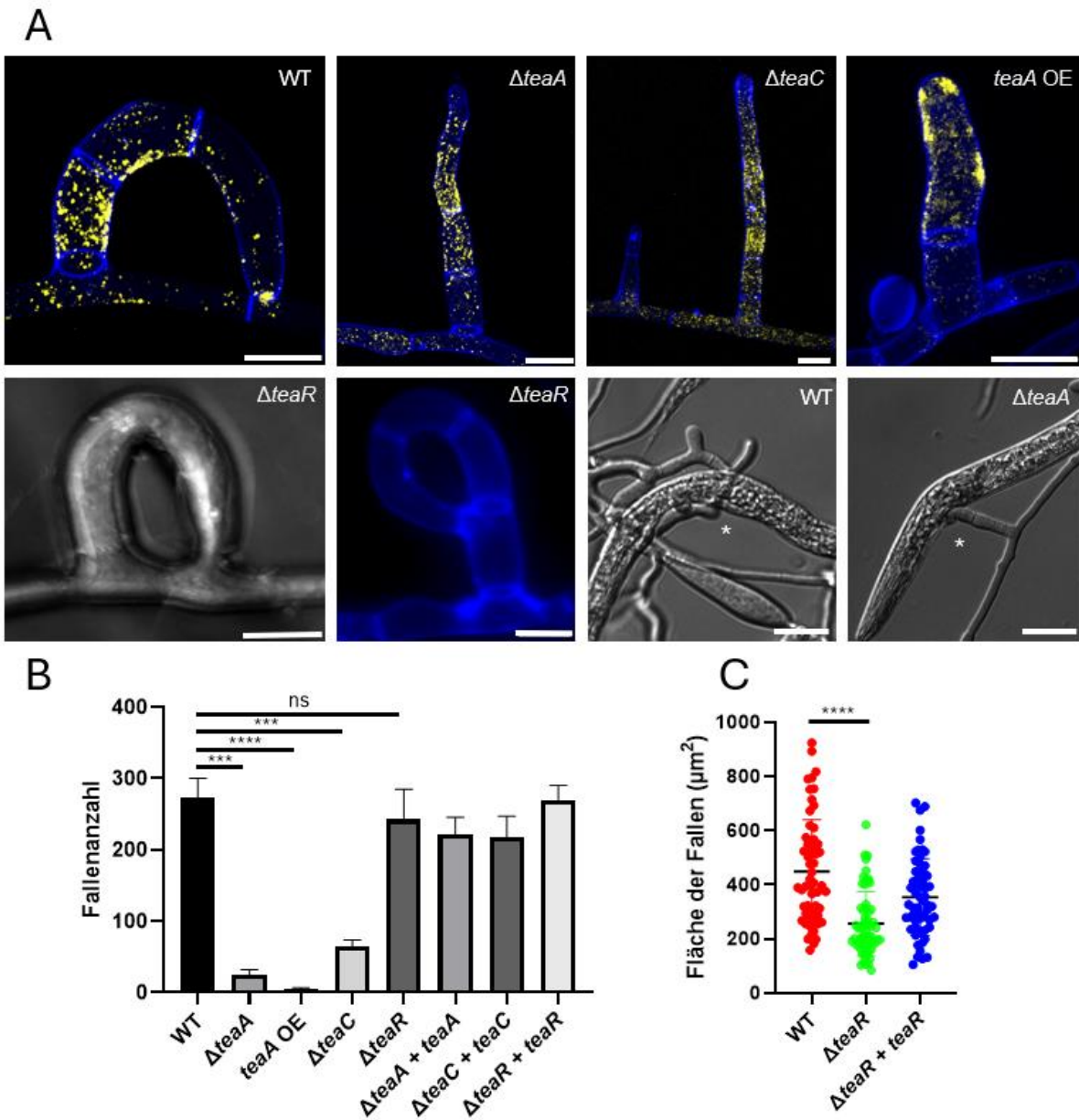
**Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen des Hyphenwachstums der CEMP-Deletionsmutanten in *A. flagrans* und *A. nidulans*.** (A) Hyphenwachstum der CEMP-Deletionsstäme von *A. flagrans* und *A. nidulans* sowie der *A. flagrans teaA*-Überexpression auf MM. Ein deutlich kurvig Wachstum wurde ausschließlich bei den  $\Delta teaR$ -Stämmen beider Spezies beobachtet. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m. (B) Mikroskopische Aufnahmen von Hyphenfusionsereignissen im WT und im  $\Delta teaA$ -Stamm von *A. flagrans*. Im WT wurden typische Hyphenfusionen zwischen senkrechten Hyphen beobachtet. Im  $\Delta teaA$ -Stamm traten Fusionen nur über kurze Distanzen zwischen parallel wachsenden Hyphen auf. Pfeile markieren die Fusionsstellen. Calcofluor White (CFW) wurde verwendet, um die Hyphenfusion des  $\Delta teaA$ -Deletionsstammes sichtbar zu machen. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m. Maßstabsbalken Vergrößerung: 10  $\mu$ m. (C) Quantitative Analyse der Hyphenfusion in den CEMP-Mutanten und der *teaA*-Überexpression. Die Stämme wurden auf LNA inokuliert und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden zufällige Bildfelder mit einem 10 $\times$ -Objektiv aufgenommen und ausgewertet ( $n = 3$  Positionen). Fusionen zwischen parallel wachsenden Hyphen wurden dabei nicht berücksichtigt. \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ns = nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger t-Test).

### 3.1.6 Die Deletion von *teaA*, *teaC* und *teaR* sowie die Überexpression von *teaA* führen zu veränderter Fallenmorphologie

Zur Untersuchung des Einflusses der CEMPs auf die Fallenbildung wurde *A. flagrans* auf LNA-Gelkissen inokuliert und die Fallenbildung durch eine gemischte *C. elegans*-Population induziert. Dabei zeigte sich, dass die  $\Delta teaA$ - und  $\Delta teaC$ -Stämme sowie die *teaA*-Überexpression keine normalen, gekrümmten Ringfallen mehr ausbildeten. Stattdessen wuchsen die Fallen hyphenartig und unterschieden sich nur durch eine leichte Verdickung von vegetativen Hyphen, wodurch sie lediglich angedeutet erkennbar waren (**Abb. 16 A**). Besonders in der *teaA*-Überexpression waren Fallen schwer zu identifizieren, da sie häufig nur als sehr kleine Ausstülpungen erschienen. Dennoch waren die Fallen in der Lage, Nematoden zu fangen und zu verdauen.

Zur besseren Visualisierung der Fallen wurde ein spezifischer Fallenmarker in die  $\Delta teaA$ -,  $\Delta teaC$ - und *teaA*-Überexpressionsstämme transformiert. Hierfür wurde das SSP NipA gewählt, das ausschließlich in Fallen exprimiert wird und in punktförmigen Vesikeln lokalisiert (Emser et al., 2024). NipA wurde mit mCherry fusioniert und unter Kontrolle seines nativen Promotors exprimiert (*nipA(p)::nipA::mCherry*). Dadurch konnten Fallen zuverlässig detektiert und quantifiziert werden (**Abb. 16 B**). Die Auswertung ergab, dass der WT mit 272 Fallen pro 0,5 cm<sup>2</sup> deutlich mehr Fallen bildete als  $\Delta teaA$  (25 Fallen/0,5 cm<sup>2</sup>),  $\Delta teaC$  (64,3 Fallen/0,5 cm<sup>2</sup>) und die *teaA*-Überexpression (4,3 Fallen/0,5 cm<sup>2</sup>). Der  $\Delta teaR$ -Stamm zeigte dagegen mit 242,3 Fallen/0,5 cm<sup>2</sup> keine signifikante Reduktion der Fallenproduktion.

Bei genauerer Analyse fiel auf, dass der  $\Delta teaR$ -Stamm kleinere Fallen ausbildet, ein Befund, der bereits in der Bachelorarbeit von Imane Bouabdallah beschrieben wurde. Um das zu bestätigen, wurde die Fallenfläche im WT und im  $\Delta teaR$ -Stamm quantifiziert (**Abb. 16 C**). Dabei zeigte sich, dass die Fallen des WT mit durchschnittlich 449  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 191$ ) größer waren als die des  $\Delta teaR$ -Stammes mit 256  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 191$ ).



**Abbildung 16: Analyse der Fallenmorphogenese in den CEMP-Deletionsstämmen.** (A) Mikroskopische Aufnahmen der Fallenbildung in den CEMP-Deletionsmutanten sowie der *teaA*-OE auf LNA nach Inkubation mit Nematoden. Die Zellwand wurde mit Calcofluor White (blau) angefärbt. Das NipA-Protein (gelb) markiert spezifisch die Fallenstrukturen.  $\Delta teaA$ ,  $\Delta teaC$  und die *teaA*-OE waren nicht mehr in der Lage, gekrümmte Ringfallen auszubilden. Trotz fehlender Krümmung konnten diese Stämme weiterhin Nematoden fangen. Die Fallen des  $\Delta teaR$ -Stammes waren hingegen kleiner. Asterisken markieren die Stellen, an denen Nematoden gefangen wurden. (B) *A. flagrans* WT, die CEMP-Deletionsstämmen sowie die *teaA*-OE wurden auf LNA mit einer gemischten *C. elegans*-Population inokuliert und 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Die Anzahl der Fallen wurde auf einer Fläche von 0,5 cm<sup>2</sup> bestimmt ( $n = 3$ ). (C) Quantitative Analyse der Fallenfläche von WT und dem  $\Delta teaR$ -Deletionsstamm.  $\Delta teaR$  zeigte eine signifikante Reduktion der Fallenfläche. Die Flächenbestimmung erfolgte mit ImageJ/Fiji ( $n = 60$ ). \*\*\*\* $P < 0,0001$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ns = nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger t-Test). Maßstabsbalken Fallen: 10  $\mu$ m. Maßstabsbalken DIC-Bilder unten rechts: 20  $\mu$ m.

## 3.2 NADPH-Oxidasen

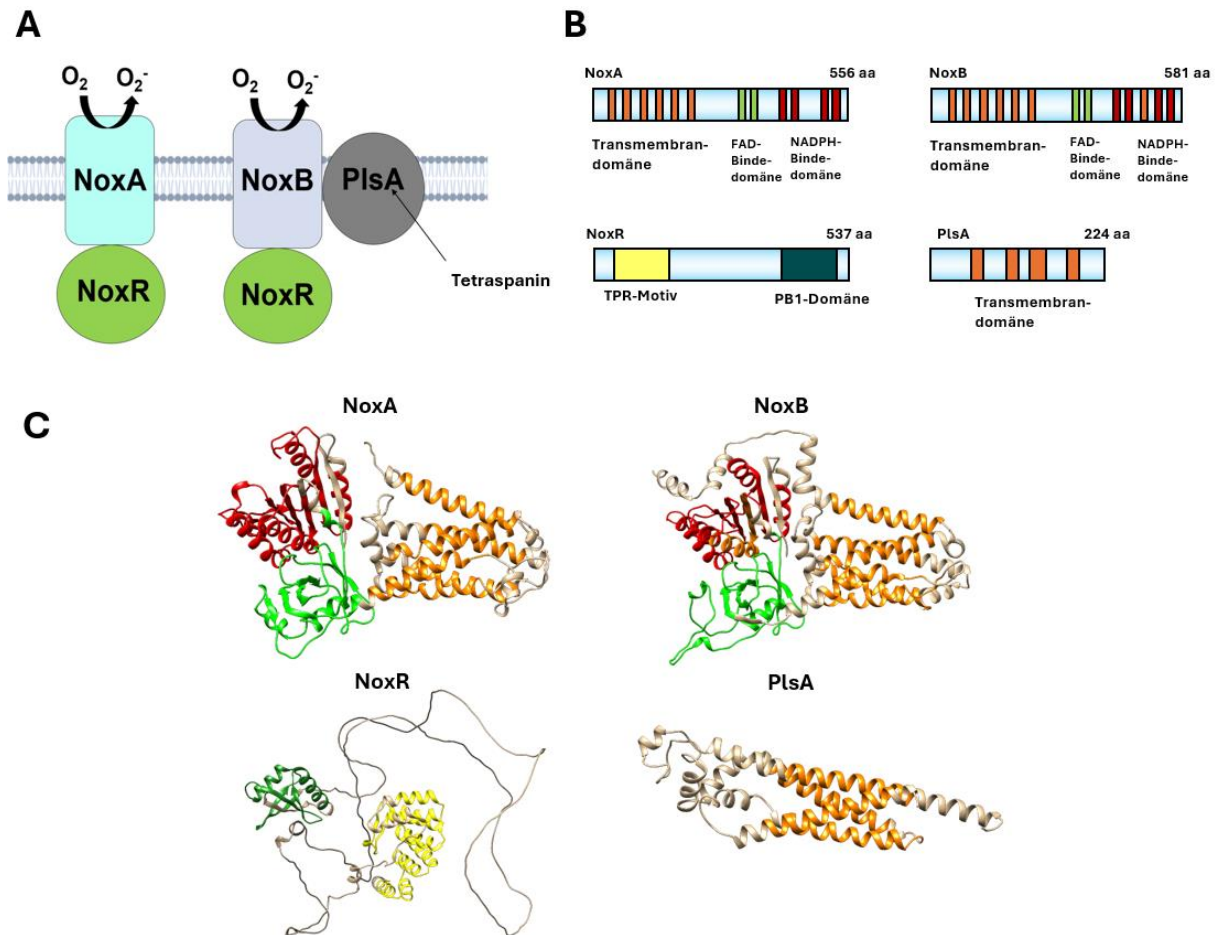
### 3.2.1 Das Genom von *A. flagrans* enthält 2 konservierte NADPH-Oxidasen sowie ein Tetraspanin PlsA und den Aktivator NoxR

ROS spielen eine wichtige Rolle beim polaren Wachstum, der Zelldifferenzierung und der Virulenz. NADPH-Oxidasen sind Enzyme, die ROS produzieren, indem sie NADPH oxidieren und dabei  $O_2$  zu  $O_2^-$  reduzieren (Aguirre und Lambeth, 2010). In *A. flagrans* sollten die NADPH-Oxidasen im Hinblick auf Fallenmorphogenese und Virulenz untersucht werden, da sowohl Zelldifferenzierung als auch polares Wachstum für diese Prozesse entscheidend sind. Die meisten Pilze besitzen zwei NADPH-Oxidasen, NoxA und NoxB. Um die entsprechenden *nox*-Gene in *A. flagrans* zu identifizieren, wurde eine BLAST-Suche unter Verwendung bereits charakterisierter *nox*-Gene aus *B. cinerea* durchgeführt. Die Domänenstruktur wurde dabei mit InterProScan vorhergesagt, während Transmembrandomänen mithilfe von TMHMM 2.0 identifiziert wurden (Jones et al., 2014; Krogh et al., 2001)

NoxA (DFL\_005041) aus *A. flagrans* besteht aus 556 Aminosäuren und besitzt sechs Transmembrandomänen, zwei FAD-Bindedomänen sowie vier NADPH-Bindedomänen. NoxB besteht aus 581 Aminosäuren und weist sieben Transmembrandomänen, zwei FAD-Bindedomänen und vier NADPH-Bindedomänen auf (**Abb. 17**). Der Aktivator NoxR umfasst 537 Aminosäuren und enthält mehrere TPR-Motive sowie eine PB1-Domäne. Der membranständige Interaktionspartner von NoxB, das Tetraspanin PlsA, besteht aus 224 Aminosäuren und besitzt vier Transmembrandomänen.

Neben dem kanonischen NoxR wurden zwei weitere NoxR-ähnliche Proteine identifiziert (**Abb. 18**). Eines davon (DFL\_008703) besitzt 424 Aminosäuren und zeigt eine Sequenzabdeckung von 73 %, einen E-Wert von  $3 \times 10^{-108}$  sowie 52,19 % Identität im Vergleich zu DFL\_001795. Das Zweite (DFL\_002559) besteht aus 584 Aminosäuren und weist 51 % Sequenzabdeckung, einen E-Wert von  $3 \times 10^{-59}$  und 53,23 % Identität auf. Alle drei Proteine enthalten TPR-Repeats und eine PB1-Domäne. Die putative Aktivierungsregion ist in DFL\_001795 und DFL\_008703 am stärksten konserviert. Ein funktionelles NoxR-Protein benötigt jedoch zusätzlich eine saure Region im C-Terminus, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Besonders in DFL\_001795 findet sich ein ausgeprägter saurer Abschnitt (QYNDDYQSDGD), während diese Region in den beiden anderen Proteinen verkürzt oder

weniger stark ausgeprägt ist. Dies macht DFL\_001795 zum wahrscheinlichsten Kandidaten für das funktionelle NoxR-Protein.



**Abbildung 17: Proteinstruktur und Domänenvorhersage der Nox-Proteine.** (A) Schematische Darstellung der Nox-Protein-Funktionsweise. Der Aktivator NoxR bindet an NoxA und NoxB, welche ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) herstellen. Das Tetraspanin PlsA interagiert mit NoxB und unterstützt bei der Funktion. (B) Proteinstruktur mit vorhergesagten Domänen von NoxA, NoxB, NoxR und PlsA. Die farbliche Codierung ist: Transmembrandomänen (orange), FAD-Bindedomänen (grün), NADPH-Bindedomänen (rot), TPR-Motive (gelb), PB1-Domäne (dunkelgrün). (C) Vorhergesagte AlphaFold-3D-Struktur visualisiert mit UCSF Chimera. NoxA pTM = 0,84; PlsA pTM = 0,82; NoxB pTM = 0,87; NoxR pTM = 0,43.

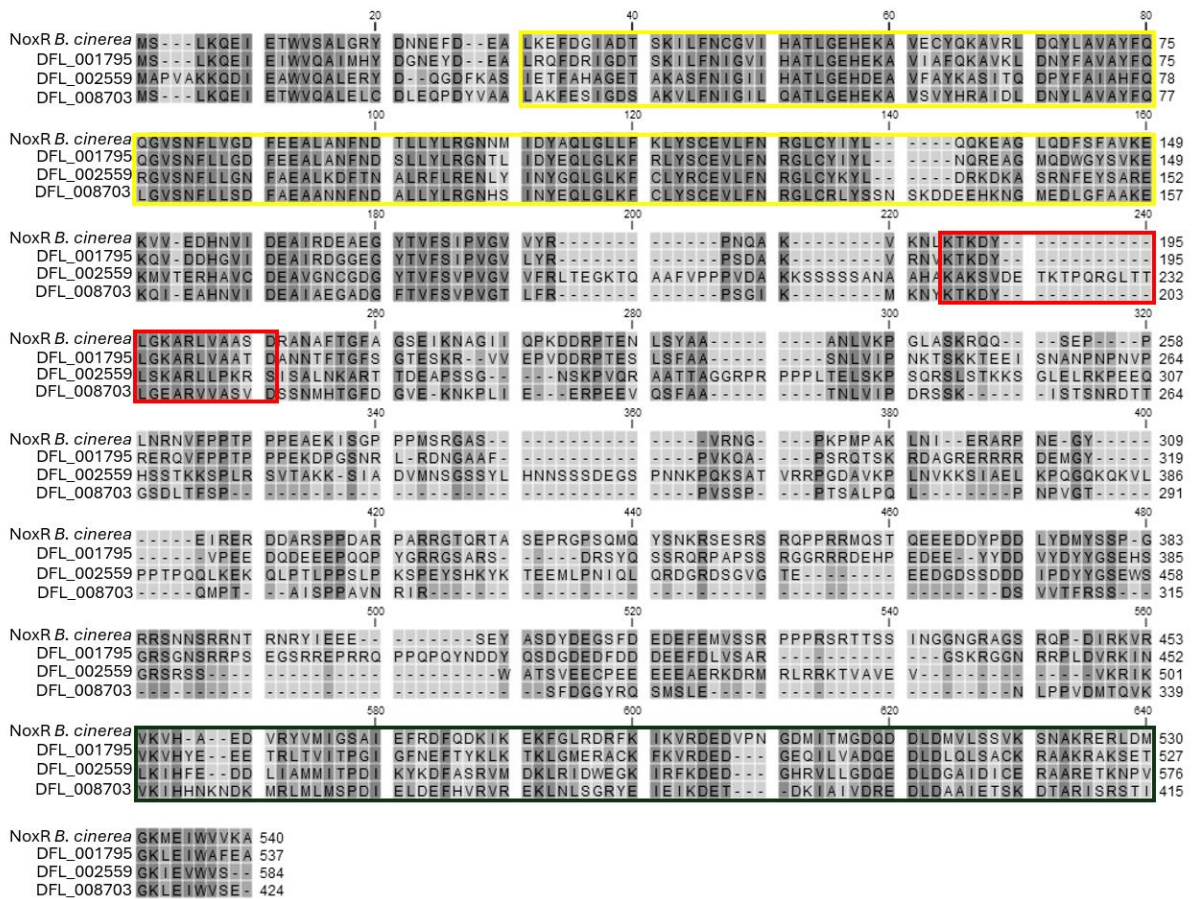


Abbildung 18: Alignment der NoxR-Proteinsequenzen von *B. cinerea* und Kandidaten aus *A. flagrans*. Die TPR-Repeat-Struktur ist gelb, die Aktivierungsdomäne rot und die PB1-Domäne dunkelgrün markiert. DFL\_001795 weist die höchste Übereinstimmung mit dem kanonischen NoxR auf.

### 3.2.2 Die Genexpression von *noxB*, *plsA* und *noxR* ist während der pathogenen Phase hochreguliert, während *noxA* herunterreguliert ist

Um die Rolle von NoxA und NoxB bei der Fallenmorphogenese und der Funktion der Fallen zu untersuchen, wurde die Expression von *noxA*, *noxB*, *noxR* und *plsA* mittels eines Promotor-Reporter-Assays analysiert. Dazu wurden die jeweiligen Promotoren an ein Histon-(H2B)-mCherry-Konstrukt fusioniert, sodass die Zellkerne eine rote Fluoreszenz zeigen, die der Promotoraktivität entspricht ( $GOI(p)::h2b::mCherry$ ). Dieses Konstrukt wurde in einen Stamm transformiert, der konstitutiv ein Histon-GFP-Konstrukt ( $h2b(p)::h2b::GFP$ ) exprimiert, welches als Kontrolle dient. Die Stämme wurden auf verschiedenen LNA-Gelkissen angeimpft, sowohl mit als auch ohne Nematoden, die die Fallen induzieren (Abb. 19 A).

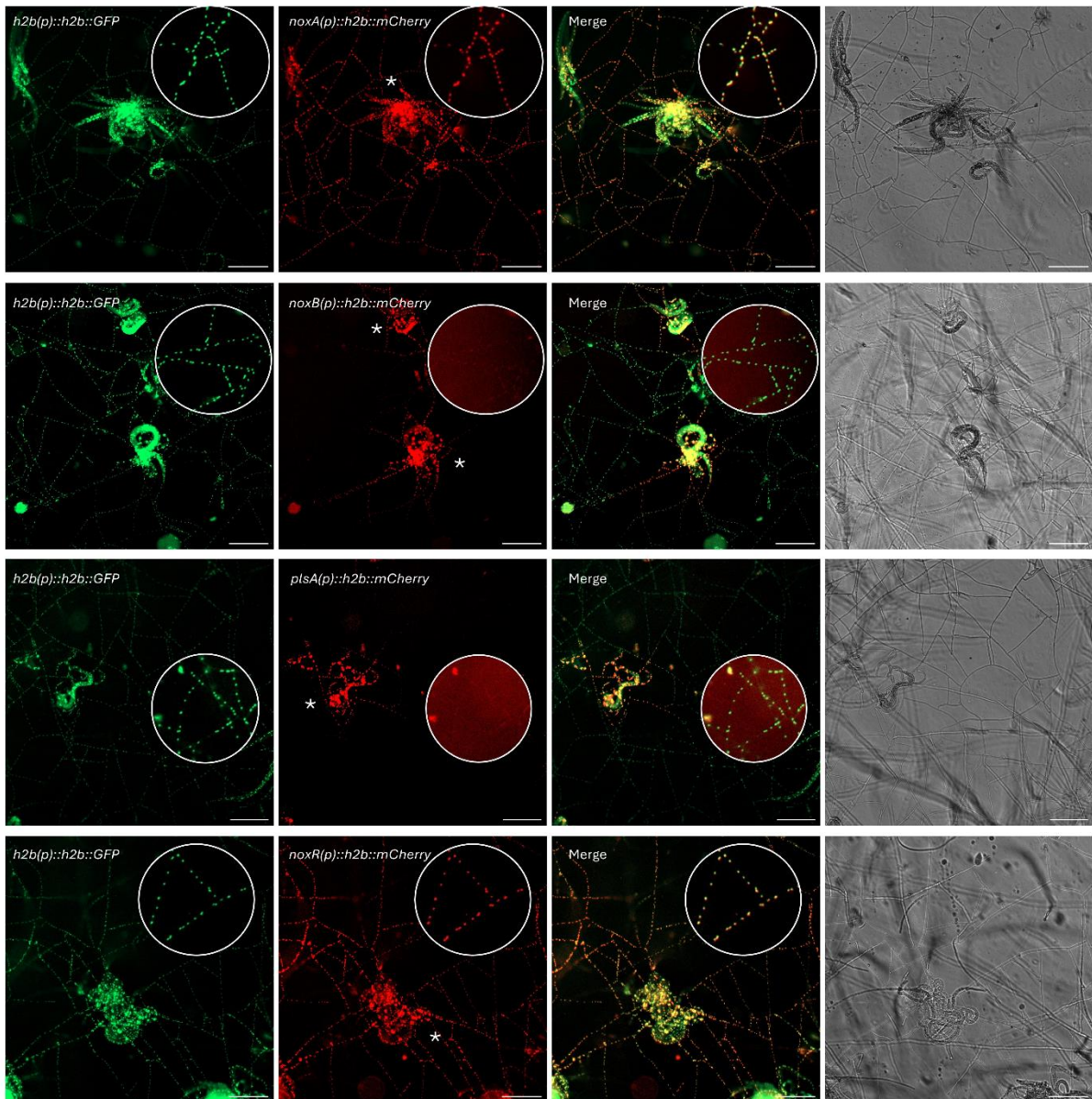
Es zeigte sich, dass die Promotoren von *noxB* und *plsA* in den Fallen sowie in der Umgebung der Fallen stark aktiv waren. Im Gegensatz dazu waren die Promotoren von *noxR* und *noxA* konstitutiv aktiv, sowohl im vegetativen Myzel als auch in den Fallen. Die

Fluoreszenz der Zellkerne in Fallen wurde anschließend quantifiziert und mit vegetativen Hyphen ohne Nematodeninduktion verglichen ( $n \approx 75$  Zellkerne) (**Abb. 19 B**). Die Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen: *noxA* wies eine mittlere relative Fluoreszenz von  $898,39 (\pm 86,03)$  im vegetativen Myzel und  $912 (\pm 194,37)$  in Fallen auf, was keinen signifikanten Unterschied darstellt. Auch *noxR* zeigte keine signifikante Steigerung der Fluoreszenz ( $331,62 \pm 103,51$  vs.  $377,51 \pm 65,29$ ). Im Gegensatz dazu zeigte der *noxB*-Promotor eine deutliche Steigerung in den Fallen ( $169,61 \pm 4,08$  vs.  $669,26 \pm 165,84$ ), ebenso wie der Promotor des putativen Interaktionspartners *plsA* ( $219 \pm 9,47$  vs.  $709,03 \pm 211,09$ ).

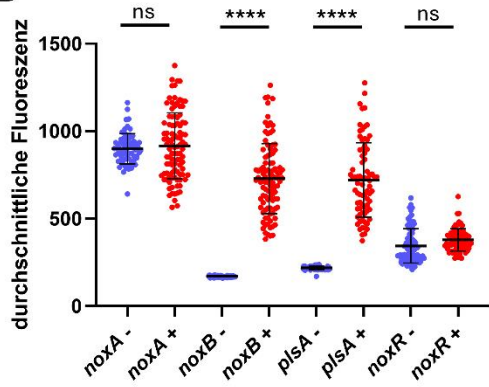
Zur weiteren Quantifizierung der Genexpression wurde eine quantitative RT-qPCR durchgeführt (**Abb. 19 C**). Das Experiment wurde in drei biologischen Replikaten wiederholt. Eine Sporensuspension des WT wurde gleichmäßig auf LNA-Platten verteilt. Nach einem Tag Inkubation bei  $28^\circ\text{C}$  wurden Nematoden auf die Hälfte der Platten gegeben, gefolgt von einem weiteren Tag Inkubation. Das Myzel wurde anschließend geerntet und die RNA mit dem E.Z.N.A. Fungal RNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) isoliert. Als Haushaltsgen wurde *h2b* verwendet.

Die normalisierte Expression von *noxA* verringerte sich von  $0,32 (\pm 0,0561)$  im uninduzierten Zustand auf  $0,073 (\pm 0,0067)$  im induzierten Zustand, was einer etwa 4,4-fachen Herunterregulation entspricht. Im Gegensatz dazu wurden *noxB* und *plsA* signifikant hochreguliert. Die Expression von *noxB* stieg von  $0,0178 (\pm 0,0074)$  auf  $0,0512 (\pm 0,0039)$ , während *plsA* von  $0,0116 (\pm 0,0033)$  auf  $0,088 (\pm 0,0079)$  zunahm. Die Expression von *noxR* stieg leicht von  $0,0329 (\pm 0,0111)$  auf  $0,059 (\pm 0,0139)$ . Diese Ergebnisse weisen auf eine räumlich-zeitliche Differenzierung in der Expression der Nox-Proteine hin.

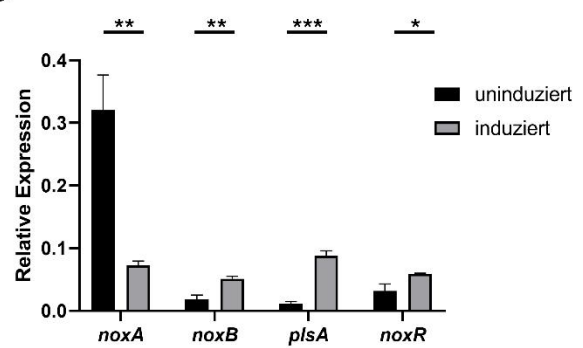
**A**



**B**



**C**



Abbildungsbeschriftung auf der nächsten Seite

**Abbildung 19: Expressionsanalyse von *noxA*, *noxB*, *noxR* und *plsA* während der pathogenen Phase.** (A) Mikroskopie der Promotorfusionen. Als Kontrolle dienten Stämme mit konstitutiver *h2b(p)::h2b::GFP*-Expression. Die Expression von *h2b::mCherry* unter der Kontrolle der jeweiligen Promotoren (*noxA*, *noxB*, *noxR*, *plsA*) spiegelt die Promotoraktivität wider und korreliert mit der Intensität der Fluoreszenz in den Zellkernen. Asterisken zeigen die Positionen der Fallen, der weiße Kreis hebt eine vergrößerte Ansicht einer Stelle ohne Fallen hervor. Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ . (B) Quantifizierung der mittleren Fluoreszenz der Zellkerne für die jeweiligen Promotorfusionen. Die blauen Punkte repräsentieren Zellkerne von vegetativen Hyphen, während die roten Punkte Zellkerne von Fallen zeigen ( $n \approx 75$  Zellkerne). (C) Relative Genexpression von *noxA*, *noxB*, *plsA* und *noxR* bestimmt durch RT-qPCR. Schwarzer Balken: RNA aus uninduziertem Zustand (ohne Nematoden); grauer Balken: RNA aus induziertem Zustand (mit Nematoden). \*\*\* $P < 0,0001$ ; \*\* $P < 0,001$ ; \* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ ; ns = nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger t-Test).

### 3.2.3 NoxA lokalisiert an der Zytoplasmamembran in vegetativen Hyphen, während NoxB und PlsA in vesikelförmigen Strukturen in Fallen lokalisieren

Die Expressionsdaten deuteten darauf hin, dass die Nox-Proteine phasenabhängig exprimiert werden, wobei sich ihr Expressionsmuster zwischen der pathogenen und nicht-pathogenen Phase unterscheidet, was auf eine funktionelle Trennung ihrer Aufgaben hindeutet. Um weitere Einblicke in die Funktion zu gewinnen, wurden GFP-Fusionen mit NoxA, NoxB, NoxR und PlsA generiert.

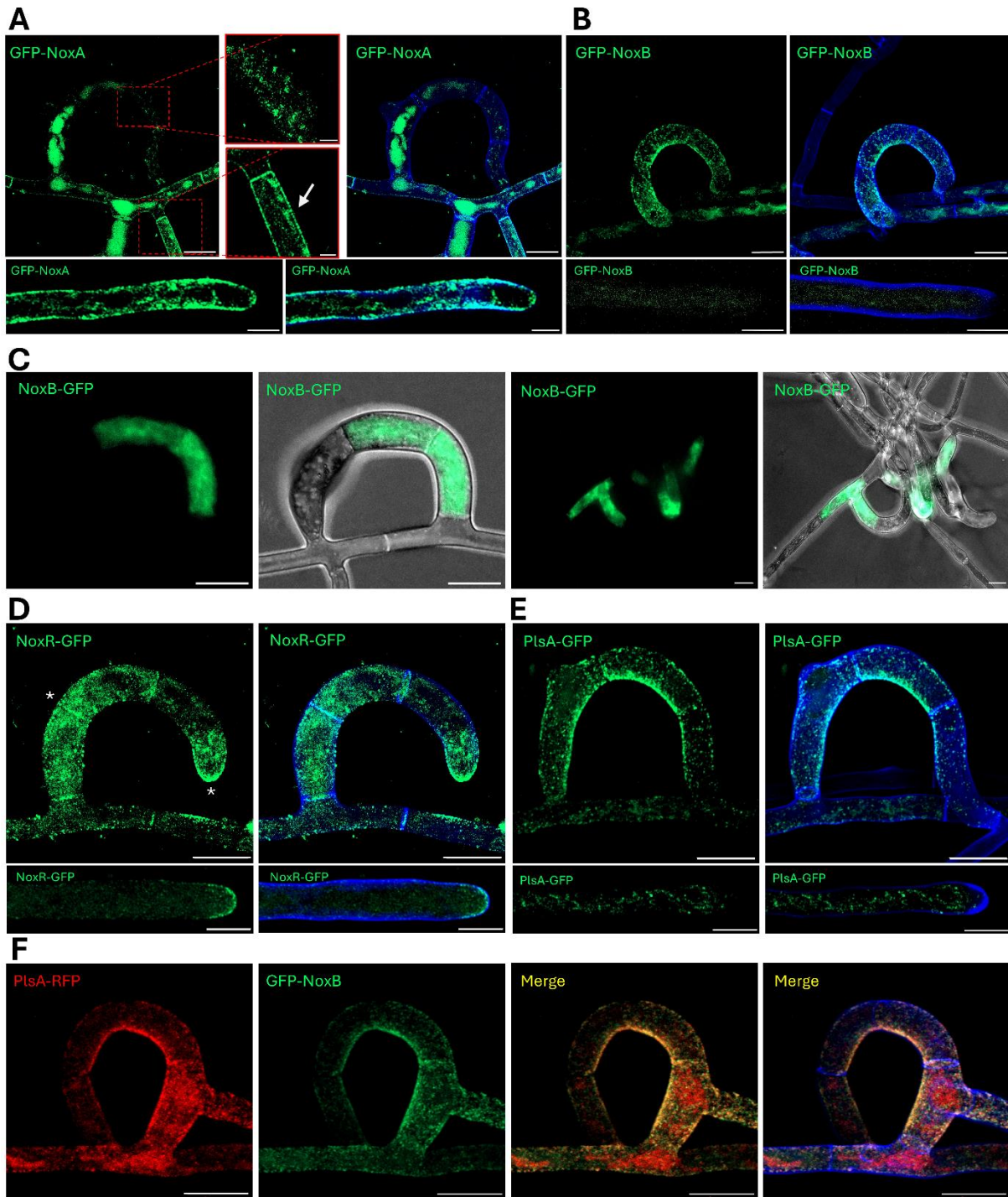
Für NoxA wurden zwei Plasmide konstruiert, um das Protein entweder C-terminal (*noxA(p)::noxA::GFP*) oder N-terminal (*noxA(p)::GFP::noxA*) zu markieren. Beide Stämme zeigten eine ähnliche Lokalisation. In vegetativen Hyphen wurde ein Signal an der Zytoplasmamembran sowie an Septen beobachtet, jedoch nicht in Fallenzellen (**Abb. 20 A**). Dort trat häufig ein starkes zytoplasmatisches Signal oder eine Fluoreszenz in vakuolenartigen Kompartimenten auf. Insgesamt zeigte der Stamm mit C-terminaler Fusion häufiger ein diffuses zytoplasmatisches beziehungsweise vermutlich vakuoläres Signal als die N-terminale Variante. Die C-terminale Fusion war in der Lage, den  $\Delta noxA$ -Stamm zu komplementieren, was auf die Funktionalität dieses Fusionsproteins hinweist. Es wurde keine Komplementation mit der N-terminalen GFP-Fusion generiert.

Die N-terminale GFP-Fusion von NoxB (*noxB(p)::GFP::noxB*) lokalisierte ausschließlich an der Innenseite von Fallen in vesikelartigen Strukturen (**Abb. 20 B**). Diese ähneln den zuvor beschriebenen Lokalisationen sekretierter Proteine wie NipA oder CyrA (Emser et al., 2024; Wernet et al., 2021). Im Gegensatz zu diesen Proteinen veränderte sich die Vesikellokalisierung jedoch nicht, wenn ein Nematode in den Fallen gefangen wurde. Die C-terminale Fusion zeigte dagegen eine deutlich veränderte Lokalisation (**Abb. 20 C**). In Fallen wurde häufig ein starkes zytoplasmatisches Signal beobachtet, insbesondere in den ersten beiden Fallenkompartimenten. Gelegentlich traten auch membranähnliche Strukturen auf, die möglicherweise dem endoplasmatischen Retikulum (ER) entsprechen. Bei

Komplementationsversuchen konnte ausschließlich die N-terminale GFP-Fusion den  $\Delta noxB$ -Stamm rekonstituieren. Dies spricht dafür, dass diese Fusion funktionell ist, während die C-terminale Variante vermutlich eine artifizielle Lokalisation aufweist.

Für NoxR wurde eine C-terminale GFP-Fusion (*noxR(p)::noxR::GFP*) generiert (**Abb. 20 D**). Diese lokalisierte überwiegend halbmondförmig an der Spitze wachsender vegetativer Hyphen und Fallenhypen sowie schwächer an Septen. In Fallenzellen wurde zusätzlich eine erhöhte zytoplasmatische Fluoreszenz mit verteilten punktförmigen Akkumulationen an der äußeren Zellmembran beobachtet, wobei insbesondere die ersten beiden Zellen verstärkte Intensität aufwiesen.

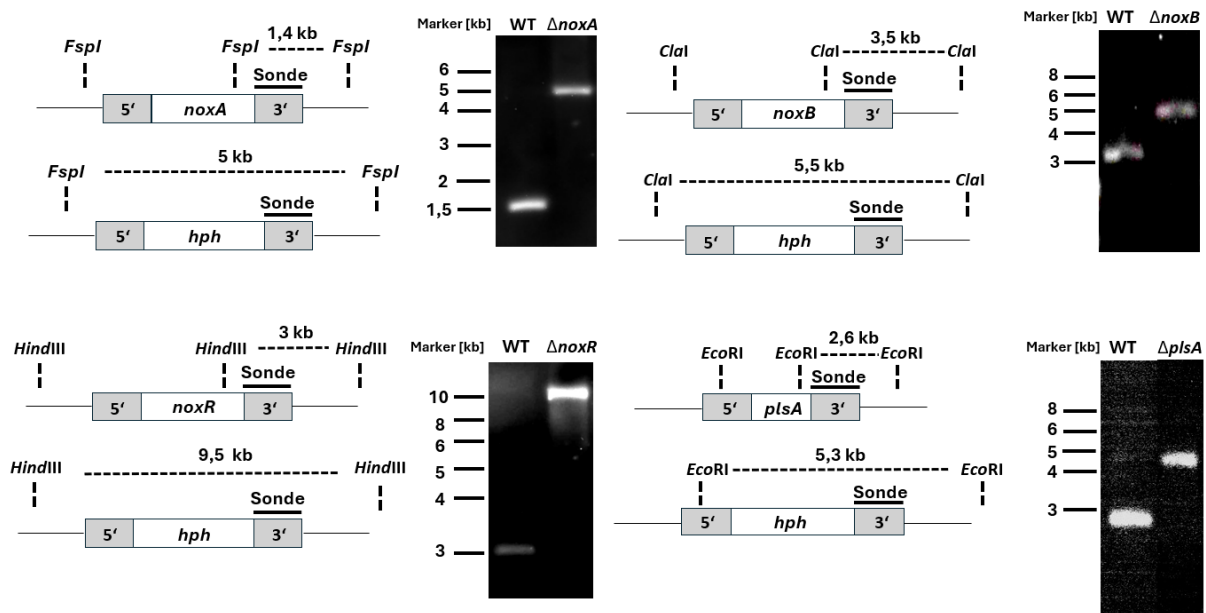
Das putativ mit NoxB interagierende Tetraspanin PlsA wurde ebenfalls C-terminal mit GFP fusioniert (*plsA(p)::plsA::GFP*) und zeigte eine mit NoxB übereinstimmende Lokalisation in vesikelartigen Strukturen an der Fallenninnenseite (**Abb. 20 E**). Die C-terminale Fusion konnte den Phänotyp des  $\Delta plsA$ -Stammes komplementieren. Zur Untersuchung der Kolo-kalisation wurde zusätzlich ein *plsA::mCherry*-Konstrukt (*plsA(p)::plsA::mCherry*) ektopisch in den GFP::NoxB-Stamm transformiert (**Abb. 20 F**). Dabei zeigte sich eine überlappende Fluoreszenz beider Proteine an der Fallenninnenseite.



**Abbildung 20: Mikroskopische Lokalisation von GFP-Fusionen mit NoxA, NoxB, NoxR und PlsA.** (A) GFP-NoxA lokalisiert an der äußeren Zellmembran vegetativer Hyphen sowie in vakuolenähnlichen Strukturen. In Fallen wurde kein Signal an der äußeren Zellmembran detektiert. Calcofluor White (blau) wurde zur Visualisierung der Hyphenstruktur eingesetzt. (B, C) N-terminale und C-terminale GFP-Fusionen von NoxB. Bei der N-terminalen Fusion akkumulierte NoxB in vesikelartigen Strukturen an der Innenseite von Fallen. Bei der C-terminalen Fusion lokalisierte NoxB überwiegend in den ersten beiden Kompartimenten der Fallen und zeigte ein starkes zytoplasmatisches Signal. Nur die N-terminale GFP-Fusion konnte den  $\Delta noxB$ -Phänotyp vollständig komplementieren. (D) NoxR-GFP lokalisierte in einer halbmondförmigen Struktur an der Spitze wachsender Hyphen. In Fallen wurde ein stärkeres zytoplasmatisches Signal im Vergleich zu vegetativen Hyphen beobachtet. (E, F) PlsA-GFP zeigte eine identische Lokalisation wie GFP-NoxB, mit vesikelartigen Strukturen an der Fallenninnenseite. Kolokalisationsstudien mit GFP-NoxB und PlsA-mCherry zeigten überlappende Signale. Maßstabsbalken Fallen: 10  $\mu\text{m}$ . Maßstabsbalken Hyphen: 5  $\mu\text{m}$ . Maßstabsbalken GFP-NoxA-Vergrößerung: 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.4 Die Deletion von *noxA* und *noxR* führt zu einer Beeinträchtigung der Hyphenfusion

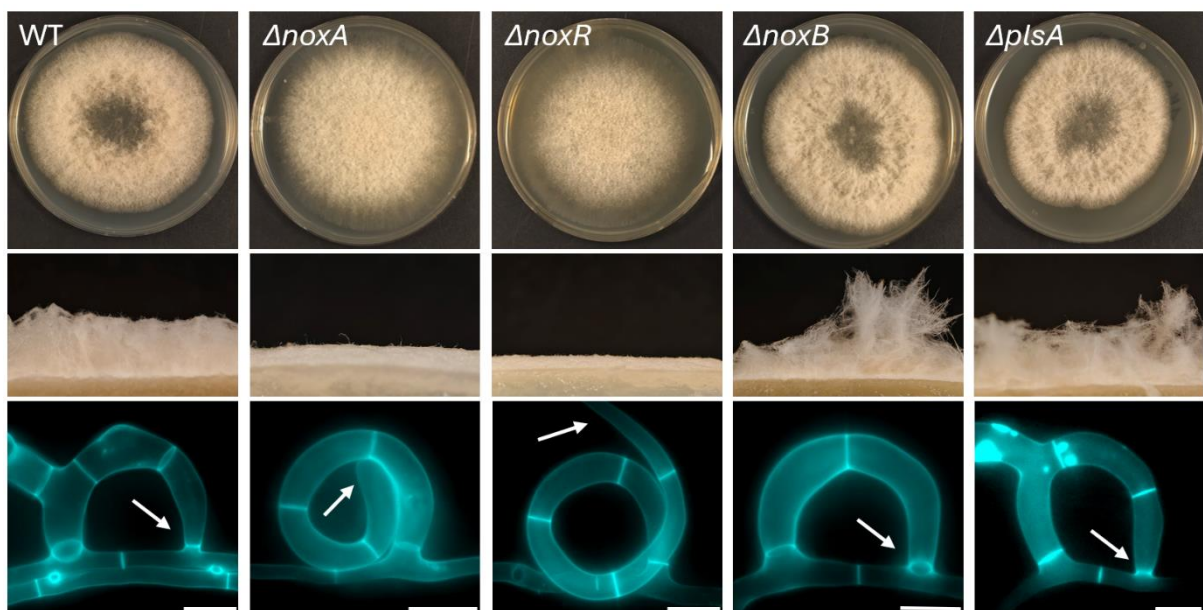
Um weitere Informationen über die Funktion von *noxA*, *noxB*, *noxR* und *plsA* zu gewinnen, wurden die jeweiligen Gene mittels homologer Rekombination deletiert. Hierzu wurden jeweils 1 kb der flankierenden Sequenzen an eine Hygromycin-Resistenzkassette in pJET1.2 kloniert. Die Transformationsfragmente wurden per PCR amplifiziert und anschließend in *A. flagrans* transformiert. Die korrekte Deletion der einzelnen Stämme wurde anschließend mittels Southern-Blot-Analyse bestätigt (Abb. 21).



**Abbildung 21: Southern-Blot-Analyse zur Bestätigung der *nox*-Deletionsmutanten.** Zur Verifikation der *noxA*-Deletion wurde die gDNA mit *FspI* verdaut und es wurde ein Fragment von 1,4 kb im WT und 5 kb im Deletionsstamm erwartet. Für die Bestätigung der  $\Delta$ *noxB*-Deletion wurde die gDNA mit *ClaI* geschnitten und erwartet wurden Fragmente von 3,5 kb im WT und 5,5 kb bei erfolgreicher Deletion. Die Analyse des  $\Delta$ *noxR*-Stammes erfolgte nach Verdau mit *HindIII*, wobei ein Fragment von 3 kb im WT und 9,5 kb im Deletionsstamm erwartet wurde. Für die Deletion des *plsA*-ORFs wurde *EcoRI* verwendet und es wurden Fragmente von 2,6 kb im WT und 5,3 kb im Deletionsstamm erwartet.

Auf Festmedium zeigte sich, dass die  $\Delta noxA$ - und  $\Delta noxR$ -Stämme ein verändertes Wachstumsverhalten aufwiesen (**Abb. 22**). Der WT bildet normalerweise Luftmyzel, wodurch die Kolonie in die Höhe wächst und ein flaumiges Erscheinungsbild erhält. In den  $\Delta noxA$ - und  $\Delta noxR$ -Stämmen wurde dagegen kaum Luftmyzel gebildet, sodass die Kolonien flach blieben. Die  $\Delta noxB$ - und  $\Delta plsA$ -Stämme zeigten hingegen kein verändertes Myzelwachstum und wiesen auf Festmedium ein vergleichbares Erscheinungsbild wie der WT auf.

Das Fehlen von Luftmyzel wurde bereits zuvor in *A. flagrans* beschrieben und korreliert mit einer Beeinträchtigung der Hyphenfusion (Haj Hammadeh et al., 2022). Mikroskopische Analysen bestätigten, dass die  $\Delta noxA$ - und  $\Delta noxR$ -Stämme die Fähigkeit zur Hyphenfusion verloren hatten. Dies war besonders während der Fallenbildung deutlich. Während der WT sowie der  $\Delta noxB$ - und  $\Delta plsA$ -Stamm normale geschlossene Ringfallen ausbildeten, konnten die Fallen der  $\Delta noxA$ - und  $\Delta noxR$ -Stämme nicht mehr fusionieren, wodurch offene, schraubenförmige Fallen entstanden (**Abb. 22**).



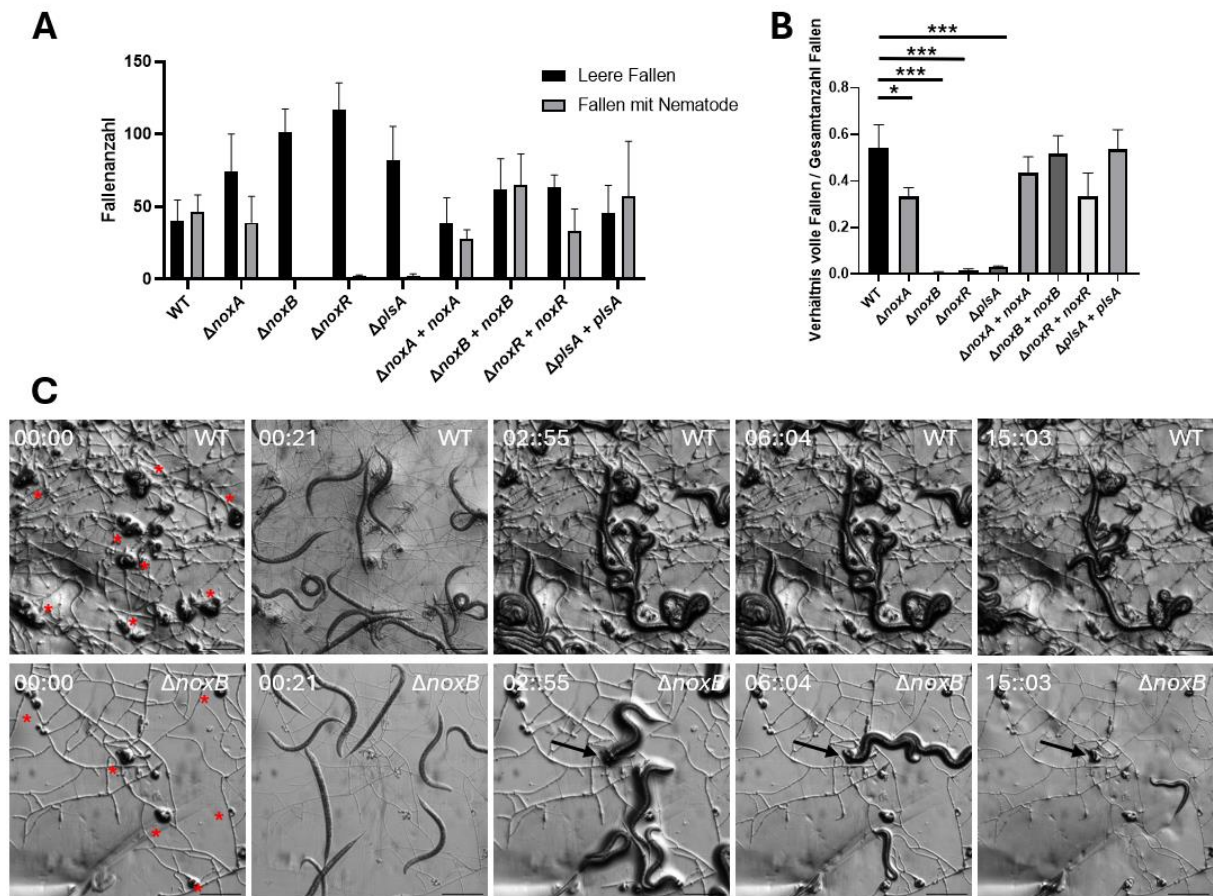
**Abbildung 22: Phänotyp der  $\Delta noxA$ -,  $\Delta noxR$ -,  $\Delta noxB$ - und  $\Delta plsA$ -Deletionsstämme.** Obere Reihe: Wachstum der Deletionsstämme nach fünf Tagen auf PDA. Der Durchmesser der Kolonie ist gleich, jedoch bildeten  $\Delta noxA$  und  $\Delta noxR$  kein Luftmyzel. Mittlere Reihe: Seitenansicht des Luftmyzelwachstums. Die  $\Delta noxA$ - und  $\Delta noxR$ -Stämme blieben flach, im Vergleich zum WT,  $\Delta noxB$  und  $\Delta plsA$ . Untere Reihe: Fallenmorphologie der Deletionsstämme. Während die Fallen von WT,  $\Delta noxB$  und  $\Delta plsA$  normale geschlossene Fallen ausbildeten, konnten die Fallen von  $\Delta noxA$  und  $\Delta noxR$  keine Hyphenfusion mehr durchführen, was zu nicht geschlossenen Fallen führte. Calcofluor White (cyan) wurde zur Visualisierung der Fallenstruktur eingesetzt. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.5 NoxB, PlsA und NoxR sind essenziell für die Virulenz, während NoxA keinen signifikanten Einfluss zeigt

Bei der mikroskopischen Analyse der  $\Delta noxB$ -,  $\Delta plsA$ - und  $\Delta noxR$ -Stämme fiel auf, dass im Vergleich zum WT deutlich mehr Fallen ohne gefangene Nematoden vorkamen. Insbesondere große Nematoden wurden nur selten in Fallen beobachtet. Zur quantitativen Bestimmung der Fangeffizienz wurde daher ein entsprechendes Experiment durchgeführt (**Abb. 23**).

Als Erstes wurden Nematoden synchronisiert, um eine homogene Größe der Tiere zu gewährleisten. *A. flagrans* wurde auf LNA-Gelkissen inokuliert und die Fallenbildung wurde durch eine gemischte Nematodenpopulation induziert. Nach 24 Stunden wurden die Nematoden mit sterilem dH<sub>2</sub>O abgewaschen. Anschließend wurden gleich große Agarstücke (0,25 cm<sup>2</sup>) ausgestanzt und in 35-mm-Mikroskopieschalen (ibidi, Gräfelfing) überführt. Auf jedes Agarstück wurden etwa 150 synchronisierte adulte Nematoden pipettiert. Nach 30 Minuten wurden die Anzahl leerer Fallen sowie die Anzahl der Fallen mit gefangenen Nematoden bestimmt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Zusätzlich wurden Zeitrafferaufnahmen mit einem Stereomikroskop (Axio Zoom.V16, Zeiss, Jena) erstellt.

Im WT wurden Nematoden schnell gefangen, und bereits nach einer Minute befand sich eine große Zahl von Individuen in Fallen. Dabei wurden im Durchschnitt ähnlich viele leere Fallen ( $40 \pm 12,03$ ) wie Fallen mit gefangenen Nematoden ( $46,67 \pm 9,39$ ) gezählt. Der  $\Delta noxA$ -Stamm zeigte eine moderate Reduktion der Fangrate mit 74 ( $\pm 21,28$ ) leeren Fallen und 39 ( $\pm 14,85$ ) Fallen mit Nematoden. Dagegen wurden bei den  $\Delta noxB$ -,  $\Delta noxR$ - und  $\Delta plsA$ -Stämmen kaum gefangene Nematoden beobachtet. Der  $\Delta noxB$ -Stamm wies 101 ( $\pm 0,67$ ) leere Fallen und 0,67 ( $\pm 0,47$ ) Fallen mit Nematoden auf. Beim  $\Delta plsA$ -Stamm wurden 117 ( $\pm 14,97$ ) leere und 2 ( $\pm 0,81$ ) belegte Fallen gezählt, während der  $\Delta noxR$ -Stamm 81,67 ( $\pm 19,4$ ) leere und 2,67 ( $\pm 0,94$ ) belegte Fallen aufwies. Die Umrechnung in das Verhältnis belegter Fallen zu Gesamtanzahl der Fallen verdeutlicht die Unterschiede. Im WT enthielten 54 % ( $\pm 8,2$  %) der Fallen einen Nematoden, bei  $\Delta noxA$  waren es 33,3 % ( $\pm 3,1$  %), bei  $\Delta noxB$  0,6 % ( $\pm 0,4$  %), bei  $\Delta noxR$  1,7 % ( $\pm 0,5$  %) und bei  $\Delta plsA$  3,1 % ( $\pm 0,3$  %). In den jeweiligen Komplementationsstämmen wurde der WT-Phänotyp wiederhergestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass der  $\Delta noxA$ -Stamm nur gering in der Fangfähigkeit beeinträchtigt ist, während  $\Delta noxB$ ,  $\Delta noxR$  und  $\Delta plsA$  signifikant defekte Fangmechanismen aufweisen und insbesondere größere Nematoden nicht effektiv festhalten können. Da wiederholt beobachtet wurde, dass Nematoden in Fallen eindringen und anschließend wieder entkamen, wurde vermutet, dass die Adhäsionsfähigkeit der Fallen reduziert ist (**Abb. 23 C**).

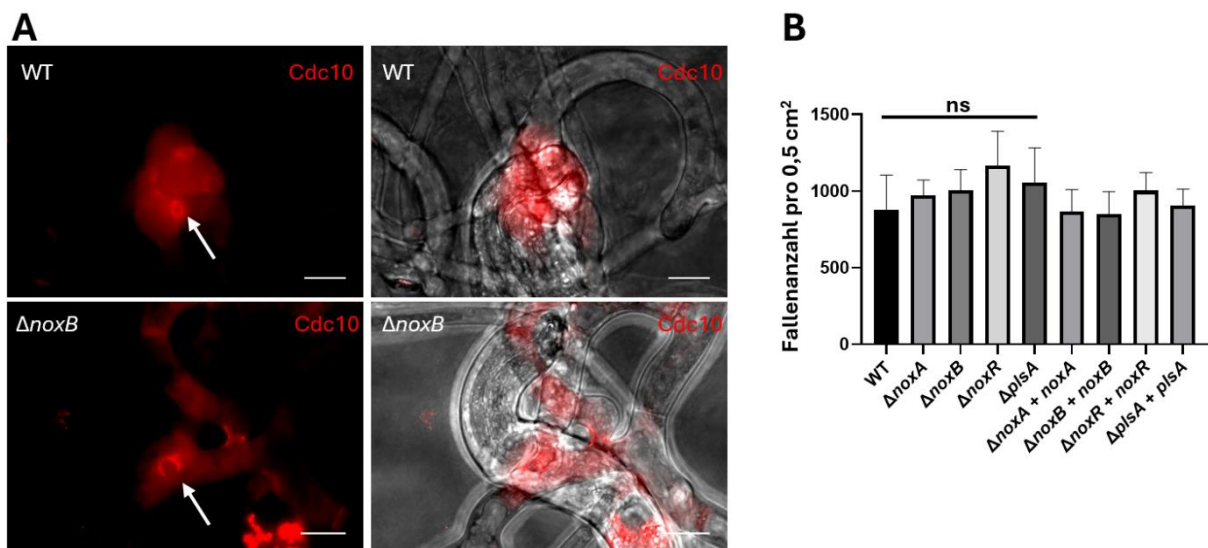


**Abbildung 23: Virulenzanalyse der *nox*-Deletionsstämme.** (A, B) WT-,  $\Delta noxA$ -,  $\Delta noxB$ -,  $\Delta noxR$ - und  $\Delta plsA$ -Stämme wurden auf LNA-Gelkissen inokuliert und die Fallenbildung mit einer gemischten *C. elegans*-Population induziert. Nach 24 Stunden wurden die Nematoden abgewaschen und synchronisierte L4-Nematoden auf jeweils ein 0,25 cm<sup>2</sup> großes Gelkissen mit Fallen pipettiert. Nach 30 Minuten wurde die Anzahl der Fallen mit gefangenen Nematoden sowie leerer Fallen bestimmt ( $n = 3$ ). (C) Zeitrafferaufnahme vom WT und dem  $\Delta noxB$ -Deletionsstamm beim Nematodenfang. Die roten Asterisken markieren Positionen von leeren Fallen. Der schwarze Pfeil markiert die Position eines Nematoden, der sich aus einer Falle nach einiger Zeit befreit. Der WT war in der Lage, schnell Nematoden zu fangen, während die Fallen von  $\Delta noxB$  leer blieben. Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m. \*\*\*\* $P < 0,0001$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ ; ns = nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger t-Test).

### 3.2.6 Die Deletion von *noxA*, *noxB*, *noxR* oder *plsA* führt zu keiner Beeinträchtigung der Fallenproduktion oder der Nematodenpenetration

In Studien zu NADPH-Oxidase wurde gezeigt, dass die Deletion von *nox*-Genen zu Störungen des Zytoskeletts führen kann, wodurch die Ausbildung des Aktin-Septin-Rings beeinträchtigt wird, der für die Penetration in Pflanzenzellen erforderlich ist (Ryder et al., 2013). Für alle hier untersuchten Deletionsstämme wurde jedoch beobachtet, dass sie weiterhin in der Lage waren, Nematoden zu verdauen. Dennoch sollte überprüft werden, ob die Bildung dieses Rings beeinträchtigt ist. Zu diesem Zweck wurde *Cdc10* mit mCherry fusioniert (*cdc10(p)::cdc10::mCherry*) und in den WT und  $\Delta noxB$ -Stamm transformiert (Abb. 24 A).

Dabei zeigte sich, dass der Septinring sowohl im WT als auch im  $\Delta noxB$ -Stamm korrekt ausgebildet wurde, sodass im Gegensatz zu anderen Spezies keine Beeinträchtigung der Septinringbildung vorliegt. Für *A. oligospora* wurde beschrieben, dass die Deletion von *noxA* zu einer reduzierten Fallenproduktion führt und dass ROS als Signalmoleküle für die Differenzierung der Fallen erforderlich sind. Um zu untersuchen, ob dies auch für *A. flagrans* gilt, wurden der WT sowie die Stämme  $\Delta noxA$ ,  $\Delta noxB$ ,  $\Delta noxR$  und  $\Delta plsA$  auf LNA-Gelkissen inokuliert, mit identischen Mengen an Nematoden induziert und nach 24 Stunden die Fallenanzahl bestimmt. Dabei zeigte sich, dass keiner der Stämme eine signifikante Reduktion der Fallenanzahl aufwies (**Abb. 24 B**). Stattdessen wurde insbesondere im  $\Delta noxR$ -Stamm eine leicht erhöhte Fallenanzahl im Vergleich zum WT beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass trotz der engen Verwandtschaft von *A. flagrans* und *A. oligospora* die molekularen Mechanismen der Falleninduktion zwischen beiden Spezies grundlegend unterschiedlich reguliert sein müssen.

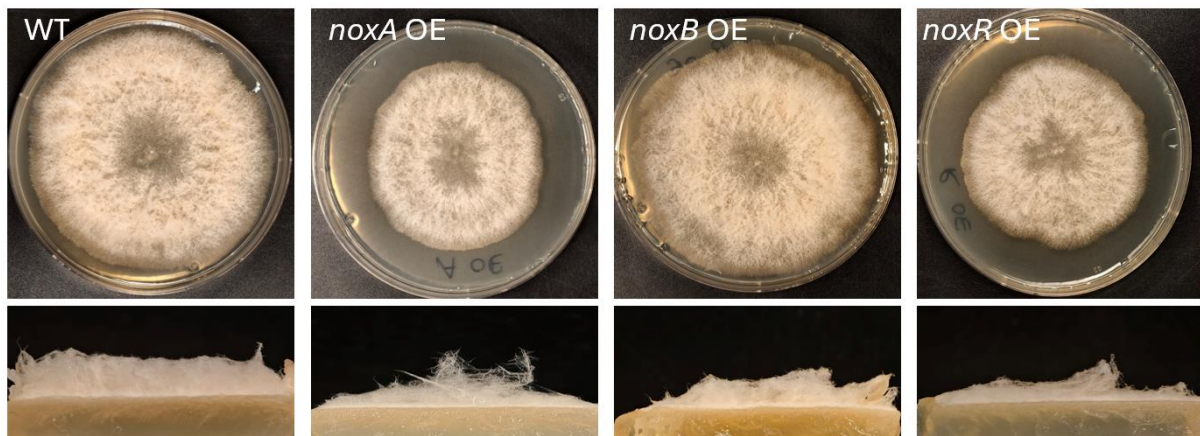


**Abbildung 24: Assay zur Analyse der Penetration von Nematoden und Fallenproduktion.** (A) Das Septin Cdc10 wurde mit mCherry fusioniert und in den WT sowie den  $\Delta noxB$ -Stamm transformiert. Nach Induktion mit Nematoden wurden die Stämme mikroskopisch analysiert. In beiden Stämmen wurde ein klarer Septin-Ring identifiziert. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m. (B) Analyse der Fallenproduktion der Deletionsstämme. Die Stämme wurden auf LNA-Gelkissen mit identischen Mengen an Sporen und Nematoden inokuliert und für 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. \*\*\*\* $P < 0,0001$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ ; ns = nicht signifikant (ungepaarter zweiseitiger t-Test).

### 3.2.7 Die Überexpression von *noxA* und *noxR* zeigt eine geringe Beeinträchtigung des Wachstums

Um weitere Informationen über den Mechanismus der Hyphenfusion sowie die Regulation der Nox-Proteine zu erhalten, wurden Überexpressionsstämme erzeugt. Hierzu wurden *noxA*, *noxB* und *noxR* jeweils unter Kontrolle des Tubulin *tubA*-Promotors in *A. flagrans* transformiert (*tubA(p)::nox(A,B,R)::gluC(t)*) und ektopisch in das Genom integriert. Die Überexpressionsstämme wurden auf PDA-Platten angeimpft und fünf Tage bei 28 °C inkubiert (Abb. 25). Dabei wurde beobachtet, dass die Überexpression von *noxA* und *noxR* zu einem geringeren Koloniedurchmesser im Vergleich zum WT führte. Eine Reduktion der Luftmyzelbildung wurde jedoch nicht festgestellt.

Mikroskopische Analysen zeigten keine auffälligen Veränderungen der Fallenmorphologie, und die Stämme waren in der Lage, Nematoden in vergleichbarem Umfang wie der WT zu fangen. Es konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob die Überexpressionsstämme eine erhöhte ROS-Produktion im Vergleich zum WT aufweisen.

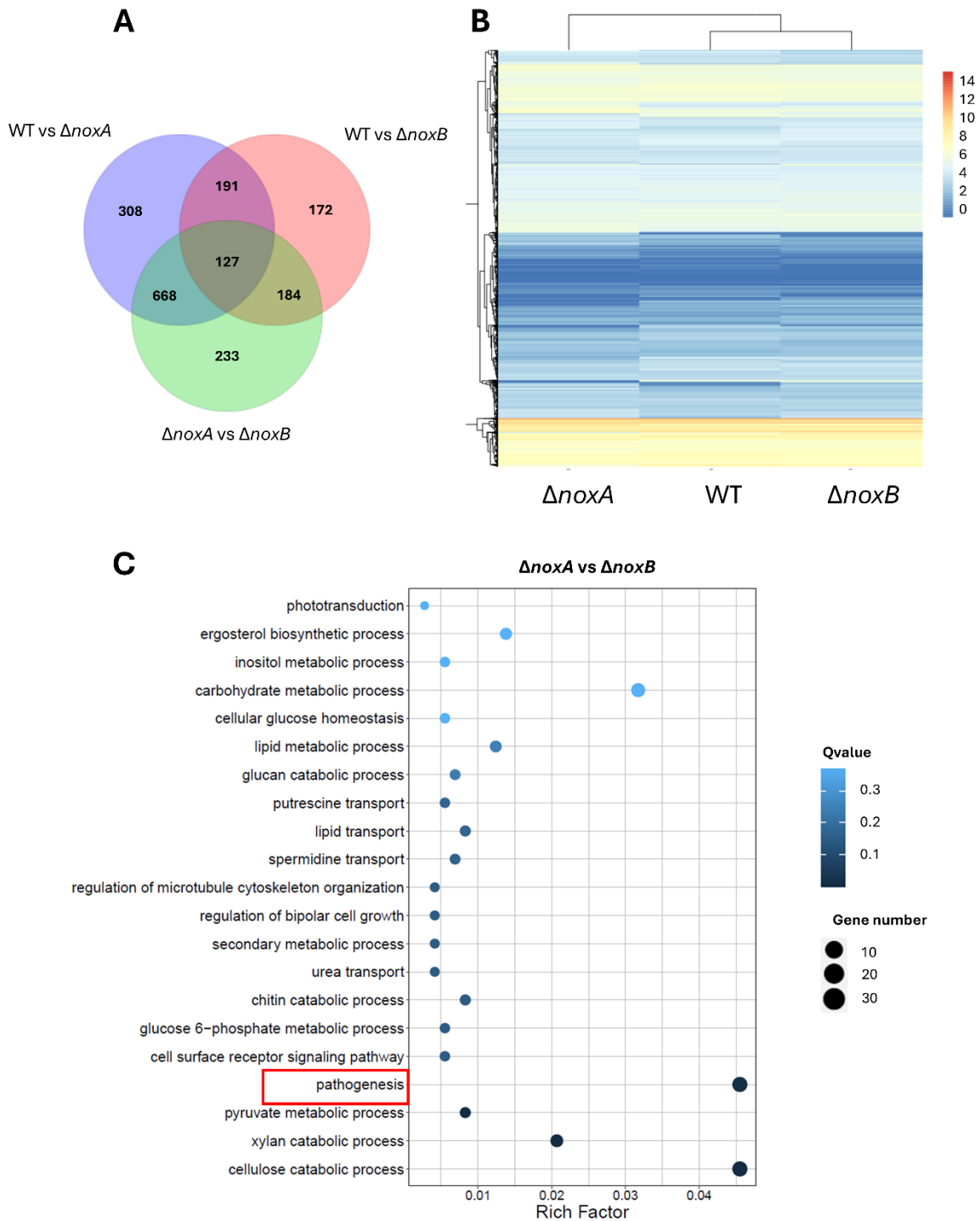


**Abbildung 25: Koloniewachstum des WT und der Überexpressionsstämme von *noxA*, *noxB* und *noxR* nach 5 Tagen.** Die Überexpression von *noxA* und *noxR* führte zu einem reduzierten Koloniedurchmesser im Vergleich zum WT und zum *noxB*-OE-Stamm, während die Luftmyzelbildung nicht beeinflusst war.

### 3.2.8 Verschiedene Gene werden durch NoxA und NoxB reguliert

Die Phänotypen der  $\Delta noxA$ - und  $\Delta noxB$ -Stämme unterscheiden sich deutlich, was darauf hindeutet, dass die beiden Proteine unterschiedliche Zielgene regulieren. Während  $\Delta noxA$  einen Defekt in der Hyphenfusion aufweist, zeigt der  $\Delta noxB$ -Stamm eine verminderte Effizienz beim Einfangen von Nematoden. Um Einblicke in die transkriptionellen Unterschiede beider Stämme zu erhalten, wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt.

Hierfür wurden Sporensuspensionen des WT sowie der Stämme  $\Delta noxA$  und  $\Delta noxB$  hergestellt und gleiche Sporenmengen auf LNA-Platten mit Cellophanfolie inokuliert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 28 °C wurde eine identische Menge einer gemischten Nematodenpopulation zugegeben, um die Fallenbildung zu induzieren und die Kulturen wurden weitere 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Myzel geerntet und die RNA mithilfe des E.Z.N.A. Fungal RNA Kits (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) isoliert. Das Experiment wurde mit drei biologischen Replikaten durchgeführt, die jeweils pro Stamm zusammengeführt und anschließend sequenziert wurden. Die RNA-Sequenzierung erfolgte durch BGI Genomics (Hongkong, China). Im  $\Delta noxA$ -Stamm waren im Vergleich zum WT 1119 Gene hoch- und 948 Gene herunterreguliert (**Abb. 26**). Im  $\Delta noxB$ -Stamm wurden dagegen nur 371 hoch- und 303 herunterregulierte Gene identifiziert. Eine Enrichment-Analyse zeigte, dass in beiden Deletionsstämmen zahlreiche differentiell exprimierte Gene (DEGs) dem Kohlenhydratstoffwechsel zugeordnet sind (**Abb. 26 C**). Auffällig war zudem eine starke Anreicherung pathogenitätsassoziiierter Gene im  $\Delta noxB$ -Stamm, welche im  $\Delta noxA$ -Stamm nicht beobachtet wurde. Umgekehrt zeigte die  $\Delta noxA$ -Mutante eine Anreicherung von Genen aus den Kategorien Rezeptoraktivität und TOR-Signalweg, was mit dem beobachteten Defekt in der Hyphenfusion in Zusammenhang stehen könnte.



**Abbildung 26: RNA-Seq-Analyse der differentiell exprimierten Gene (DEGs) zwischen WT,  $\Delta noxA$  und  $\Delta noxB$  nach Nematodeninduktion. (A) Venn-Diagramm der DEGs zwischen WT und  $\Delta noxA$  (blau), WT und  $\Delta noxB$  (rot) sowie  $\Delta noxA$  und  $\Delta noxB$  (grün). (B) Heatmap der Expressionsprofile differentiell exprimierter Gene in WT,  $\Delta noxA$  und  $\Delta noxB$ . Blau steht für eine niedrige Expression und Rot für eine hohe Expression. (C) Gene-Ontology-(GO)-Anreicherungsanalyse der DEGs von  $\Delta noxA$  im Vergleich zu  $\Delta noxB$ . Die Kreisgröße entspricht der Anzahl der Gene, die Farbintensität repräsentiert den  $P$ -Wert.**

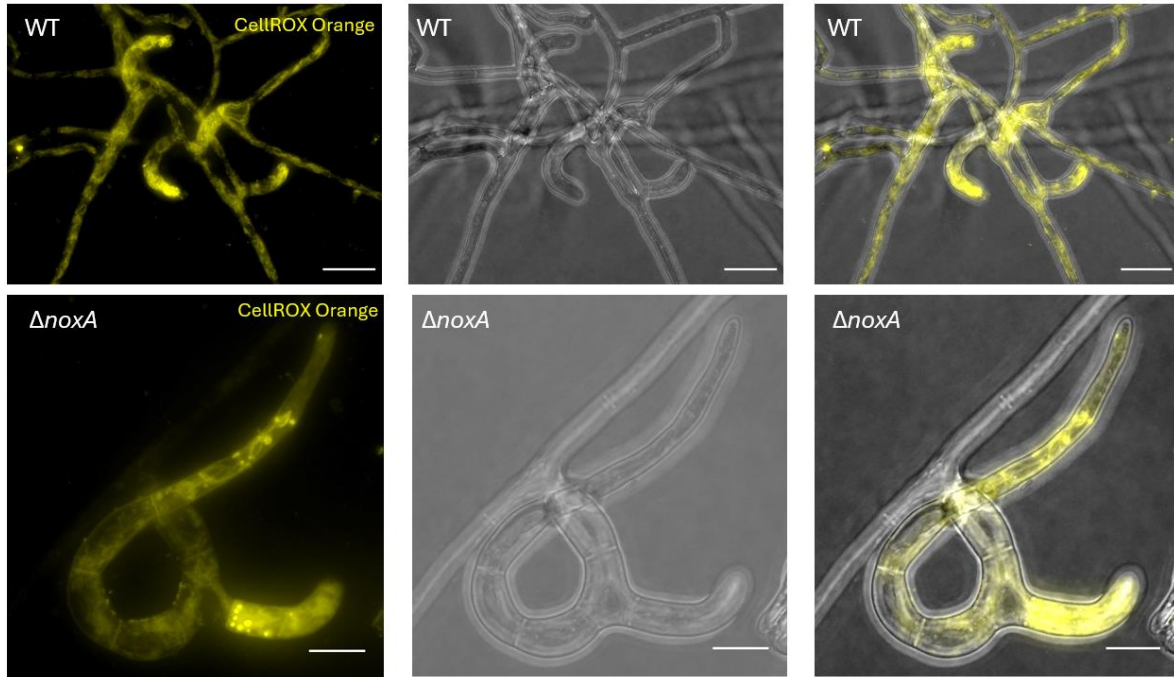
### 3.2.9 Visualisierung der ROS-Konzentration mithilfe von CellROX Orange, OxyBURST Green H<sub>2</sub>HFF-BSA und Nitroblautetrazoliumchlorid

Um eine mögliche Reduktion der ROS-Produktion in den Deletionsmutanten sowie potenzielle ROS-Dynamiken innerhalb der Kolonie zu untersuchen, wurde ROS mithilfe verschiedener Färbemethoden visualisiert. Hierzu wurden CellROX Orange, OxyBURST Green H<sub>2</sub>HFF-BSA und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) eingesetzt.

CellROX Orange ist ein membrangängiger Farbstoff, der nach Oxidation fluoresziert. Nach Anwendung in den Deletionsstämmen und WT wurde ein starkes intrazelluläres Signal beobachtet, einschließlich filamentöser Strukturen, die in allen Zellen beobachtet wurden (**Abb. 27**). Diese entsprechen höchstwahrscheinlich Mitochondrien, die den Großteil der zellulären ROS-Produktion ausmachen. Besonders an Hyphenspitzen und in Fallen wurde ein intensives Signal detektiert, was auf eine erhöhte metabolische Aktivität und damit verbundene mitochondriale ROS-Produktion hindeuten könnte. Ein Signal an der äußeren Zellmembran, an der das durch Nox-Proteine erzeugte ROS zu erwarten wäre, wurde hingegen nicht beobachtet. Zudem zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und den *nox*-Deletionsstämmen.

Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) ist ein Farbstoff, der bei Reduktion zu violetten Kristallen ausfällt. Nach Zugabe von 0,5 % NBT wurde gelegentlich ein blaues Signal an Hyphenspitzen sowie in Fallen beobachtet, das jedoch ebenfalls in den *nox*-Deletionsstämmen auftrat. Aufgrund der hohen Variabilität der Signale war keine zuverlässige Quantifizierung möglich.

OxyBURST Green H<sub>2</sub>HFF-BSA wurde eingesetzt, um mögliche ROS-Oszillationen zu visualisieren. Dieser Farbstoff wurde bereits in Pflanzen verwendet, um ROS-Oszillationen in Wurzelhaaren nachzuweisen und ist durch die Kopplung an ein BSA-Protein nicht membrangängig (Monshausen et al., 2007). Nach Zugabe wurde jedoch eine starke Fluoreszenz über das gesamte Mikroskopiebild hinweg beobachtet, sodass keine auswertbaren Aufnahmen möglich waren. Auch nach Variation von Konzentration und Inkubationsbedingungen konnte kein verwertbares Signal erzielt werden. Da der Farbstoff sehr stark sauerstoffempfindlich ist und rasch oxidiert, führt dies wahrscheinlich schnell zu einer ausgeprägten Hintergrundfluoreszenz. Unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen konnte daher keine geeignete Anwendung für Pilzproben etabliert werden.



**Abbildung 27: Visualisierung der ROS-Produktion mit CellROX Orange.** *A. flagrans* wurde auf LNA angeimpft und 24 Stunden mit Nematoden inkubiert. CellROX Orange wurde direkt vor der Mikroskopie auf das Gelkissen aufgetragen. Es zeigte sich sofort eine deutliche Fluoreszenz, insbesondere an den Hyphenspitzen.

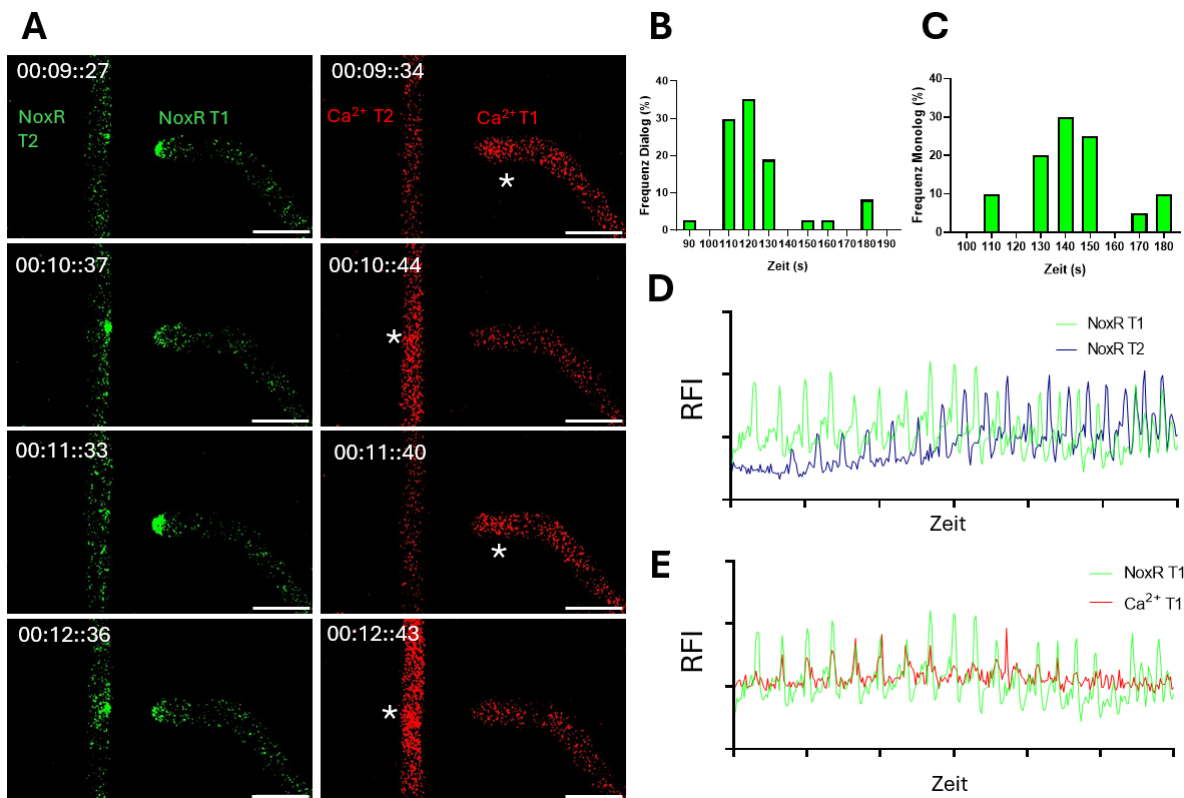
### 3.2.10 NoxR oszilliert an der Hyphenspitze

Da NoxR an der Hyphenspitze lokalisiert und für die Hyphenfusion erforderlich ist, wurden Zeitrafferaufnahmen der NoxR-GFP-Lokalisation während der Interaktion mit einem Fusionspartner („Dialog“) sowie ohne Partner („Monolog“) durchgeführt. In Hyphen ohne Fusionspartner zeigte NoxR eine oszillierende Lokalisation. Sobald zwei Hyphen in den Dialogzustand übergingen, wurde eine antiphasische Oszillation beobachtet, wie sie zuvor auch für SofT und MakB beschrieben wurde (Wernet et al., 2023) (**Abb. 28 A, D**). Zur Bestimmung der Oszillationsperiode wurden Zeitraffersequenzen analysiert und die Zeitintervalle zwischen Fluoreszenzmaxima quantifiziert (**Abb. 28 B, C**). Dabei ergab sich eine mittlere Periodendauer von  $142 (\pm 17,76)$  Sekunden im Monologzustand ( $n = 20$  Zyklen) und eine kürzere Periodendauer von  $123,53 (\pm 20,59)$  Sekunden im Dialogzustand ( $n = 37$  Zyklen). Diese Ergebnisse sprechen für eine rhythmische Aktivierung von NoxA an der Hyphenspitze und deuten auf eine entsprechende periodische ROS-Produktion hin.

In Pflanzenwurzelhaaren wurde bereits gezeigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$ - und ROS-Signale während des polaren Wachstums gekoppelt oszillieren und sich gegenseitig beeinflussen (Monshausen et al., 2007). Für Pilze ist ein solcher Zusammenhang bislang nicht eindeutig beschrieben. OxyBURST Green  $\text{H}_2\text{HFF-BSA}$  wurde eingesetzt, ein Farbstoff, der in Pflanzen zur Detektion von ROS-Oszillationen verwendet wird. In *A. flagrans* ergab sich jedoch kein auswertbares

Signal, vermutlich aufgrund schneller Oxidation und daraus resultierender hoher Hintergrundfluoreszenz. Insgesamt konnte daher keine eindeutige ROS-Oszillation an der Hyphenspitze nachgewiesen werden.

Für *A. flagrans* wurde in anderen Studien gezeigt, dass MakB und SofT zunächst in der gleichen Phase und bei Annäherung eines Fusionspartners antiphasisch oszillieren (Wernet et al., 2023). Zudem oszillieren  $\text{Ca}^{2+}$  und SofT synchron. Um die Phasenbeziehung zwischen NoxR und  $\text{Ca}^{2+}$  zu untersuchen, wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor R-GECO (*h2b(p)::R-GECO-mCherry*) in einen Stamm transformiert, der NoxR-GFP exprimiert (Abb. 28 A, E). Die simultane Fluoreszenzanalyse während der Hyphenfusion zeigte, dass die Signal-Peaks der NoxR- und R-GECO-Signale korrelieren, wobei das  $\text{Ca}^{2+}$ -Maximum kurz nach dem NoxR-Maximum auftritt. Dies deutet darauf hin, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und NoxR-Aktivität gekoppelt oszillieren, möglicherweise im Zusammenhang mit einer rhythmischen ROS-Signalgebung.



**Abbildung 28: Dynamik der Oszillation von NoxR-GFP und  $\text{Ca}^{2+}$  während der Hyphenfusion.** (A) Zeitrafferaufnahmen von NoxR-GFP und  $\text{Ca}^{2+}$  (R-GECO) während der Hyphenfusion. Die Asterisken markieren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes in der jeweiligen Hyphe. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes traten stets kurz nach einem Peak von NoxR-GFP auf. Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ . (B, C) Häufigkeitsverteilung der Oszillationsperioden von NoxR während der Hyphenfusion mit einem Fusionspartner (Dialog) und ohne Partner (Monolog). (D) Fluoreszenzintensitätsprofile von NoxR-GFP in zwei fusionierenden Hyphen (NoxR T1 und NoxR T2), die eine antiphasische Oszillation zeigen. (E) Fluoreszenzintensitätsprofile von NoxR-GFP und  $\text{Ca}^{2+}$  während der Hyphenfusion. Die Peaks der beiden Signale treten häufig überlappend auf.

## 4. Diskussion

Die Fallenmorphogenese von NTF stellt einen hochkomplexen Differenzierungsprozess dar, bei dem mehrere zelluläre Mechanismen koordiniert zusammenwirken müssen, um eine funktionelle Fangstruktur auszubilden. Zunächst werden Signalwege aktiviert, die die Differenzierung spezialisierter Fallenzellen ermöglichen. Anschließend erfolgt eine präzise Steuerung des polaren Wachstums, das die Hyphenkrümmung und schließlich die Fusion mit der basalen Hyphe erlaubt. Parallel dazu wird ein spezifisches Transkriptionsprogramm induziert, das die Expression von Proteinen ermöglicht, die für Nematodenanziehung, Adhäsion und Penetration erforderlich sind. Vergleichbar mit dimorphen pathogenen Pilzen wie *Candida albicans*, die zwischen virulenten und nicht-virulenten Zuständen wechseln, stellt auch *A. flagrans* ein geeignetes Modellsystem dar, um den Übergang in eine pathogene Phase sowie die zugrunde liegenden ökologischen Interaktionen mit Nematoden zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde die Fallenmorphogenese mit Fokus auf Zellendmarkerproteine (CEMPs) und NADPH-Oxidasen (Nox) analysiert. Dabei zeigte sich, dass die CEMPs TeaA, TeaC und TeaR für das polare Wachstum während der Fallenbildung relevant sind, wobei TeaR eine weniger dominante Rolle einnimmt als in *A. nidulans*. Etablierte Modelle aus *A. nidulans* sind möglicherweise nur eingeschränkt auf *A. flagrans* übertragbar, was auf eine evolutionäre Modifikation der CEMP-Funktion durch NTF hindeutet. Für die NADPH-Oxidasen zeigte sich eine funktionelle Spezialisierung. NoxA ist primär an der Hyphenfusion beteiligt, während NoxB und sein putativer Interaktionspartner PlsA spezifisch in Fallen exprimiert werden und dort zur Virulenz beitragen. Der gemeinsame Aktivator NoxR ist hingegen in beide Prozesse involviert. Auffällig war die beobachtete Oszillation von NoxR an der Hyphenspitze, die auf eine möglicherweise rhythmische ROS-Produktion in filamentösen Pilzen hindeutet.

### 4.1 Die Zellendmarker TeaA, TeaC und TeaR weisen eine dynamische Lokalisation an der Hyphenspitze auf

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die grundlegende Lokalisation aller CEMPs mit der in *A. nidulans*, *M. grisea* und *U. maydis* vergleichbar ist (Patkar et al., 2010; Takeshita et al., 2008; Valinluck et al., 2014). In allen untersuchten Pilzen wurde eine Lokalisation an Septen sowie an Hyphenspitzen festgestellt. Auch die Kolokalisation von Vesikeln mit CEMPs scheint in *A. flagrans* konserviert zu sein, was auf einen allgemein konservierten Mechanismus der Vesikelsekretion hindeutet (Takeshita et al., 2008). In *A. nidulans* wurde die Dynamik der

CEMPs bereits untersucht (Ishitsuka et al., 2015). Dabei zeigte sich, dass ihre Lokalisation teils halbmondförmig und teils als konzentrierte Akkumulationen erscheint. Mit dem Auftreten transientser Polarität etabliert sich die Hauptwachstumsstelle jeweils an der Position der CEMP-Akkumulation. Eine ähnliche Dynamik zeigte sich auch in *A. flagrans*, dessen CEMP-Lokalisation zwischen halbmondförmiger und konzentrierter Lokalisation variierte. Während des geradlinigen Hyphenwachstums wurden hingegen keine ausgeprägten lokalen Ausstülpungen an der Hyphenspitze beobachtet, in denen sich CEMPs lokalisieren, wie sie für *A. nidulans* beschrieben sind (Ishitsuka et al., 2015). Eine mögliche Ursache könnte die Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen sein, die mit dem Turgordruck korreliert. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass *A. nidulans* sich auf Mikroskopiepräparaten deutlich schneller ausbreitet als *A. flagrans*. Dieses schnellere Wachstum könnte stärkere Hyphenverformungen ermöglichen, die entsprechend schneller sichtbar werden. Das Hyphoid-Modell beschreibt den Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit, Druck und Hyphenform (Bartnicki-Garcia et al., 1995). Langsam wachsende Pilze besitzen tendenziell breitere Hyphenspitzen, während schnell wachsende Pilze eher spitz zulaufende Hyphen ausbilden. Weitere Studien zur Wachstumsgeschwindigkeit und Hyphenform beider Arten wären erforderlich, um dieses Modell weiter zu validieren. Aufgrund der schwachen Korrelation zwischen CEMP-Akkumulationen und Wachstumsarealen wurde das Modell zusätzlich während der Hyphenfusion überprüft. In diesem Prozess kommt es zu deutlichen Richtungswechseln der Hyphen, die mit einer entsprechenden Umlokalisierung der Zellendmarker einhergehen, was das Modell stützt.

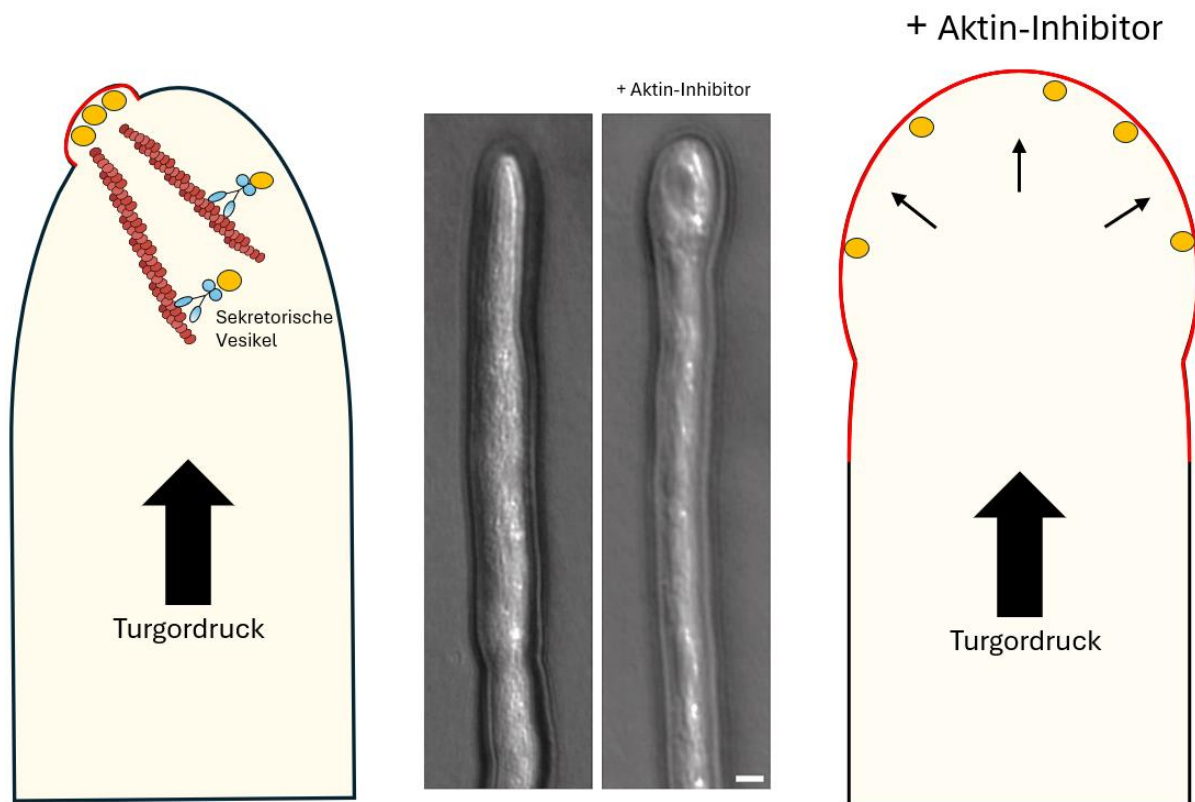
Ähnlich wie in *A. nidulans* blieb die Lokalisation der Akkumulationen dynamisch und zeigte fluktuierende Fluoreszenzsignale. Diese Fluktuationen waren jedoch nicht stabil oszillierend, sondern folgten keinem erkennbaren periodischen Muster. An der Hyphenspitze oszillieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und das Aktinzytoskelett rhythmisch mit definierter Periodizität (Takeshita et al., 2017). Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt zur Depolymerisation des Aktinzytoskeletts und löst Vesikelexozytose aus. Entsprechend zeigen auch verschiedene Proteine, wie Chitinsynthasen-Oszillationen an der Hyphenspitze (Wernet et al., 2023). Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass CEMPs hauptsächlich über Mikrotubuli zur Spitze transportiert werden, während Chitinsynthasen über das Aktinzytoskelett vom Spitzenkörper dorthin gelangen. Die Behandlung mit Cytochalasin hemmte die Spitzenlokalisierung der CEMPs nicht, wohingegen Benomyl diese in *A. nidulans* deutlich beeinträchtigte (Takeshita et al., 2008). Fraglich bleibt, wie die Dynamik der CEMPs zustande kommt. Eine Erklärung für die fluktuative, aber nicht oszillierende Dynamik könnte in der Dynamik der Mikrotubuli liegen.

Während das Aktinzytoskelett durch Rückkopplungsschleifen gesteuert wird, unterliegen Mikrotubuli einer stochastischen Dynamik (dynamische Instabilität), welche kontinuierlich neue Zellendmarker an die Spitze liefern (Takeshita et al., 2017; Vaart et al., 2009). Zusätzlich spielt vermutlich die Dissoziation der Komplexe eine Rolle. Mit der Expansion der Hyphenspitze werden CEMPs nach hinten verdrängt, bis sie am endozytischen Ring vermutlich wieder internalisiert werden. Dieses Zusammenspiel aus Transport auf Mikrotubuli und membranbedingter Verschiebung könnte die beobachtete Dynamik erklären.

CEMPs sind dabei wahrscheinlich nicht die primären Determinanten der Wachstumsrichtung. Zunächst wirken externe chemische Signale, etwa während der Hyphenfusion, oder interne Faktoren wie bei der Fallenbildung. Vermutlich entsteht zunächst ein kleiner Aktin-Patch, der durch Cdc42 initiiert wird. Cdc42 zeigt eine besonders dynamische und instabile Lokalisation und dürfte zu den frühesten Faktoren gehören, die eine neue Polarität etablieren (Khalili et al., 2020). Diese Aktinstrukturen können wiederum Mikrotubuli rekrutieren, durch einen Mikrotubuli-Einfang-Mechanismus, wodurch zusätzliche CEMP-Komplexe gezielt zu der entsprechenden Stelle transportiert werden (Manck et al., 2015). CEMPs fungieren somit als stabilisierende Elemente der Wachstumsrichtung. In *S. pombe* wurde bereits gezeigt, dass CEMPs die Lokalisation von GEFs und GAPs kontrollieren und dadurch indirekt die Aktivität von Cdc42 regulieren, was ihre Rolle als regulatorische Faktoren unterstreicht (Tay et al., 2018). Inwieweit dieser Mechanismus auch auf filamentöse Pilze übertragbar ist, bleibt jedoch ungeklärt. Zukünftige Arbeiten sollten daher gezielt die funktionelle Verbindung zwischen Cdc42 und CEMPs untersuchen. Besonders aufschlussreich wäre die Analyse der GEF- und GAP-Lokalisation in *A. flagrans* im Vergleich zwischen WT und CEMP-Deletionsmutanten. NTF könnten einen geeigneten Modellorganismus darstellen, um die Regulation der Cdc42-Aktivität in filamentösen Pilzen systematisch zu untersuchen.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass an der Hyphenspitze dynamische Prozesse des Zellwandaufbaus stattfinden (Free, 2013). In diesem Bereich ist die Zellwand dünner und, wie mathematische Modelle belegen, auch mechanisch weicher (Chevalier et al., 2023). Eine präzise Verteilung sekretorischer Vesikel ist dabei von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Enzyme lockern die Zellwand gezielt, um deren kontrollierte Umstrukturierung zu ermöglichen. Wird das Aktinzytoskelett inhibiert, ist die Koordination des Vesikeltransports sowie die lokale Zellwandaufweichung gestört. Anstatt die Zellwand an definierten Arealen schrittweise abzubauen und neu zu synthetisieren, kommt es zu einer gleichmäßigen Verteilung der Aufweichungsprozesse entlang der Hyphe. Dies führt zu einer Anschwellung der Hyphenspitze (Brent Heath, 2003) (**Abb. 29**). CEMPs könnten eine entscheidende Rolle

spielen, um die Dynamik der Zellwandelastizität an konzentrierten Arealen zu gewährleisten. Zukünftige Studien sollten die Dynamik der Zellwanddicke und -aufweichung in Korrelation mit der Lokalisation und Deletion der CEMPs systematisch untersuchen.



**Abbildung 29: Modell des Hyphenspitzenwachstums in Korrelation mit Zellwanddicke und Elastizität.** In einer Hyphe werden sekretorische Vesikel entlang des Aktinzytoskeletts zu einem fokussierten Bereich an der Spitze transportiert, wo sie die Zellwand lokal aufweichen und modifizieren (rot = dünne Zellwand mit reduzierter mechanischer Stabilität). Dadurch entsteht ein räumlich klar definiertes Wachstumsareal. Wird das Aktinzytoskelett inhibiert, verteilt sich die enzymatische Aktivität gleichmäßiger entlang der Zellwand. In Kombination mit dem konstant wirkenden Turgordruck führt dies zu einer gleichmäßigen Expansion, wodurch die Hyphenspitze anschwillt.

#### 4.2 Die Deletion der CEMPs führt zu einer veränderten Fallenmorphogenese

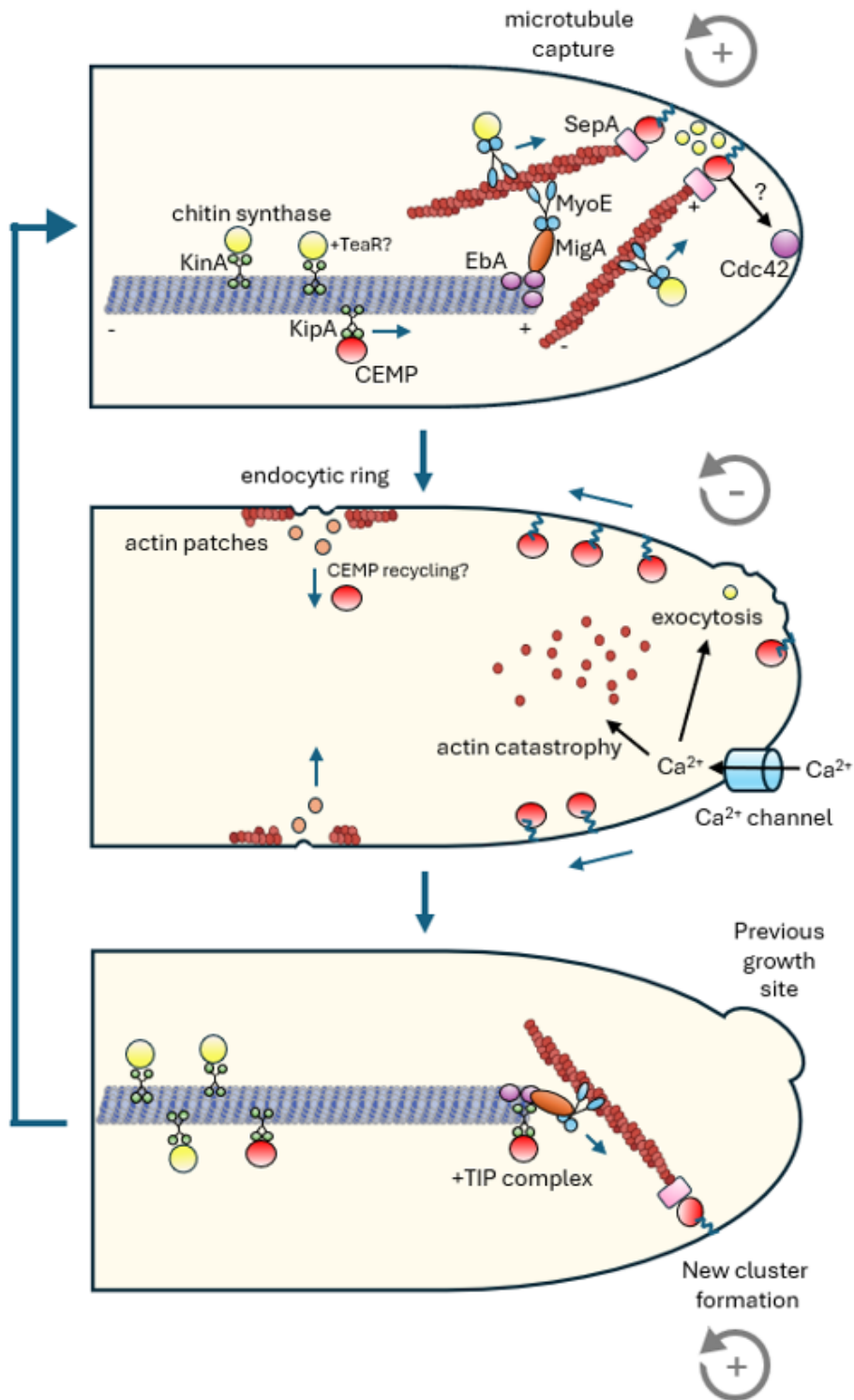
Durch mikroskopische Aufnahmen wurde beobachtet, dass die Deletion von *teaA*, *teaC* und *teaR* zu einer Beeinträchtigung der Fallenmorphologie führt. Während im  $\Delta teaA$ - und  $\Delta teaC$ -Stamm die Fallen nicht mehr in der Lage waren, sich zu krümmen und eine Ringfalle auszubilden, so fiel der Phänotyp im  $\Delta teaR$ -Stamm weniger ausgeprägt aus. Die Fallen waren noch in der Lage, sich zu krümmen, aber die Fallengröße war reduziert. Gleichzeitig zeigte das Myzel des  $\Delta teaR$ -Stamms ein mäandrierendes Wachstum, das in  $\Delta teaA$  und  $\Delta teaC$  unverändert blieb. Die Überexpression von *teaA* erzeugte den auffälligsten Phänotyp. Fallen konnten sich nicht krümmen und wuchsen nur minimal, wodurch kleine, unregelmäßige Fallen entstanden.

Dieses Muster zieht sich konsistent durch Beobachtungen zu Koloniewachstum, Fallenproduktion und Hyphenfusionen: der auffälligste Phänotyp trat bei der *teaA* OE auf, gefolgt von  $\Delta teaA$  und  $\Delta teaC$ , während  $\Delta teaR$  nur einen schwachen bis kaum sichtbaren Effekt zeigte. Dass die Überexpression einen so ausgeprägten Phänotyp hervorruft, deutet darauf hin, dass das System präzise abgestimmt ist und bereits kleine Abweichungen seine Funktionen stören können. Bei *A. nidulans* führt die  $\Delta teaR$ -Deletion zum deutlich stärksten Phänotyp, was dem bisherigen Modell entspricht, in dem TeaR als erstes Protein der Kette die Funktion einleitet (Takeshita et al., 2008). In *A. flagrans* hingegen können TeaA und TeaC offenbar auch ohne TeaR ihre Funktion erfüllen. Wahrscheinlich verläuft die Regulation des Systems in *A. flagrans* anders als in *A. nidulans*. Dies wird auch an der Lokalisation von TeaA im  $\Delta teaR$ -Stamm deutlich. Während in *A. nidulans* die Deletion von *teaR* die Lokalisation von TeaA beeinträchtigte, blieb sie in *A. flagrans* unverändert. Daraus lässt sich schließen, dass TeaR in *A. nidulans* eine größere Bedeutung für die Stabilisierung der Zellendmarker übernimmt als in *A. flagrans*. Auch in *S. pombe* wurde TeaR als sehr dynamisches Protein beschrieben, was die klassische Rezeptor-Ligand-Theorie infrage stellt. (Bicho et al., 2010; Snaith et al., 2005). FRAP-Experimente zeigten, dass TeaA und TeaR unterschiedliche Turnover-Raten besitzen. Die gewonnenen Daten und das zugrunde liegende Modell legen nahe, dass TeaR nicht als Rezeptor wirkt, der den TeaA-Komplex an der Membran verankert, sondern vielmehr eine katalytische Rolle übernimmt, um die Bildung von TeaA-Akkumulationen zu fördern. Dadurch nimmt TeaR in *A. flagrans* eine eher untergeordnete Rolle ein, was zu den Beobachtungen passt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, mit FRAP-Experimenten genauer zu untersuchen, wie sich die TeaA-Akkumulationen in der  $\Delta teaR$ -Mutante verhalten und wie sich TeaR in einer  $\Delta teaA$ -Mutante verhält.

Ein weiterer Aspekt in *A. flagrans* ist, dass das CA<sub>1</sub>A<sub>2</sub>X-Motiv in der TeaR-Sequenz nicht exakt mit CTIM übereinstimmt. Studien zur Farnesylierung haben jedoch gezeigt, dass die A<sub>1</sub>-Stelle tolerant gegenüber Abweichungen des Motivs ist und dass Threonin an dieser Position die Farnesylierung weiterhin ermöglicht (Hougland et al., 2010). Es ist möglich, dass die Farnesylierung in *A. flagrans* weniger effizient abläuft als in anderen Pilzen, wodurch TeaR eine eher untergeordnete Rolle einnimmt. Möglicherweise existiert ein alternatives System oder orthologe Proteine, die die Funktion von TeaR übernehmen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre eine detailliertere Analyse von CAAX-Proteinen notwendig, da eine BLAST-Suche keine ähnlichen Kandidaten in *A. flagrans* identifiziert hat.

Auffällig ist, dass  $\Delta teaA$  und  $\Delta teaC$  sowie die Überexpression von *teaA* kein mäandrierendes Wachstum zeigen wie der  $\Delta teaR$ -Stamm, sondern einen deutlich anderen

Phänotyp. Es scheint, dass der TeaA-TeaC-Komplex vor allem bei schnellen Richtungsänderungen der Hyphen eine zentrale Rolle spielt, wie sie während der Fallenbildung oder der Hyphenfusion auftreten. Während TeaR vor allem für die Stabilisierung und Feinabstimmung des Wachstums zuständig ist, sorgen TeaA und TeaC dafür, dass die Hyphen ihre Richtung aktiv ändern können. Die genauen intrazellulären Mechanismen, die während der Fallenbildung zur Krümmung führen, sind noch unklar, müssen aber in Verbindung mit dem TeaA-TeaC-Komplex wirken, um die Krümmung zu ermöglichen. Interessanterweise weisen  $\Delta teaA$ - und  $\Delta teaC$ -Stämme zudem eine stark reduzierte Fallenzahl auf, was darauf hindeutet, dass zusätzliche intrazelluläre Signalkaskaden mit den CEMPs interagieren und das System komplexer ist als bisher angenommen. In *S. pombe* wurde bereits eine Interaktion zwischen Tea4 und der MAPK Win1, einer Komponente des stressaktivierten Spc1-MAPK-Signalwegs, beschrieben (Tatebe et al., 2005). Zukünftige Untersuchungen sollten aufdecken, welche zusätzlichen Proteine mit TeaC und TeaA in *A. flagrans* zusammenwirken und ob TeaR dabei möglicherweise andere Proteine einbindet. Potenziell könnten dies Interaktionen mit bekannten MAPK-Signalwegen aus der Hyphenfusion, wie SofT und MakB, sein (Haj Hammadeh et al., 2022).



**Abbildung 30: Modell für die Funktionsweise von CEMPs in filamentösen Pilzen.** CEMPs werden über Mikrotubuli zur Hyphenspitze transportiert. Dabei vermittelt das Kinesin KipA den Transport von TeaA, während TeaR vermutlich über sekretorische Vesikel transportiert wird. Ein initiales Signal führt zur Akkumulation kleiner CEMP-Komplexe, die wiederum den Aufbau neuen Aktins stimulieren. Durch einen Mikrotubuli-Einfangmechanismus fördert das neu gebildete Aktin die Bildung weiterer Mikrotubuli, die zusätzliche Zellendmarker an die Spitze transportieren und so eine positive Rückkopplungsschleife erzeugen. Über das Aktin werden anschließend sekretorische Vesikel, die Enzyme für den Zellwandaufbau enthalten, an die Position der Tea-Komplexe geleitet. Eine Verbindung zwischen CEMPs und Cdc42 wurde bereits in *S. pombe* beschrieben, muss jedoch in filamentösen Pilzen noch bestätigt werden. Im mittleren und unteren Panel bewirkt der Ca<sup>2+</sup>-Influx die Auflösung des Aktinzytoskeletts und die Sekretion der Vesikel, was zum Aufbau neuer Zellwand an der betreffenden Stelle führt. Die neu gebildete Membran verursacht anschließend die Auflösung der CEMP-Komplexe, die nach hinten verschoben und am endozytischen Ring wieder internalisiert werden.

### 4.3 Expressions- und Lokalisationsanalysen zeigen eine räumlich-zeitliche Differenzierung der NADPH-Oxidase

Die präzise Steuerung der ROS-Produktion ist entscheidend, um zwischen einer gezielten zellulären Regulation und zellulärem Schaden zu unterscheiden. Beim Menschen gibt es sieben verschiedene NADPH-Oxidase, von denen NOX3 ausschließlich im Innenohr aktiv ist (Herb, 2024). Deren Regulation ist entscheidend für den Gleichgewichtssinn: Zu wenig ROS und der Mechanismus funktioniert nicht. Zu viel ROS und die Otolithen, kleine Kristalle, die für die Wahrnehmung der Schwerkraft notwendig sind, werden beschädigt. Analog zeigt *A. flagrans* eine strikte funktionelle Trennung von NoxA und NoxB, deren Aktivität durch unterschiedliche Mechanismen reguliert wird. Promotorfusionsanalysen von *noxA* und *noxB* zeigten, dass die beiden Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden. Während *noxA* konstitutiv exprimiert wird, tritt die Expression von *noxB* und seinem Interaktionspartner *plsA* ausschließlich während der Fallenbildung auf. Die Ergebnisse der Real-Time qPCR zeigen sogar auf, dass *noxA* während der Fallenbildung herunterreguliert wird. Gleichzeitig bestätigen sie die Beobachtungen aus den Promotorfusionen für *noxB* und *plsA*, dass beide Gene während der Induktion mit Nematoden stärker exprimiert werden. Für *noxR* konnte mit der Promotorfusion eine konstitutive Expression nachgewiesen werden, während die RT-qPCR eine leicht erhöhte Expression zeigte. Die niedrigere Expression von *noxA* bzw. die erhöhte Expression von *noxR* wurden in den Promotorfusionen jedoch nicht erfasst. Generell scheint die Korrelation der Expressionswerte in den Promotorfusionen eher ungenau zu sein. Bei bereits hoher Expression verringert sich die detektierbare dynamische Reichweite, sodass Änderungen der H2B-mCherry-Fluoreszenz vermutlich schwerer erkennbar sind.

Zusammenfassend deuten beide Expressionsanalysen jedoch auf eine funktionelle Aufteilung der Proteine hin. NoxA wird überwiegend im vegetativen Myzel benötigt, während *noxB* nur während der Infektion exprimiert wird. In *M. grisea* zeigt sich ein anderes Muster. Dort wird *noxA* im Appressorium stark hochreguliert, während *noxB* keine veränderte Expression zeigt (Mir et al., 2015). Bei *Claviceps purpurea* wurde hingegen eine erhöhte Expression von sowohl *noxA* als auch *noxB* während der Pflanzeninfektion festgestellt (Giesbert et al., 2008; Schürmann et al., 2013). Diese Beispiele verdeutlichen, dass NADPH-Oxidase in Pilzen unterschiedlich eingesetzt werden und ihre Expressionsprofile artspezifisch variieren.

Die Lokalisation der GFP-fusionierten Proteine bestätigt die Beobachtungen aus den Expressionsdaten. NoxA wurde im vegetativen Myzel an der äußeren Zellmembran nachgewiesen, während es in den Fallen überwiegend in Vakuolen oder im Zytoplasma

lokalisiert war. Dies könnte darauf hinweisen, dass NoxA zu Beginn der Fallenbildung teilweise abgebaut wird, sodass NoxB die ROS-Produktion in den Fallen übernehmen kann. Zusätzlich wurde häufig ein Signal detektiert, das vom ER stammen könnte. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in anderen Arten beschrieben. In *N. crassa* lokalisierte NoxA in Vakuolen, Endosomen, dem ER und an der äußeren Zellmembran (Cano-Domínguez et al., 2019). Auch in *Podospira anserina* fand man NoxA im ER und in Vesikeln. Zudem konnte ein Signal von NoxR an der Spitze sowie von dem membranständigen NoxD an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Daraus entstand ein Modell, in dem NoxA im ER gebildet wird, in Vesikeln mit NoxD interagiert und die endgültige Aktivierung durch NoxR an der Zellmembran erfolgt (Lacaze et al., 2015). In *B. cinerea* zeigte sich ein vergleichbares Muster: NoxA, NoxB und PlsA lokalisierten primär im ER, während die Plasmamembran nur schwach markiert war (Siegmond et al., 2013). Um herauszufinden, ob NoxA eine Funktion im ER hat, wurde eine Komplementation des  $\Delta noxA$ -Stammes mit einem GFP-NoxA-HDEL (ER retention signal) Konstrukt durchgeführt, welches nur im ER lokalisiert (Siegmond et al., 2015). Dieses Konstrukt konnte die Defekte in der Pathogenität ausgleichen, jedoch nicht die CAT-Hyphenfusion oder Sklerotienbildung wiederherstellen. Eine Komplementation ohne HDEL-Motiv hingegen stellte alle Defekte wieder her. Dies deutet darauf hin, dass NoxA sowohl im ER als auch an der Plasmamembran aktiv sein muss, jedoch je nach Lokalisation unterschiedliche Signalwege reguliert. Ähnliche Befunde liegen aus menschlichen Zellen vor, in denen NOX4 im ER lokalisiert ist und dort ROS produziert, was die zelluläre Bedeutung von ER-lokalisiertem ROS unterstreicht (Ambasta et al., 2004). Es ist also möglich, dass das ER auch eine natürlich vorkommende Lokalisation von Nox-Proteinen darstellt.

Für NoxB und PlsA wurde in *A. flagrans* eine GFP-Fluoreszenz ausschließlich in den Fallenzellen nachgewiesen. Beide Proteine lokalisierten in vesikelartigen Strukturen an der Innenseite der Fallen, ähnlich wie es bereits für bestimmte SSPs von *A. flagrans* beschrieben wurde (Emser et al., 2024; Wernet et al., 2021). Es wird vermutet, dass es sich um eine spezielle Form extrazellulärer Vesikel handelt, die ausschließlich in den Fallen gebildet werden. Über ihre genaue Natur und Wirkungsweise ist bislang wenig bekannt. Möglicherweise werden NoxB und PlsA in denselben Vesikeln transportiert wie andere Virulenzfaktoren. Auch in *V. dahliae* wurden PlsA und NoxB in vesikulären Strukturen nachgewiesen, die sich jedoch von denen in *A. flagrans* unterscheiden (Zhao et al., 2016). Eine denkbare Funktion besteht darin, dass NoxB und PlsA gezielt an denselben Ort transportiert werden, an dem auch die Sekretion von Virulenzfaktoren in der Falle erfolgt. In *M. grisea* wurde bereits gezeigt, dass NADPH-Oxidasen für die Ausbildung des Aktin-Septin-Rings während der Penetration von

Pflanzengewebe eine Rolle spielen (Ryder et al., 2013). Dieser Ring dient als Plattform für die Andockung und Sekretion verschiedener Proteine, die für die Penetration notwendig sind. Im Gegensatz dazu zeigte die Lokalisation des Aktin-Septin-Rings im  $\Delta noxB$ -Stamm keine Beeinträchtigung, und die Mutanten waren weiterhin in der Lage, Nematoden zu penetrieren und zu verdauen. Es ist jedoch nur eingeschränkt möglich, das Aktinzytoskelett innerhalb der Fallen zu studieren. Bisherige Experimente konnten keine Akkumulation von Aktin an der Fallenninnenseite bestätigen (Wernet et al., 2022).

Auffällig ist zudem, dass sich die Lokalisation von NoxB nicht zu den Penetrationsstellen verlagert, wie es bei anderen SSPs beobachtet wurde (Emser et al., 2024; Wernet et al., 2021). Dies ist besonders interessant, da es zeigt, dass die Vesikel trotz ähnlicher Morphologie in der leeren Falle sehr präzise an spezifische Positionen gebracht werden. Wie der Pilz die Positionierung der Vesikel so gezielt steuert, sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden. Möglicherweise spielen Vesikel-Tethering-Komplexe wie SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) eine Rolle bei der gezielten Positionierung und Koordination der Vesikelpopulationen (Shoji et al., 2014).

NoxR-GFP war in vegetativen Hyphen hauptsächlich an der Hyphenspitze in halbmondförmiger Verteilung und gelegentlich an den Septen zu beobachten. In Fallen zeigte sich eine verstärkte zytoplasmatische Lokalisation des Proteins, insbesondere in den ersten beiden Kompartimenten, während vereinzelt auch Signale an der Membran detektiert wurden. In *N. crassa* und *B. cinerea* zeigt sich ein vergleichbares Muster. NoxR lokalisiert sowohl an der Hyphenspitze als auch an der Zellmembran, begleitet von häufigen zytoplasmatischen Signalen und vereinzelt Vesikeln (Cano-Domínguez et al., 2008; Siegmund et al., 2013). Man geht davon aus, dass das NoxR-Aktivierungssystem konserviert ist, wobei NoxA ohne NoxR im ER ROS produziert und NoxR die ROS-Produktion gezielt an der äußeren Zellmembran aktiviert (Siegmund et al., 2015). Das Zusammenspiel mit weiteren Aktivatoren wie Cdc24 oder Rac bleibt jedoch unklar. Künftige Experimente sollten daher die Dynamik dieser Aktivatoren in Korrelation mit der ROS-Produktion untersuchen, um die Rolle jeder einzelnen Komponente genauer zu bestimmen.

#### **4.4 Die Oszillation von NoxR an der Hyphenspitze deutet auf eine Oszillation von ROS hin**

Die Koordination von ROS- und  $Ca^{2+}$ -Oszillationen sowie deren funktionelles Zusammenspiel sind in pflanzlichen und tierischen Systemen bereits umfassend beschrieben. In Endothelzellen

steuern ROS-Oszillationen über NADPH-Oxidasen die Adhäsion, Zytoskelett-Dynamik und Genexpression (Dworakowski et al., 2008; Hu et al., 2002).

In Neuronen konnte zudem eine Korrelation zwischen polarem Wachstum und NOX-abhängiger ROS-Produktion nachgewiesen werden (Wilson et al., 2015). Für *A. flagrans* wurden bereits  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen an der Hyphenspitze dokumentiert (Wernet et al., 2023). In Pflanzen regulieren ROS- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen das polare Wachstum über eine Rückkopplungsschleife, die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomänen (EF-Hands) in den ROS-produzierenden Rboh-Proteinen vermittelt wird (Bhattacharjee, 2012). Ein identischer Mechanismus ist in Pilzen aufgrund der strukturellen Unterschiede der Nox-Proteine unwahrscheinlich.

Eine Oszillation des NoxR-Proteins wurde bisher noch nicht in Pilzen beschrieben und deutet auf eine Oszillation der ROS-Produktion wie bei Pflanzen hin. ROS-Färbetechniken in anderen Pilzstudien wiesen oftmals eine vermehrte ROS-Produktion an der Hyphenspitze auf (Kowalewski et al., 2021). Die Visualisierung von ROS in Pilzen zeigte Oszillationen von ROS während des zirkadianen Rhythmus von *N. crassa*, jedoch keine Oszillationen an der Hyphenspitze (Gyöngyösi und Káldi, 2014). Interessanterweise wurde beobachtet, dass die Deletion von *nox*-Genen oftmals zu keiner Verringerung der ROS-Färbung führt, wodurch geschlossen wurde, dass andere Systeme die ROS-Produktion abfangen (Dirschnabel et al., 2014; Segmüller et al., 2008).

Um die Oszillation von ROS nachzuweisen, eignen sich ROS-Färbungen wie NBT, CellROX oder DCFDA (2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat) nicht, da sie entweder membrangängig sind und intrazelluläre ROS anfärben oder nicht sensitiv genug, um eine Oszillation nachzuweisen (Bugeda et al., 2020; Kowalewski et al., 2021; Roze et al., 2015). In Pflanzen wird  $\text{H}_2\text{HFF-BSA}$  verwendet, ein Färbemittel, das dank eines gekoppelten BSA-Proteins die Membran nicht passiert (Monshausen et al., 2007). Versuche mit dieser Methode in Pilzen führten jedoch zu sofortiger, extremer Fluoreszenz, vermutlich aufgrund der hohen Reaktivität des Markers, welcher bereits bei Sauerstoffkontakt oxidiert. Das Experiment sollte unter anderen Parametern und möglichst sauerstofffreien Bedingungen wiederholt werden.

Eine besonders vielversprechende Alternative sind genetische Sensoren wie HyPer oder roGFP, die in den Pilz transformiert werden können (Oparka et al., 2016; Pouvreau, 2014). Diese Proteine werden ständig optimiert, wodurch eine angepasste Form möglicherweise eingesetzt werden kann.

#### 4.5 Die Deletion von *noxA* und *noxB* führt zu unterschiedlichen Phänotypen

Nachdem eine räumlich-zeitliche Trennung der Expression der *nox*-Gene festgestellt wurde, zeigte sich auch eine funktionelle Differenzierung. Während die Deletion von *noxA* die Hyphenfusion beeinträchtigt, führt die Deletion von *noxB* zu einer eingeschränkten Virulenz. In verschiedenen Spezies wurde ein ähnlicher Phänotyp beschrieben. Oftmals geht es um eine Beeinträchtigung der Hyphenfusion, Virulenz, Symbiose und Bildung von Sporen (Cano-Domínguez et al., 2019; Giesbert et al., 2008; Siegmund et al., 2013). Interessanterweise wurde *noxA* auch in *A. oligospora*, einem nah verwandten NTF, deletiert, was zu einer verminderten Fallenproduktion führte (Li et al., 2017). Das erscheint plausibel, da Fallen eine neu differenzierte Zellstruktur darstellen und ROS häufig eine Rolle bei Differenzierungsprozessen spielt. Beim  $\Delta$ *noxA*-Stamm von *A. flagrans* konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen in der Fallenbildung festgestellt werden. Bereits bei mehreren Proteinen, welche mit MAPK-Signalwegen assoziieren, wurde festgestellt, dass bei einer Deletion unterschiedliche Phänotypen auftreten. In *A. flagrans* führt die Deletion von MakB zu einer Beeinträchtigung der Hyphenfusion, während in *A. oligospora* dieselbe Deletion zu einer Reduktion der Fallenproduktion führt (Haj Hammadeh et al., 2022; Xie et al., 2023). Dies deutet darauf hin, dass Nox-Proteine möglicherweise auf MAPK-Signalwege einwirken, deren Bedeutung zwischen den Arten unterschiedlich ist und somit unterschiedliche Phänotypen entstehen. In *Sordaria macrospora* wurde bereits eine Interaktion zwischen HAM-5 und NOR-1 (NoxR) beschrieben, die eine Verbindung zwischen dem Pheromon-Response-Signalweg (MakB) und den Nox-Komplexen herstellt (Schmidt et al., 2020). Auch für Bem1, welches Teil des Nox-Komplexes ist, wird eine Verbindung zum MAK-2-Signalweg vermutet, da im  $\Delta$ *bem1*-Stamm von *N. crassa* eine reduzierte MAK-2-Aktivität festgestellt wurde (Schürg et al., 2012; Serrano et al., 2018). In *Coniothyrium minitans* konnte sogar eine direkte Interaktion zwischen NoxA und Slt2 (Mak-1) nachgewiesen werden (Wei et al., 2016). Wie genau diese Systeme zusammenspielen und welche Rolle ROS dabei spielt, bleibt jedoch noch unklar.

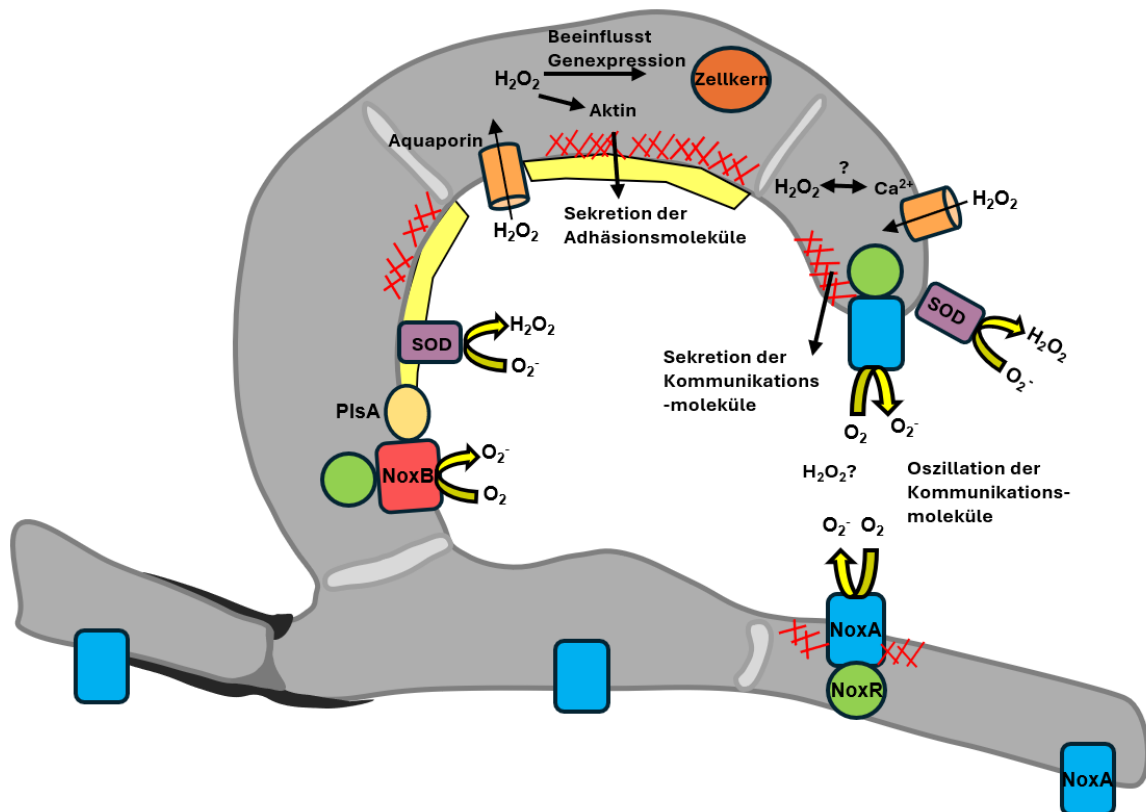
Es ist bereits bekannt, dass ROS Cysteinreste oxidieren können und dadurch die Struktur und Funktion von Proteinen beeinflussen. Dabei werden spezifische Proteine, etwa Peroxiredoxine, über einen chemischen Prozess, der als „*redox-relay*“ bezeichnet wird, aktiviert (Stöcker et al., 2018). Diese Proteine übertragen ihre Disulfidbrücken über mehrere Zwischenschritte auf andere Zielproteine, wie den Transkriptionsfaktor Yap1, die MAPK HogA oder zentrale Enzyme der Glykolyse (Asano et al., 2007; MacDiarmid et al., 2025; Veal et al., 2004). Oxidativer Stress beeinflusst zahlreiche zelluläre Signalwege. Daher stellt sich die Frage, ob ROS als Informationsmoleküle bei der Hyphenfusion fungieren können. Mehrere

Studien zeigen, dass ROS als allgemeine Signalmoleküle wirken können. In Pflanzen wird ein Stresssignal beispielsweise als ROS-Welle durch den gesamten Organismus geleitet und in Fischen wurde nachgewiesen, dass ROS die gerichtete Migration von Leukozyten zum Ort der Schädigung steuern (Miller et al., 2010; Niethammer et al., 2009). Auch beim chemotropischen Wachstum von *Fusarium oxysporum* wurden ROS als zentrale Signalmoleküle identifiziert, die über eine Ste2-vermittelte Signaltransduktion das Wachstum zur Pflanze hinsteuern (Nordzieke et al., 2019). Dies spricht dafür, dass ROS als unspezifische Signalmoleküle aktiv sein können, insbesondere im Zusammenhang mit der möglichen Aktivierung von MAPK-Signalwegen. Andererseits wird diskutiert, dass ROS aufgrund ihrer hohen Reaktivität und geringen Spezifität nur eingeschränkt als klassische Signalmoleküle geeignet sind (Fischer und Glass, 2019). Für zukünftige Untersuchungen sollte die Korrelation zwischen NoxA und den Signalwegen der Hyphenfusion detaillierter untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf Unterschiede zwischen *A. oligospora* und *A. flagrans*.

Der Phänotyp des  $\Delta noxB$ -Stammes in *A. flagrans* unterscheidet sich deutlich von den in anderen Pilzen beschriebenen Beobachtungen. Während NoxB dort häufig eine generelle Rolle bei der Sporendifferenzierung und Pathogenität spielt, scheint seine Funktion in *A. flagrans* auf die Fallen beschränkt zu sein. Interessanterweise weisen die Deletionsstämme  $\Delta noxB$ ,  $\Delta noxR$  und  $\Delta plsA$  in diesem System einen vergleichbaren Phänotyp auf. Auch in anderen Pilzen wurde berichtet, dass  $\Delta noxB$ - und  $\Delta plsA$ -Deletionen ähnliche phänotypische Veränderungen zeigen, was darauf hindeutet, dass PlsA für die Funktion von NoxB erforderlich sein könnte (Green et al., 2019; Siegmund et al., 2013). In *V. dahliae* wurde zudem eine Interaktion zwischen PlsA und NoxB nachgewiesen (Zhao et al., 2016). Die genaue Rolle von PlsA ist jedoch bislang nicht vollständig geklärt. In anderen Spezies zeigt  $\Delta noxR$  häufig einen kombinierten Phänotyp, der den Mutanten  $\Delta noxA$  und  $\Delta noxB$  ähnelt, was mit seiner Funktion als Aktivator beider Proteine übereinstimmt (Cano-Domínguez et al., 2008; Siegmund et al., 2013; Takemoto et al., 2006). Warum die Stämme  $\Delta noxB$ ,  $\Delta noxR$  und  $\Delta plsA$  weniger Nematoden fangen, konnte im Zuge dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Beobachtungen legen nahe, dass Nematoden zwar aktiv in die Fallen gelangen, dort aber entkommen können, was auf eine Beeinträchtigung der adhäsiven Schicht hindeutet. Eine geringere Attraktivität der Fallen für die Nematoden ist theoretisch auch möglich, da die Nematoden aber oftmals zu den Fallen gefunden haben, ist dies eher unwahrscheinlich. Da oxidativer Stress mit der Synthese von Sekundärmetaboliten verknüpft ist, sollte dennoch zukünftig untersucht werden, ob diese Faktoren die Attraktivität der Fallen beeinflussen, zum Beispiel mithilfe eines Chemotaxis-Assays für Nematoden (Montibus et al., 2015).

Auch bei anderen Pilzen führt die Deletion von *noxB* zu einer verringerten Virulenz, jedoch im Zusammenhang mit der Ausbildung des Appressoriums oder der Kontrolle des Aktin-Septinrings (Ryder et al., 2013; Siegmund et al., 2013). In *V. dahliae* wurde gezeigt, dass die ROS-Konzentration mit  $\text{Ca}^{2+}$  korreliert und dass bei *noxB*-Deletionen die Regulation  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Transkriptionsfaktoren wie Crz1, die für die Virulenz wichtig sind, gestört ist, was zur Beeinträchtigung der Virulenz führt (Zhao et al., 2016). Eine Analyse der RNA-Seq-Daten in *A. flagrans* zeigte jedoch keine signifikante Deregulation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Genen, wie es in *V. dahliae* der Fall ist. In *A. oligospora* korrelieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege mit der Fallenbildung (Zhang et al., 2019; Zhen et al., 2019). Ein Experiment mit *Arthrobotrys ellipsospora*, bei dem  $\text{Ca}^{2+}$  durch EGTA gebunden wurde, führte zum Verlust der Fähigkeit, Nematoden zu fangen (Mori et al., 2000). PAS-Färbungen (Periodic-acid/Schiff) zeigten dabei eine Beeinträchtigung der adhäsiven Schicht. In *A. flagrans* wurde festgestellt, dass der Einsatz von EGTA zum Verlust der Hyphenfusion führt, jedoch wurde die Effizienz der Fallen nicht evaluiert (Wernet et al., 2023). Daher ist es gut möglich, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege zusammen mit ROS-Signalwegen, die Virulenz in *A. flagrans* steuern. Die Wechselwirkungen zwischen ROS und  $\text{Ca}^{2+}$  sind in anderen Organismen gut beschrieben, während in Pilzen weitere Untersuchungen erforderlich sind, um ein umfassenderes Gesamtbild zu erhalten.  $\text{Ca}^{2+}$  wurde als Molekül beschrieben, das wie ROS das Aktinzytoskelett beeinflusst (Ryder et al., 2013; Takeshita et al., 2017). Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom an der Hyphenspitze werden die Enzyme, die zum Aufbau der Zellwand notwendig sind, sekretiert. Eine weitere Erklärung könnte daher sein, dass die Sekretion in den Fallen gestört ist, wodurch keine funktionale adhäsive Schicht gebildet wird. Es ist gut möglich, dass diese Prozesse an der Hyphenspitze und in der Falle sehr ähnlich ablaufen, was die verminderte Virulenz im  $\Delta\text{noxB}$ -Stamm und die beeinträchtigte Hyphenfusion im  $\Delta\text{noxA}$ -Stamm erklären könnte. In den Fallen ist Exozytose notwendig für die Sekretion der adhäsiven Schicht, während in  $\Delta\text{noxA}$  die Sekretion des Informationsmoleküls für die Hyphenfusion gestört ist.

Für zukünftige Experimente in *A. flagrans* sollte die Korrelation zwischen  $\text{Ca}^{2+}$  und ROS weiter untersucht werden. Außerdem sind detaillierte Analysen der adhäsiven Schicht nötig, um die beteiligten Proteine zu identifizieren und zu verstehen, wie  $\text{Ca}^{2+}$  und ROS den Aufbau der Adhäsion steuern könnten.



**Abbildung 31: Modell der funktionellen Trennung der Nox-Proteine in *A. flagrans*.** NoxA lokalisiert in den vegetativen Hyphen an der äußeren Zellmembran und wird an der Hyphenspitze durch NoxR aktiviert, um ROS zu produzieren. Die ROS-Produktion könnte bei der Sekretion des Kommunikationsmoleküls während der Hyphenfusion durch Beeinflussung des Zytoskeletts beteiligt sein. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> könnte dabei als unspezifisches Kommunikationssignal zwischen fusionierenden Hyphen wirken. Ca<sup>2+</sup>- und ROS-Signalwege könnten zusammenarbeiten, um die Hyphenfusion zu steuern. NoxB und PlsA hingegen lokalisieren an der äußeren Zellmembran in Fallen und werden ebenfalls durch NoxR aktiviert. Sie könnten die Genexpression modulieren, um die vollständige Differenzierung der Falle zu gewährleisten und das Aktinzytoskelett beeinflussen, um die adhäsive Matrix zu sekretieren.

#### 4.6 Korrelationen zwischen Zellendmarkern und NADPH-Oxidasen an der Hyphenspitze

An der Hyphenspitze findet ein komplexes Zusammenspiel von Zytoskelettstrukturen, Vesikeldynamik und Signalwegen statt, das zudem artspezifisch variieren kann. Die mechanistische Aufklärung dieses Netzwerks stellt weiterhin eine zentrale Herausforderung dar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl NoxA und NoxR als auch die CEMP-Proteine an Prozessen an der Hyphenspitze beteiligt sind. Beide Proteingruppen spielen eine Rolle bei der Hyphenfusion, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung. Die Deletion von *noxA* und *noxR* führte zu einer vollständigen Beeinträchtigung der Hyphenfusion, während das polare Wachstum unverändert blieb. Bei Deletion der Zellendmarker waren Fusionen über kurze Distanzen weiterhin möglich. Dies deutet darauf hin, dass grundlegende intrazelluläre

Signalmechanismen erhalten bleiben. Unklar ist jedoch, ob Fusionen über kurze und lange Distanzen durch identische Signalwege reguliert werden oder ob primär die Fähigkeit zum gerichteten Wachstumswechsel zur Partnerhyphie eingeschränkt ist.

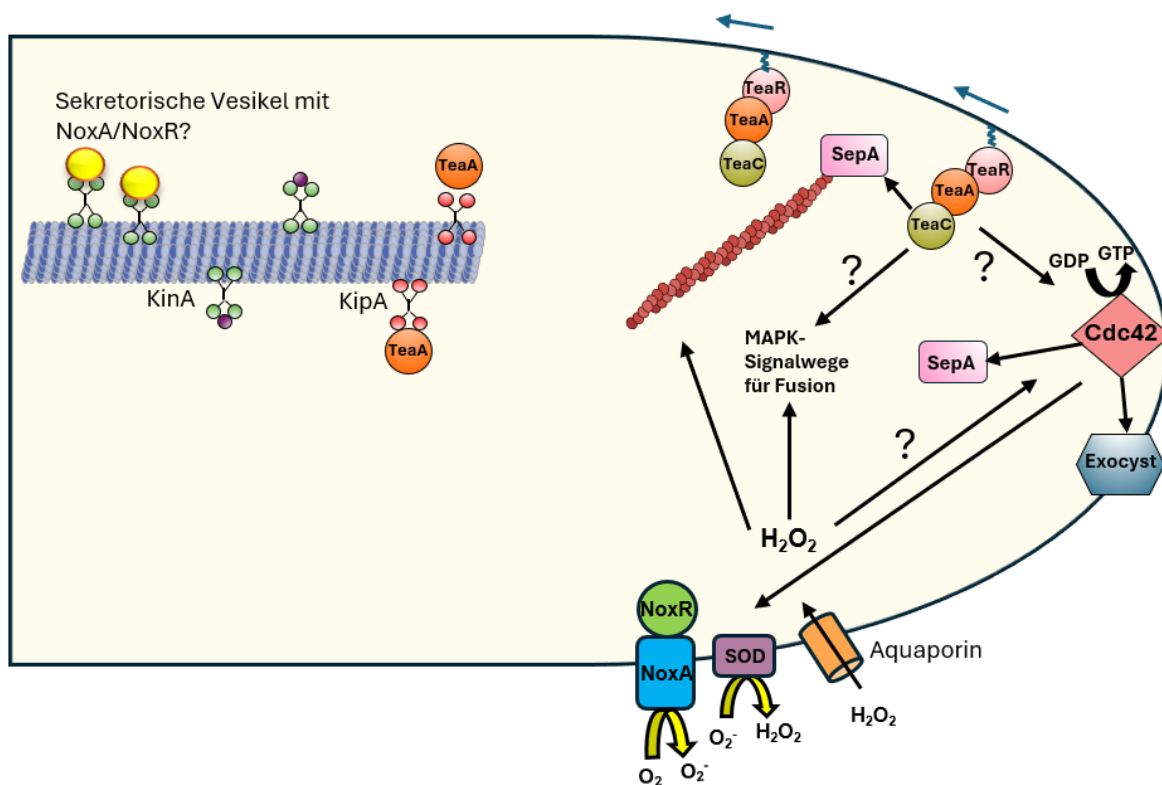
Für beide Proteingruppen wurden Verbindungen zu MAPK-Signalwegen beschrieben. Insbesondere für Nox-Proteine existieren in filamentösen Pilzen zahlreiche Hinweise auf eine funktionelle Kopplung an MAPK-Kaskaden (Schmidt et al., 2020; Schürg et al., 2012; Wei et al., 2016). Dennoch ist das genaue mechanistische Zusammenspiel dieser Komponenten nicht vollständig verstanden. Für Zellendmarker beschränken sich entsprechende Untersuchungen bislang weitgehend auf *S. pombe*, wo eine Beteiligung am stressinduzierten Hog-MAPK-Signalweg beschrieben wurde (Tatebe et al., 2005). Das lässt darauf schließen, dass das System komplex ist und möglicherweise andere MAPK-Signalwege ebenfalls involviert sind. Für beide Proteingruppen sind zusätzliche Untersuchungen erforderlich, um ihren spezifischen Einfluss auf Signaltransduktionsprozesse präzise einzuordnen.

Ein gemeinsamer Nenner ist zudem, dass CEMPs und Nox-Proteine beide das Zytoskelett modulieren. Für CEMPs erfolgt dies über die Rekrutierung von Forminen sowie möglicherweise über eine funktionelle Kopplung an Cdc42, wie sie in *S. pombe* beschrieben wurde. Für ROS wurde gezeigt, dass sie Cysteinreste im Aktin durch Glutathionylierung modifizieren und dadurch dessen Dynamik beeinflussen (Farah und Amberg, 2007). In vielen Organismen existieren Glutaredoxin-Systeme, die Aktin durch Deglutathionylierung wieder in den reduzierten Zustand überführen (Pujol-Carrion und De La Torre-Ruiz, 2010). Dieses reversible redoxabhängige Wechselspiel moduliert das Aktinzytoskelett und damit verbundene Prozesse. Es ist denkbar, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom an der Hyphenspitze die ROS-Produktion stimuliert und diese wiederum direkt auf das Aktinzytoskelett einwirkt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Bedeutung von ROS für das polare Wachstum artspezifisch unterschiedlich sein kann. In *A. nidulans* führte die Deletion von *noxA* zum Verlust der apikalen Dominanz und zu *hyperbranching* (Semighini und Harris, 2008). In *A. flagrans* wurde ein entsprechender Phänotyp nicht beobachtet, was auf eine artspezifische Regulation der Polarität hinweist.

Darüber hinaus ist eine Wechselwirkung zwischen ROS und Rho-GTPasen denkbar. In mehreren Spezies wurde gezeigt, dass Cdc42 vermutlich über Bem1 die ROS-Produktion beeinflusst und dass auch RacA sowie Cdc24 involviert sind (Takemoto et al., 2011; Tanaka et al., 2008). Deletionsstämme von Cdc42 weisen eine verminderte ROS-Produktion auf, was auf ein funktionelles Zusammenspiel schließen lässt (Kowalewski et al., 2021). In Säugetierzellen wurde zudem beschrieben, dass ROS ihrerseits Rho-GTPasen modulieren können (Aghajanian

et al., 2009). Ein entsprechender direkter Einfluss von ROS auf Rho-GTPasen in Pilzen wurde bislang nicht nachgewiesen, erscheint jedoch mechanistisch plausibel, da die Proteine eine hohe Konservierung aufweisen (Bischof et al., 2024).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ROS-abhängige Signalprozesse und Zytoskelett-assoziierte Zellendmarker gemeinsam an der funktionellen Regulation der Hyphenspitze beteiligt sind. Ein besseres Verständnis dieser Wechselwirkungen wird dazu beitragen, die molekularen Mechanismen der Hyphenfusion und der polaren Wachstumssteuerung in filamentösen Pilzen vollständig zu erfassen.



**Abbildung 32: Schematische Darstellung eines möglichen Zusammenspiels von CEMP- und Nox-Funktionsweisen.** Für CEMPs wurde gezeigt, dass TeaA über KipA entlang der Mikrotubuli zur Hyphenspitze transportiert wird. Unklar ist, wie Nox-Proteine transportiert werden. An der Spitze bilden CEMPs Komplexe und rekrutieren Formine (SepA), die dort die Polymerisation von Aktinfilamenten initiieren. In *S. pombe* wurden Zusammenhänge zwischen Zellendmarkern, Cdc42 und MAPK-Signalwegen beschrieben. Es ist denkbar, dass CEMPs in filamentösen Pilzen ähnliche regulatorische Funktionen übernehmen, auch wenn dies bislang nicht experimentell belegt ist. Der Nox-Komplex ist in der Plasmamembran lokalisiert und produziert ROS, die durch Superoxiddismutasen (SOD) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgewandelt werden. Dieses kann über Aquaporine ins Zellinnere diffundieren. ROS nimmt dort Einfluss auf MAPK-Signalwege und das Aktinzytoskelett. Eine Regulation von Rho-GTPasen wäre ebenfalls denkbar. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der ROS-vermittelten Regulation sind jedoch bislang nicht vollständig geklärt.

## 4.7 Fazit

In dieser Arbeit wurden Zellendmarkerproteine und NADPH-Oxidasen im Nematodenfangenden Pilz *A. flagrans* charakterisiert. Die Dynamik der Zellendmarker zeigt sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede zu den Daten aus *A. nidulans*. Deletionsstämme deuten auf eine Beteiligung der Marker am polaren Wachstum während der Fallenbildung hin, wobei TeaA und TeaC eine deutlich größere Rolle spielen als TeaR. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass *A. flagrans* die Zellendmarker für eine koordinierte Fallenmorphogenese benötigt und das System im Laufe der Evolution spezifisch an seine Lebensweise angepasst hat.

Bei den NADPH-Oxidasen zeigt sich ein ähnliches Muster: NoxA und NoxB übernehmen getrennte Funktionen, die bisher in keinem anderen Pilz beschrieben wurden. NoxB wird ausschließlich in den Fallen exprimiert und ist für die Adhäsion der Nematoden verantwortlich, während NoxA im gesamten vegetativen Myzel wirkt und die Hyphenfusion unterstützt. Diese funktionale Aufteilung spiegelt eine gezielte Umfunktionalisierung der Proteine wider, die an die Lebensweise von *A. flagrans* angepasst ist.

Trotz dieser Erkenntnisse bleiben viele Fragen offen, insbesondere wie ROS-vermittelte Signalwege die unterschiedlichen Phänotypen steuern und miteinander verknüpft sind. Zukünftige Arbeiten sollten diese Zusammenhänge weiter aufklären, um ein vollständigeres Bild der molekularen Mechanismen hinter der Fallenmorphogenese zu erhalten.

## 5. Material & Methoden

### 5.1 Chemikalien und Geräte

Restriktionsenzyme, Polymerasen sowie dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) wurden von New England Biolabs (NEB, Frankfurt) erworben. Die Chemikalien und Geräte stammten von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Biozym (Hessisch Oldendorf), Nippon Genetics (Düren), Zymo Research (Freiburg), und Bio-Rad (München).

**Tabelle 2: Verwendete Geräte**

<b>Laborgerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Zentrifugen	Eppendorf 5415R AccuSpin Micro 17 Universal 320 R MicroStar 21	Eppendorf, Hamburg Fisher Scientific, Schwerte Hettich, Tuttlingen VWR, Darmstadt
Mikroskope	Axio Imager Z1 LSM 900 Axio Zoom.V16	Carl Zeiss Microscopy, Jena Carl Zeiss Microscopy, Jena Carl Zeiss Microscopy, Jena
Inkubatoren	Innova 44  Heraeus 6000	New Brunswick Scientific, Hamburg  Heraeus Instruments, Hanau
Photospektrometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Gelelektrophoresekammer	Mupid-exU	Advance, Tokio
Gel Doc	FAS-V	Nippon Genetics Europe, Düren
Autoklav	3870ELV	Tuttnauer, Breda
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York
Gefrierschrank (-80 °C)	Innova U101	New Brunswick Scientific, Hamburg
Hybridisierungsöfen	HB-1000 Hybridizer	UVP, Cambridge
PCR-Cycler	Labcycler	SensoQuest, Göttingen

Sicherheitswerkbank	Maxisafe 2020	Thermo Fisher Scientific, Langensfeld
---------------------	---------------	--

## 5.2 Kultivierung von Organismen

### Kultivierung von *A. flagrans*

Die Kultivierung von *A. flagrans* erfolgte auf festem Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA, *potato dextrose agar*) oder in flüssigem Kartoffel-Dextrose-Medium (*potato dextrose broth*, PDB) bei 28 °C. Flüssigkulturen wurden in einem Erlenmeyerkolben bei 180 rpm inkubiert. Zur Selektion von Transformanten wurde nach dem Autoklavieren das Festmedium mit dem Antibiotikum Hygromycin B (100 µg/ml) oder Geneticin-Sulfat (G418) (150 µg/ml) versetzt.

**Tabelle 3: Medien zur Kultivierung von *A. flagrans***

Medium	Zusammensetzung
Kartoffel-Dextrose-Medium	24 g Kartoffel-Dextrose-Bouillon pH-Wert 6,6 für Festmedium 1,5 % Agar
Top-Agar (PDASS)	24 g Kartoffel-Dextrose-Bouillon 205 g Saccharose 0,3 g Pepton 0,3 g Hefeextrakt pH-Wert 6,6 1,5 % Agar
<i>Low nutrient medium</i> (LNM)	1,66 mM MgSO <sub>4</sub> 5,4 µM ZnSO <sub>4</sub> 2,6 µM MnSO <sub>4</sub> 18,5 µM FeCl <sub>3</sub> 13,4 mM KCl 0,34 µM Biotin 0,75 µM Thiamin pH-Wert 5,5 1 % Agar

**Tabelle 4: Verwendete *A. flagrans* Stämme**

<b>Name</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
CBS 349.94	Wildtyp	CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht Niederlande
sVW10	<i>h2b(p)::h2b::GFP;</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Valentin Wernet, KIT
sMK50	<i>teaC(p)::teaC::GFP;</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK51	<i>teaR(p)::GFP::teaR;</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK52	<i>teaA::hph (<math>\Delta teaA</math>);</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sJW01	<i>teaC::hph (<math>\Delta teaC</math>);</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Jan Wäckerle, KIT
sMK53	<i>teaR::hph (<math>\Delta teaR</math>);</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK54	<i><math>\Delta teaA</math>; trpC(p)::hph::trpC(t);</i> <i>nipA(p)::nipA::mCherry;</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK55	<i><math>\Delta teaC</math>; trpC(p)::hph::trpC(t)</i> <i>nipA(p)::nipA::mCherry;</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK56	<i><math>\Delta teaR</math>; trpC(p)::hph::trpC(t);</i> <i>nipA(p)::nipA::mCherry;</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK57	<i><math>\Delta teaA</math>; trpC(p)::hph::trpC(t);</i> <i>teaA(p)::teaA::teaA(t);</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK58	<i><math>\Delta teaC</math>; trpC(p)::hph::trpC(t);</i> <i>teaC(p)::teaC::teaC(t);</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit

sMK59	<i>ΔteaR; trpC(p)::hph::trpC(t); teaR(p)::teaR::teaR(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK60	<i>ΔteaR; trpC(p)::hph::trpC(t); teaA(p)::teaA::GFP; gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK61	<i>teaA(p)::teaA::GFP; trpC(p)::hph::trpC(t); tubA(p)::mCherry::chsB::apsB(T); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK62	<i>oliC(p)::teaA::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK63	<i>noxA::hph (ΔnoxA); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK64	<i>noxB::hph (ΔnoxB); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK65	<i>noxR::hph (ΔnoxR); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK66	<i>plsA::hph (ΔplsA); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK67	<i>ΔnoxR; noxR(p)::noxR::noxR(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK68	<i>ΔnoxA; noxA(p)::noxA::gfp::gluC(t) gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK69	<i>ΔnoxB; noxB(p)::gfp::noxB::gluC(t) gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK70	<i>ΔnoxB; noxB(p)::noxB::gfp::gluC(t) gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK71	<i>ΔplsA; plsA(p)::plsA::gfp::gluC(t) gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK72	<i>h2b(p)::h2b::mCherry::tub(t) noxA(p)::h2b::mCherry::tub(t) trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit

	<i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	
sMK73	<i>h2b(p)::h2b::mCherry::tub(t)</i> <i>noxB(p)::h2b::mCherry::tub(t)</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK75	<i>h2b(p)::h2b::mCherry::tub(t)</i> <i>noxR(p)::h2b::mCherry::tub(t)</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK76	<i>h2b(p)::h2b::mCherry::tub(t)</i> <i>plsA(p)::h2b::mCherry::tub(t)</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK77	<i>noxR(p)::noxR::gfp::gluC(t)</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK78	<i>noxR(p)::noxR::gfp::gluC(t)</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i> <i>h2b(p)::R-GECO::gluC(t)</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK79	<i>noxA(p)::gfp::noxA::gluC(t)</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK80	<i>cdc10(p)::cdc10::mCherry::gluC(t);</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK81	$\Delta$ <i>noxB</i> ; <i>cdc10(p)::cdc10::mCherry::gluC(t);</i> <i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK82	<i>tubA(p)::noxA::gluC(t);</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK83	<i>tubA(p)::noxB::gluC(t);</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sMK84	<i>tubA(p)::noxR::gluC(t);</i> <i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit

## Kultivierung von *A. nidulans*

Die Kultivierung von *A. nidulans* erfolgte auf Minimal-Medium (MM) bei 37 °C.

**Tabelle 5: Verwendete *A. nidulans* Stämme**

Stamm	Genotyp	Herkunft
sKV103	<i>pyrG89; pyroA4; veA+</i>	Blumenstein et al., 2005
sYH21	<i>ΔteaC; pyroA4; veA+</i>	Higashitsuji et al., 2009
sNT30	<i>ΔteaA; pyrG89; veA+</i>	Takeshita et al., 2008
sNT34	<i>ΔteaR; argB; veA+</i>	Takeshita et al., 2008

**Tabelle 6: Verwendete *A. nidulans* Medien**

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Salz-Stammlösung	120 g NaNO <sub>3</sub> 10,4 g KCl 10,4 g MgSO <sub>4</sub> 30,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Spurenelementlösung	22 g ZnSO <sub>4</sub> 11 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 5 g MnCl <sub>2</sub> 5 g FeSO <sub>4</sub> 1,6 g CoCl <sub>2</sub> 1,6 g CuSO <sub>4</sub> 1,1 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 50 g EDTA-Na <sub>2</sub> pH 6,5
Minimal-Medium (MM)	5 % (v/v) Salzlösung 0,1 % (v/v) Spurenelementlösung 20 g Glukose pH 6,5 15 g Agar

## Kultivierung von *C. elegans*

Die Kultivierung von *C. elegans* erfolgte auf *nematode-growth medium* (NGM) bei 20 °C. Als Nahrung wurden *Escherichia coli* OP50 Bakterien auf die NGM-Platten gegeben. Die Subkultivierung erfolgte durch Ausschneiden eines 0,5 cm Agarblocks einer NGM-Platte mit Nematoden auf eine frische mit NGM befüllte Petrischale.

## Synchronisation von *C. elegans*

Für die Synchronisation von *C. elegans* wurde die Kultur einer Petrischale in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgten Waschschrte, bei denen das Gefäß auf 15 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt und anschließend bei 1200 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgenommen und die Waschschrte wurden 2-3-mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrte wurde das Nematodenpellet in 1,25 ml Wasser resuspendiert und es wurden 250 µl 5 M NaOH und 500 µl Natriumhypochloritlösung (5 %) dazu pipettiert. Anschließend wurden die Nematoden 5 Minuten bei mittlerer Intensität gevortext. Nach dem Vortexen wurde das Reaktionsgefäß auf 15 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt und es folgten 3 Waschschrte. Nach dem letzten Waschschrte wurde die übrig gebliebenen Nematodeneier in 1 ml Wasser und 2 ml M9-Puffer resuspendiert und in eine kleine Petrischale (6 cm Durchmesser) überführt. Die Nematodeneier wurden für einen Tag bei 20 °C inkubiert und die L1-Larven wurden dann auf NGM-Platten mit OP50 überführt.

**Tabelle 7: Verwendete *C. elegans* Stämme**

Stamm	Genotyp	Herkunft
N2	/	Institut für Biologie III, Bioinformatik und Molekulargenetik, Freiburg

**Tabelle 8: Medien für die Kultivierung von *C. elegans***

Medium	Zusammensetzung pro Liter
NGM	3 g NaCl 2,5 g Pepton 1 ml Cholesterol (5 mg/ml Stammlösung in Ethanol) 20 g Agar Nach dem Autoklavieren steril dazugegeben: 1 ml CaCl <sub>2</sub> (1 M) 1 ml MgSO <sub>4</sub> (1 M) 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (1 M)
M9-Puffer	3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 g NaCl 1 ml MgSO <sub>4</sub> (1 M)

### **Kultivierung von *Escherichia coli***

*E. coli* Bakterien wurden auf Festmedium oder in Flüssigkultur mit Luria-Bertani-Medium (LB) bei 37 °C kultiviert. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte bei 180 rpm. Bei Bedarf wurde dem Medium zur Selektion 100 µg/ml Ampicillin hinzugegeben.

**Tabelle 9: Verwendete Medien zur Kultivierung von *E. coli***

Medium	Zusammensetzung pro Liter
LB	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,0

**Tabelle 10: Verwendete *E. coli* Stämme**

Stamm	Genotyp	Herkunft
TOP10	<i>F- mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galE15 galK16</i> <i>rpsL(StrR) endA1</i> $\lambda$ -	Invitrogen, Karlsruhe
OP50	<i>ura-</i>	Institut für Biologie III, Bioinformatik und Molekulargenetik, Freiburg

### **Induktion der Fallen und Bestimmung der Fallengröße, Fallenzahl und Hyphenfusion**

Zur Induktion der Fallen wurden Sporen auf ein LNA-Gelkissen aufgetragen. Das Gelkissen wurde hergestellt, indem ein Objektträger zwischen zwei mit Klebeband umwickelten Objektträgern positioniert wurde. Anschließend wurden zwei weitere Objektträger quer auf die umwickelten Objektträger gelegt, sodass zwischen dem mittleren Objektträger und den darüberliegenden ein schmaler Zwischenraum entstand. In diesen Zwischenraum wurde flüssiges LNA pipettiert, das schnell erstarrte. Nach der Aushärtung wurden die seitlichen sowie die oberen Objektträger entfernt. Auf das entstandene LNA-Gelkissen wurden anschließend Sporen von *A. flagrans* aufgetragen. Für eine weniger präzise Methode wurden Sporen mit einem Zahnstocher direkt von einer Platte übertragen. Für eine genauere Vorgehensweise wurde eine Sporensuspension hergestellt, die Sporen ausgezählt und die gewünschte Konzentration auf das Gelkissen pipettiert. Zur Induktion der Fallen wurden Nematoden von NGM-Platten mit sterilem dH<sub>2</sub>O abgewaschen, in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und mit sterilem dH<sub>2</sub>O gewaschen. Bei Bedarf wurde die Konzentration bestimmt und je nach Versuchsansatz eine definierte Menge auf die LNA-Gelkissen pipettiert. Die Proben wurden anschließend in einer Feuchteammer bei 28 °C für 24 Stunden inkubiert. Zur Quantifizierung der Fallen wurden Gelstücke mit einer Fläche von 0,5 cm<sup>2</sup> ausgestanzt und die Fallen mikroskopisch ausgezählt. Zur Quantifizierung der Fallenfläche wurden Aufnahmen verschiedener Fallen erstellt und deren Fläche mittels ImageJ bestimmt.

Für die Analyse der Hyphenfusionen wurden Sporen von *A. flagrans* auf LNA-Gelkissen pipettiert und für 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Die anschließende Bildaufnahme erfolgte an verschiedenen Positionen unter Verwendung eines 10x-Objektivs. Die Auszählung der fusionierten Hyphen wurde in ImageJ durchgeführt, wobei Fusionen parallel wachsender Hyphen unberücksichtigt blieben.

### **Virulenzassay zur Bestimmung der Nematodenfangrate**

Zur Bestimmung der Fähigkeit Nematoden zu fangen, wurde *A. flagrans* auf LNA-Gelkissen auf Objektträgern angeimpft. Die Fallenbildung wurde durch Zugabe einer gemischten *C. elegans*-Population induziert. Anschließend wurden die Objektträger in einer Feuchtekammer bei 28 °C für 24 Stunden inkubiert. Nicht verdaute Nematoden wurden danach mit sterilem dH<sub>2</sub>O abgewaschen. Aus dem Gelkissen wurden Bereiche mit einer Fläche von etwa 0,25 mm<sup>2</sup> mithilfe eines Stempels ausgestanzt und in eine 35-mm-Mikroskopieschale (ibidi, Gräfelfing) überführt. Zunächst wurde die Anzahl der gebildeten Fallen bestimmt. Anschließend wurden etwa 150 synchronisierte adulte Nematoden auf das Gelkissen pipettiert. Nach 30 Minuten wurde die Anzahl der Fallen mit gefangenen Nematoden sowie der unbesetzten Fallen erfasst. Mikroskopische Aufnahmen erfolgten mit einem Axio Zoom.V16 (Zeiss, Jena).

### **Verwendung von Calcofluor White und ROS-Färbemittel**

Für die Anfärbung der Zellwand wurde Calcofluor White (CFW, F-3543, Sigma) verwendet. Der Farbstoff wurde in 0,5 % KOH und 83 % Glycerin gelöst und als 1 % Stammlösung angesetzt. Für die Anwendung wurde eine 1:1000-Verdünnung in dH<sub>2</sub>O hergestellt. Diese Lösung wurde auf das Myzel pipettiert und für 3 Minuten inkubiert. Für die Anwendung von CellROX Orange (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) wurde eine 1:100-Verdünnung in dH<sub>2</sub>O hergestellt und direkt auf das Myzel pipettiert. Eine Inkubationszeit war nicht erforderlich. OxyBURST Green H<sub>2</sub>HFF-BSA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) wurde als Stammlösung mit 1 mg/ml in PBS oder dH<sub>2</sub>O angesetzt. Als Arbeitskonzentrationen wurden Bereiche zwischen 10 µg/ml und 1 mg/ml getestet, gelöst in dH<sub>2</sub>O, PBS oder Kaliumphosphat-Puffer (KPO<sub>4</sub>). Zusätzlich wurde versucht, die Lösungen vor der Farbstoffzugabe zu entgasen, um gelösten Sauerstoff zu entfernen. Für die Anwendung wurde die jeweilige Lösung auf ein LNA-Gelkissen pipettiert. Für die Färbung mit

Nitroblautetrazoliumchlorid wurden 0,1 %- und 0,5 %-Lösungen in Kaliumphosphat-Puffer hergestellt und auf das Myzel auf einem LNA-Gelkissen pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 28 °C unter Lichtausschluss.

## 5.3 Molekularbiologische Methoden

### Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde je nach Bedarf eine Q5-, Phusion- oder Taq-Polymerase verwendet. Eine PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl ausgeführt mit dem empfohlenen Reaktionspuffer in 1x Endkonzentration, 200 µM dNTPs und je 0,5 µM Oligonukleotiden. Die Menge an zugegebener DNA-Matrize variierte im Bereich von 1 ng bis 500 ng in einer Reaktion. Für eine Standard-PCR wurde ein Programm verwendet mit einer Denaturierungstemperatur von 98 °C und 35 Zyklen. Die Annealing-Temperatur wurde je nach verwendeten Oligonukleotiden angepasst in einem Bereich zwischen 45 °C und 63 °C. Als Polymerisationstemperatur wurde für die Q5- und Phusion-Polymerase eine Temperatur von 72 °C verwendet und für die Taq-Polymerase 68 °C. In Tabelle 11 ist eine Standardreaktion angegeben.

**Tabelle 11: Komponenten für eine Standard-PCR-Reaktion**

Komponente	Volumen für eine 50 µl Reaktion
5 x HF-Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
2,5 U DNA-Polymerase	0,5 µl
5'-Primer (10 mM)	2 µl
3'-Primer (10 mM)	2 µl
Nuklease-freies Wasser	33,5 µl
DNA-Matrize	1 µl

**Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
NoxA-Pf-fw	TTGTAACGACGGCCAGTGAATTCATGCAGGTCGAG TTACGTC	<i>noxA</i> Promotorfusion

NoxA-Pf-rev	TTTCGGCGGGCGGCTTTTGGTGGCATCTTGGCGGTATAT CCCAGA	<i>noxA</i> Promotorfusion
NoxA-GFP-fw	ATGCTCTTTCCTAAACTCCCCCAATGCAGGTCGAGT TACGTC	NoxA-GFP
NoxA-GFP-rev	GATTACTTACCTCACCTTGGAAACGAAGTGTTCTTTC CAGAAGGA	NoxA-GFP
NoxA-GFP-Nter-Pro- 1-fw	ATGCTCTTTCCTAAACTCCCCCAATGCAGGTCGAGT TACGTC	GFP-NoxA
NoxA-GFP-Nter-Pro2- rev	TACTTACCTCACCTTGGAAACCATCTTGGCGGTATAT CCCAGA	GFP-NoxA
NoxA-GFP-Nter- GFP3-fw	TCGCCATCTGGGATATAACGCCAAGATGGTTTCCAAGG GTGAGGT	GFP-NoxA
NoxA-GFP-Nter- GFP4-rev	TCGACTCTTGTTTATCTGCTGCCATAGCGGCCGCTTTG TAAAGT	GFP-NoxA
NoxA-GFP-Nter-Orf5- fw	GGATGAACTTTACAAAGCGGCCGCTATGGCAGCAGAT AAACAAGAGT	GFP-NoxA
NoxA-GFP-Nter-Orf6- rev	TAATCATACATCTTATCTACATACGCTAGAAGTGTTCTT TCCAGAAG	GFP-NoxA
NoxA-lb-fw	GATGGCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATGACAAGAAACAA ATTTGTGCCAAA	Deletion <i>noxA</i>
NoxA-lb-rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACTTCTTGGCGGTATAT CCCAGAT	Deletion <i>noxA</i>
NoxA-rb-fw	ATGCTCTTTCCTAAACTCCCCCAGAAAAAAAAAAT AAAAATAATCTTT	Deletion <i>noxA</i>
NoxA-rb-rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATCGCAATTTGTGTT GTTGA	Deletion <i>noxA</i>
NoxA-re-GFP-fw	GATGGCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATGGTATCTATTACA TTGCATT	<i>noxA</i> Komplementation
NoxA-re-GFP-rev	CCGCTCGACGTAACCTCGACCTGCATTGGGGGGAGTTT AGGGAAAG	<i>noxA</i> Komplementation
NoxB-Pf-fw	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGATTATAGATACA TGTTTCGGTCG	<i>noxB</i> Promotorfusion
NoxB-Pf-rev	AACGCAATGCAATGTAATAGATACCCTAAGCGGCCGC TTTGTA	<i>noxB</i> Promotorfusion
Fw-NoxB-Nter-1	ATGCTCTTTCCTAAACTCCCCCAGATTATAGATACAT GTTCGG	GFP-NoxB
Rev-NoxB-Nter2	TACTTACCTCACCTTGGAAACCATTGCTTCTCAGTTT CGGACCG	GFP-NoxB
Fw-NoxB-Nter-3	CAATACGGTCCGAAACTGAGAAGCAATGGTTTCCAAG GGTGAGGT	GFP-NoxB

Rev-NoxB-Nte-4	ACGAGATCGAGCTTCTCACTGGCATAGCGGCCGCTTT GTAAAGTTCATCC	GFP-NoxB
Fw-NoxB-Nter-5	GGATGAACTTTACAAAGCGGCCGCTATGCCAGTGAGA AGCTCGAT	GFP-NoxB
Rev-NoxB-Nter6	TAATCATACATCTTATCTACATACGTCAGAAATTCTCTT TGCCCC	GFP-NoxB
NoxB-lb-fw	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCTTCTGTATATGG CACGGCA	<i>noxB</i> Deletion
NoxB-lb-rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTTGCTTCTCAGTTT CGGACCG	<i>noxB</i> Deletion
NoxB-rb-fw	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATGTGAGAATTTGG CTGCTCAAAA	<i>noxB</i> Deletion
NoxB-rb-rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATTTGACCATGCCAG CCCCAA	<i>noxB</i> Deletion
NoxR-PF-fw	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCCGAGCCTAGGTT GGACGTCC	<i>noxR</i> Promotorfusion
NoxR-PF-rev	TTTCGGCGGGCGGCTTTTGGTGGCATGATGATGATGTGC ACTTAGT	<i>noxR</i> Promotorfusion
NoxR-LB-fw	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCCATCAGTATTC CCCATCG	<i>noxR</i> Deletion
NoxR-LB-rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTCTAAGCGGCCGCT TTGTAAA	<i>noxR</i> Deletion
NoxR-RB-fw	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAACACGCCGCCCTC CTAAACT	<i>noxR</i> Deletion
NoxR-RB-rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATCACCATTTCCTC AATCTGC	<i>noxR</i> Deletion
NoxR-GFP-fw	CAATACGGTCCGAAACTGAGAAGCAATGTCGTTAAAA CAGGTGGGTT	NoxR-GFP
NoxR-GFP-rev	GATTACTTACCTCACCTTGAAACCGCCTCGAAGGC CCAAAT	NoxR-GFP
NoxR-re-fw	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCA TCC ATC AGT ATT CCC CAT CG	<i>noxR</i> Komplementation
NoxR-re-rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGAT CACCATTTCCTCAATCTGC	<i>noxR</i> Komplementation
Fw-PlsA-PF	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCTTCGAAAAATGT TCCTTTGGATGG	<i>plsA</i> Promotorfusion
Rev-PlsA-PF	TTTCGGCGGGCGGCTTTTGGTGGCATCTTGGCGGTGTT CGTGATG	<i>plsA</i> Promotorfusion
Fw-2727-GFP-nativ	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCACGGATG TTGCCCAAACCTTTTCA	PlsA-GFP

Rev-2727-GFP-nativ	GATTACTTACCTCACCTTGGAAACAATGGCACCCAA TCCTCGC	PlsA-GFP
Fw-HR-PlsA-lb	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCGGATGTTGCC AAACTTTTC	<i>plsA</i> Deletion
Rev-HR-PlsA-lb	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTCTTGGCGGTGTT GTGATG	<i>plsA</i> Deletion
Fw-HR-PlsA-rb	ATGCTCTTTCCTAAACTCCCCCAAAGAGCCTAAAG AAGTTGGAAGTT	<i>plsA</i> Deletion
Rev-HR-PlsA-rb	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATATAAGAATATCT CGGATTGAAGGG	<i>plsA</i> Deletion
PlsA-GFP-re-fw	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGTATCTATTACA TTGCATT	<i>plsA</i> Komplementation
PlsA-GFP-re-rev	GGATGAAAAGTTTGGGCAACATCCGTGGGGGGAGTTT AGGGAAAG	<i>plsA</i> Komplementation
H2B_qPCR_A.flagran s_fwd	TGAAGCAAGTCCACCCTGAT	qPCR Haushaltsgen
H2B_qPCR_A.flagran s_rev	GAAGCCTCAGTAGCAACACG	qPCR Haushaltsgen
NoxA-qPCR_fw2	ACAGGAAATCGAAATTTGGGGTG	<i>noxA</i> qPCR
NoxA-qPCR_rev2	CCATCCGTATGCAAAGAGG	<i>noxA</i> qPCR
NoxB-qPCR-fw	GACGGCATGGTCAATCGTAT	<i>noxB</i> qPCR
NoxB-qPCR-rev	TTCGCCCCGACGATATTTTC	<i>noxB</i> qPCR
PlsA-qPCR-fw	CCAATGCTGCGGTTATGTCT	<i>plsA</i> qPCR
PlsA-qPCR-rev	CCATGGCAGTGCAGCACA	<i>plsA</i> qPCR
qPCR-NoxR-fw	ACAGGAAATCGAAATTTGGGGTG	<i>noxR</i> qPCR
qPCR-NoxR-rev	AAGTAATTGTCTAGCTTCACGG	<i>noxR</i> qPCR
Fw_Nter-NoxB-res	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGATCCGGTATCT ATTACATTG	GFP-NoxB mit <i>neo</i>
Rev_Nter-NoxB-res	CTCGACCGAACATGTATCTATAATCTGGGGGGAGTTTA GGGAAA	GFP-NoxB mit <i>neo</i>
mCherry-Pls-neo-fw	CGAGAAGCGAGGATTGGGTGCCATTGTAAGCAAGGG CGAGGTAA	PlsA-mCherry

mCherry-Pls-neo-rev	TAATCATAACATCTTATCTACATACGCTAAGCGGCCGCTT TGTAG	PlsA-mCherry
Cdc10-fw	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAAGAAGTTGAGGA TATATGAT	Cdc10-mCherry
Cdc10-rev	CCTCGCCCTTGCTTACCTTAATTAAGTGACCATTCGCC TCATCTG	Cdc10-mCherry
NoxA-OE-fw	CCGTTCTTCTTACCATATCTTCAAAATGGCAGCAGATA AACAAGAGTCGA	<i>noxA</i> Überexpression
NoxB-OE-fw	CCGTTCTTCTTACCATATCTTCAAAATGCCAGTGAGAA GCTCGATCTCGT	<i>noxB</i> Überexpression
NoxR-OE-fw	CCGTTCTTCTTACCATATCTTCAAAATGTCGTTAAAC AGGTGGGTTGAT	<i>noxR</i> Überexpression
N-ter-Pro.teaR- fw1	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCATCTGCTGCATT GACTGCA	GFP-TeaR
N-ter-Pro.teaR- rev2	TACTTACCTCACCCCTTGGAACCATGGTGAAGGGTTT CCGGATTC	GFP-TeaR
N-ter-GFP.teaR- fw3	CGAGCGAATCCGGAAACCCCTCACCATGGTTTCCAAG GGTGAGGTA	GFP-TeaR
N-ter-GFP.teaR- rev4	CTCGAGATGCAGTGATGCTTGCCATAGCGGCCGCTTT GTAAAGTT	GFP-TeaR
N-ter-ORF.teaR- fw5	GGATGAACTTTACAAAGCGGCCGCTATGGCAAGCATC ACTGCATC	GFP-TeaR
N-ter-ORF.teaR-rev6	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTATCTGGCTCTCGT CGCGG	GFP-TeaR
teaA-LB-iL-fw	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATACTCGAATCCCA ACTAGAAGC	GFP-TeaR
teaA-LB-iL-rev	GATTACTTACCTCACCCCTTGGAACGAACATGCCGTT GGAGTTCA	GFP-TeaR
teaA-GFP-iL-fw	AACCATGAACTCCAACGGCATGTTCGTTTCC AAGGGTGAGGTAAG	TeaA-GFP
teaA-GFP-iL-rev	AACGCAATGCAATGTAATAGATACCCTAAGCGGCCGC TTTGTAAG	TeaA-GFP
teaA-RB-iL-fw	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAACGATCACGATTA AAGCGAAAAC	TeaA-GFP
teaA-RB-iL-rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATTGATCCTAAAATC AAGTCAATTGAT	TeaA-GFP
teaC-LB-iL-fw	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCGGATCGGCTTTT GAAGAGG	TeaC-GFP

teaC-LB-iL-rev	GATTACTTACCTCACCCCTTGAAACCCGTCGCGACTTC ATGTACC	TeaC-GFP
teaC-GFP-iL-fw	TGAACGGTACATGAAGTCGCGACGGGTTTCCAAGGGT GAGGTAAG	TeaC-GFP
teaC-GFP-il-rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTCTAAGCGGCCGCT TTGTAAA	TeaC-GFP
teaC-RB-iL-fw	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAACACGCCGCCCTC CTAAACT	TeaC-GFP
teaC-RB-iL-rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATCAGGTACCAACC TCGTTATA	TeaC-GFP
Fw-teaR-LB	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATTGACTT CGTCTCCATCTCATC	Deletion <i>teaR</i>
Rev-teaR-LB	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTGGTGAAGGGTTT CCGGATTC	Deletion <i>teaR</i>
Fw-teaR-RB	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATCTTTT ATTCTGCAAAGCAACAAC	Deletion <i>teaR</i>
Rev-teaR-RB	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATTGTAGGTATGGGG TAGAACG	Deletion <i>teaR</i>
teaA-LB-fw	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCTGTATTGGATTG TATTGTA	Deletion <i>teaA</i>
teaA-LB-rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTGGTGAAAGATCA GGACAGGA	Deletion <i>teaA</i>
teaA-RB-fw	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAACGATCACGATTA AAGCGAA	Deletion <i>teaA</i>
teaA-RB-rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATAAGGCCCTAAATA GGACATT	Deletion <i>teaA</i>
teaA-OE-fw	CTCCATCACATCACAATCGATCCAAATGGCCTTCTTAT TCAAAAA	Überexpression <i>teaA</i>
teaA-OE-rev	TAATCATAACATCTTATCTACATACGTTAGAACATGCCGT TGGAGT	Überexpression <i>teaA</i>
teaA-re-fw	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCACTGTATTGGATTG TATTGTA	<i>teaA</i> Komplementation
teaA-re-rev	ACTTTTGAGCAGCCAAATTCTCACATTAGAACATGCC GTTGGAGT	<i>teaA</i> Komplementation
teaC-re-fw	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATCAACCTCTTGT TTCAGCT	<i>teaA</i> Komplementation

teaC-re-rev	ACTTTTGAGCAGCCAAATTCTCACACTACCGTCGCGA CTTCATGT	<i>teaC</i> Komplementation
teaR-re-fw	ATGCTCTTTCCTAAACTCCCCCATGACTTCGTCTCC ATCTCAT	<i>teaR</i> Komplementation
teaR-re-rev	ACTTTTGAGCAGCCAAATTCTCACACTACATGATTGTA CAACCGC	<i>teaR</i> Komplementation
teaA-GFP-neo-fw	TCATACCCCGCGACGAGAGCCAGATGGTATCTATTACA TTGCATTGCG	TeaA-GFP in $\Delta teaR$
tea-GFP-neo-rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATTGGG GGAGTTTAGGGAAA	TeaA-GFP in $\Delta teaR$
qPCR-teaA-fw	GAGGTTAGCACAAGCTATGC	qPCR <i>teaA</i>
qPCR-teaA-rev	CGAGTTGACGGTGTCGAC	qPCR <i>teaA</i>
pJet-fw	ATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTC	Backbone
pJet-rev	ATCTTGCTGAAAACTCGAGC	Backbone
trpC_rev	TGGGGGGAGTTTAGGGAAAAG	Backbone
h2b_cds_fwd	ATGCCACCAAAAGCCGCC	Backbone
Efi_bb_rev	GAATTCACTGGCCGTCGTTT	Backbone
GFP-fw	ATGGTTTCCAAGGGTGAGGT	Backbone
mCherry fw	ATGGTAAGCAAGGGCGAGG	Backbone
tGluC-fw	CGTATGTAGATAAGATGTAT	Backbone
df_tub_rev	TGCAATTGTTGATGTTCAAGC	Backbone
oliC-rev	TTGGATCGATTGTGATGTGATGGA	Backbone

## Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8 %-Agarosegelen. Diese wurden mit 0,5x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA) hergestellt. Die Gelelektrophorese wurde in Kammern durchgeführt, die mit TAE-Puffer befüllt waren. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (3 ml Glycerin, 0,025 g Bromphenolblau, 7 ml dH<sub>2</sub>O, 6-fach konzentriert) ergänzt und DNA-Fragmente wurden bei 100 V für 20 Minuten aufgetrennt. Ein 1-kb-DNA-Marker (New England Biolabs, Frankfurt) wurde als Größenmarker verwendet. Die Detektion

der Banden erfolgte durch Zugabe des DNA-Farbstoffes Midori Green Advance (Biozym) und anschließender Blaulichtanregung.

### Aufreinigung von DNA

DNA aus PCR-Reaktionen wurde mittels des FastGene/PCR Extraction Kits (Nippon Genetics) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Wenn DNA auf ein Agarosegel geladen wurde, wurden die DNA-Banden ausgeschnitten und mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA) aufgereinigt und in 10 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

### Gibson-Assembly

Zur Anwendung der Gibson-Assembly wurden DNA-Fragmente verwendet, die 15–30 bp überlappende Überhänge enthalten. Um das zu gewährleisten, wurden bei einer PCR-Reaktion Primer verwendet, die einen komplementären Überhang in das nächste Fragment aufweisen. 5 µl der DNA-Fragmente (Verhältnis Backbone und Insert 1:3) wurden in einen 15 µl-Gibson-Assembly-Mastermix pipettiert (Tabelle 13) und die Reaktion erfolgte in einem PCR-Cycler bei 50 °C für 30 bis 60 Minuten. Der Gibson-Assembly-Mix wurde anschließend in *E. coli* transformiert.

**Tabelle 13: Zusammensetzung des Gibson-Assembly-Mix**

Lösung	Zusammensetzung
5x ISO-Puffer	3 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 300 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> Je 60 µl 100 mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP 300 µl 1 M DTT 1,5 g PEG-8000 300 µl 100 mM NAD Auf 6 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
1,33x Reaktionsmix	320 µl 5x ISO-Puffer 0,64 µl 10 U/µl T5 Exonuklease 20 µl 2 U/µl Q5-DNA-Polymerase 160 µl 40 U/µl Taq-DNA-Ligase

	699,36 µl dH <sub>2</sub> O
--	-----------------------------

### ***E. coli* Transformation**

Für die Transformation von *E. coli* wurden TOP10-Stämme verwendet. Es wurde eine eingefrorene Kultur für 5 Minuten auf Eis aufgetaut und 50 µl der Kultur wurden mit 10 µl Gibson-Assembly-Reaktion für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei dem die *E. coli* für 2 Minuten bei 42 °C inkubierten. Anschließend wurden die Kultur 2 Minuten auf Eis inkubiert und auf eine LB-Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Die Platte wurde danach in einen Inkubator gestellt bei 37 °C für 12 Stunden.

### **Plasmid-DNA-Präparation**

Um DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde die Kultur in LB-Medium mit Ampicillin inokuliert und über Nacht inkubiert. 2 ml der Kultur wurden anschließend bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer resuspendiert und es wurden 200 µl Zell-Lysispuffer hinzugegeben. Nach kurzem Invertieren wurde 1,5 M Kaliumacetatlösung (pH 4,8) dazu pipettiert und 20 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Ein neues Reaktionsgefäß wurde mit 500 µl vorgekühltem Isopropanol befüllt, in das der Überstand überführt wurde. Es folgte ein Inkubationsschritt für 20 Minuten bei -20 °C und daraufhin ein Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde bei 55 °C getrocknet und in 20 µl dH<sub>2</sub>O bei 68 °C auf einem Thermoschüttler gelöst. Zur Überprüfung der Identität des Plasmids wurde ein Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen durchgeführt. Zur Transformation von *A. flagrans* wurden die Plasmide stattdessen mit dem NucleoSpin Plasmid Easy Pure Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

**Tabelle 14: Puffer für Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli***

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA

	100 µg/ml RNase A
Lysispuffer	0,2 M NaOH 1 % SDS
Kaliumacetat-Puffer	1,5 M Kaliumacetat pH 4,8

**Tabelle 15: Verwendete Plasmide**

Name	Beschreibung	Referenz
pVW118	<i>tubA(p)::mCherry::chsB::apsB(T); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Valentin Wernet, KIT
pVW150	<i>teaA(p)::teaA::GFP; trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Valentin Wernet, KIT
pNH58	Plasmid containing <i>GFP::hph</i>	Nicole Wernet, KIT
pJM16	<i>nipA(p)::nipA::mCherry; gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Jennifer Emser, KIT
pMK23	<i>plsA(p)::h2b::mCherry::tub(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK25	<i>plsA::hph (ΔplsA); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK27	<i>plsA(p)::plsA::gfp::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK50	<i>teaC(p)::teaC::GFP; trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK51	<i>teaR(p)::GFP::teaR; trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK52	<i>teaA::hph (ΔteaA); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK53	<i>teaC::hph (ΔteaC); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK54	<i>teaR::hph (ΔteaR); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK58	<i>teaA(p)::teaA::teaA(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit

pMK59	<i>teaC(p)::teaC::teaC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK60	<i>teaR(p)::teaR::teaR(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK61	<i>teaA(p)::teaA::GFP; gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW125	<i>h2b(p)::r-GECO::gluC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Valentin Wernet, KIT
pMK63	<i>noxA::hph (<math>\Delta</math>noxA); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK64	<i>noxB::hph (<math>\Delta</math>noxB); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK65	<i>noxR::hph (<math>\Delta</math>noxR); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK67	<i>noxR(p)::noxR::noxR(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK68	<i>noxA(p)::noxA::gfp::gluC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK69	<i>noxB(p)::gfp::noxB::gluC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK70	<i>noxB(p)::noxB::gfp::gluC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK71	<i>plsA(p)::plsA::gfp::gluC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK72	<i>noxA(p)::h2b::mCherry::tub(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK73	<i>noxB(p)::h2b::mCherry::tub(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK75	<i>noxR(p)::h2b::mCherry::tub(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK77	<i>noxR(p)::noxR::gfp::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit

pMK78	<i>noxA(p)::gfp::noxA::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK79	<i>cdc10(p)::cdc10::mCherry::gluC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK80	<i>tubA(p)::noxA::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK81	<i>tubA(p)::noxB::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pMK82	<i>tubA(p)::noxR::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit

### Isolation genomischer DNA aus *A. flagrans*

Für die Isolation genomischer DNA aus *A. flagrans* wurden Petrischalen (6 cm Durchmesser) mit 10 ml PDM befüllt und mit Sporen von *A. flagrans* angeimpft. Die Petrischalen wurden bei 28 °C für 48 Stunden inkubiert und die gebildete Kahmhaut wurde mithilfe von Miracloth und Tüchern getrocknet. 50–100 mg der getrockneten Kahmhaut wurden dann in 700 µl Lysispuffer mit 4 Glaskugeln gegeben und das Myzel wurde in einer Schwingmühle (Retsch, Haan) bei 25 Umdrehungen pro Sekunde für 5 Minuten aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben in einem Thermomixer bei 68 °C inkubiert. Auf die Probe wurden dann 200 µl 1,5 M Kaliumacetatlösung (pH 4,8) pipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde dabei alle 5 Minuten invertiert. Danach wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und 500 µl des Überstandes wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt mit 1 ml vorgelegtem Ethanol (100 %). Die Fällung der DNA erfolgte für 15 Minuten bei -20 °C. Die DNA wurde durch 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurde das Pellet in 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 50 °C getrocknet. Es wurde dann 75 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A hinzugegeben und für 30 Minuten bei 68 °C schüttelnd gelöst.

### Isolation genomischer DNA aus *A. flagrans* Kolonien

Für die Isolation genomischer DNA aus *A. flagrans* Kolonien wurde zunächst ein ca. 0,5 cm<sup>2</sup> großer Agarblock mit Myzel ausgeschnitten und in 700 µl Lysis-Puffer überführt. Das Myzel

wurde mithilfe eines Mikropistills mechanisch aufgeschlossen. Anschließend fand eine Inkubation für 60 Minuten bei 65 °C unter ständigem Schütteln statt. Zur Proteinfällung wurden 300 µl Kaliumacetat-Puffer hinzugegeben und die Probe für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (45 Minuten, 13.000 rpm, 4 °C) wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, in dem 1 ml Ethanol (100 %) vorgelegt war. Die DNA-Fällung erfolgte über 15 Minuten auf Eis, gefolgt von einer Zentrifugation (10 Minuten, 13.000 rpm, 4 °C). Das resultierende Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend für 5 Minuten bei 68 °C getrocknet. Zur Resuspension der DNA wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer (versetzt mit 50 µg/ml RNase A) aufgenommen und für 15 Minuten bei 68 °C unter Schütteln inkubiert.

**Tabelle 16: Puffer für die Isolation genomischer DNA aus *A. flagrans***

Lösung	Zusammensetzung
Lysispuffer	1 % (w/v) SDS 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8,0 1:1 mit TE x Puffer mischen
Kaliumacetatpuffer	1 % SDS 1,5 M Kaliumacetat, pH 4,8
TE (10x)	100 mM Tris-HCl, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA

### Southern-Blot-Analyse

Die Verifizierung der vollständigen Gendeletion in *A. flagrans* erfolgte mittels Southern-Blot-Analyse. Zur Detektion wurden Digoxigenin-markierte DNA-Sonden verwendet, deren Herstellung durch eine PCR unter Verwendung des DIG Probe Synthesis Kits (Roche, Mannheim) in einem 25-µl-Ansatz erfolgte. Die entsprechende DNA-Bande wurde nach elektrophoretischer Trennung aus dem Gel ausgeschnitten, bei -80 °C für 20 Minuten eingefroren und anschließend durch mechanisches Ausdrücken in einem Parafilm-Streifen isoliert. Die genomische DNA von *A. flagrans* wurde in einem Volumen von 30 µl mit den entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht bei den empfohlenen Temperaturen verdaut. Die resultierenden Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese bei 100 V für 90 bis 120 Minuten aufgetrennt, wobei die Positionen des DNA-Größenmarkers zur späteren Orientierung

manuell mit einer Pipettenspitze markiert wurden. Vor dem Transfer wurde das Gel für 20 Minuten in 250 mM HCl inkubiert, um die DNA zu depurinieren. Nach einem kurzen Waschschrift mit dH<sub>2</sub>O folgte eine 20-minütige Inkubation in Denaturierungspuffer sowie eine anschließende 20-minütige Behandlung mit Renaturierungspuffer. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Roti-Nylon plus, Roth) wurde über Nacht mittels Kapillar-Blotting durchgeführt. Als Transfermedium diente 20x SSC-Puffer, der über eine Whatman-Papierbrücke durch das Gel und die Membran in einen Stapel saugfähigen Papiers geleitet wurde. Nach Abschluss des Transfers wurden die Markierungen des Größenmarkers mit einem Bleistift auf die Membran übertragen und die DNA durch beidseitiges UV-Crosslinking (1 Minute) kovalent fixiert. Die Membran wurde daraufhin für 30 Minuten bei 68 °C in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Die zuvor bei 95 °C linearisierte und denaturierte Sonde wurde in 15 ml Hybridisierungspuffer überführt und über Nacht bei 68 °C mit der Membran inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden folgten drei Waschschriffe von jeweils 15 Minuten bei 65 °C mit abnehmender Salzkonzentration (2x SSPE, 1x SSPE und 0,1x SSPE, jeweils mit 0,1 % SDS). Die anschließende Detektion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde für 5 Minuten in DIG-Waschpuffer inkubiert und anschließend in DIG2-Lösung blockiert. Die Bindung des Anti-DIG-Antikörpers erfolgte für 30 Minuten in einer 1:10.000-Verdünnung in DIG2-Lösung. Nach zwei 15-minütigen Waschschriffen in DIG-Waschpuffer und einer 5-minütigen Inkubation in DIG3 wurde die Membran mit einer CDP-Star-Lösung (1:500 in DIG3) für 5 Minuten inkubiert. Die Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte mithilfe des Smart Chemilumineszenz-Systems (Peqlab).

**Tabelle 17: Puffer für Southern-Blot-Analyse**

Lösung	Zusammensetzung
0,25 M HCl	20,7 ml HCl (37 %) in dH <sub>2</sub> O
Denaturierungspuffer	87,6 g/l NaCl (1,5 M) 16 g/l NaOH (0,4 M)
Renaturierungspuffer	87,6 g/l NaCl (1,5 M) 44,4 g/l Tris-HCl (282 mM) 26,5 g/l Tris-Base (218 mM)
Hybridisierungspuffer	0,5 M Na-Phosphatpuffer; pH 7,0 70 g/l SDS (7 %)

	autoklavieren
20x SSC-Puffer	175,3 g/l NaCl (3,0 M) 88,2 g/l Na-Citrat – 2H <sub>2</sub> O (0,3 M) pH 7,0
1 M Natriumphosphatpuffer	Lösung 1: 177,99 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2H <sub>2</sub> O (1 M) Lösung 2: 156,01 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2H <sub>2</sub> O (1 M) Lösung 1 in ein Becherglas füllen und Lösung 2 hinzugeben, bis ein pH von 7,0 erreicht ist
DIG1- Puffer	11,61 g/l Maleinsäure 8,77 g/l NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen
DIG2-Puffer	5 % Milchpulver in DIG1
DIG3-Puffer	5,84 g/l NaCl 10,17 g/l MgCl <sub>2</sub> – 6H <sub>2</sub> O pH 9,5 mit Tris-HCl einstellen autoklavieren
20x SSPE-Puffer	175,3 g/l NaCl 26,6 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2H <sub>2</sub> O 7,4 g/l Na <sub>2</sub> -EDTA – 2H <sub>2</sub> O pH 7,4 mit NaOH einstellen
Waschpuffer	0,3 % Tween-20 in DIG1
CDP-Star Lösung	4 µl CDP-Star (Roche, Mannheim) in 2 ml DIG3

## RNA-Isolation

Zur Analyse der Genexpression von *A. flagrans* wurde RNA sowohl unter induzierten Bedingungen des karnivoren Lebensstils als auch im uninduzierten Zustand isoliert. Dazu wurden jeweils 2 Millionen Sporen auf mit Cellophan belegte LNA-Platten ausplattiert und 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Zur Induktion der Fallenbildung wurde eine gemischte *C. elegans*-

N2-Population auf die Platten gegeben, während der Kontrollansätze keine Nematoden zugesetzt wurden. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 28 °C wurde das Myzel mit einem Spatel von der Cellophanfolie abgenommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Für jede Probe wurden fünf Platten zusammengeführt und das Myzelpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolation der RNA wurde mit dem E.Z.N.A. Fungal RNA Mini Kit (Omega Bio-Tek) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Verdau von DNA folgte danach mit dem TURBO DNA-free Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Die RNA-Sequenzierung erfolgte durch BGI Genomics (Hongkong, China)

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

Die Genexpressionsanalyse wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR durchgeführt. Dafür wurde das Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion fand in einem iCycler (Bio-Rad) statt. Als Haushaltsgen wurde in *A. flagrans* das *h2b*-Gen (DFL\_000203) verwendet. Die Expression wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.

## **5.4 Mikroskopie-, Bild- und Datenanalyse**

### **Fluoreszenzmikroskopie**

Die Erstellung von Epifluoreszenz- und Differentialinterferenzkontrast-Aufnahmen (DIC) erfolgte an einem Axio-Imager.Z1-Mikroskop (Zeiss). Hierbei wurden Objektive mit 10-facher (EC-Plan-Neofluar 10x/0,30), 40-facher (EC-Plan-Neofluar 40x/0,75) und 63-facher Vergrößerung (Plan-Apochromat 63x/1,4 Ölimmersion) eingesetzt. Als Lichtquelle diente eine Osram-HXP-120-Quecksilberdampf Lampe. Die Bildaufnahme erfolgte über eine AxioCam-MRm-Kamera unter Verwendung der Software ZEN Blue (Version 2012, Zeiss).

Für hochauflösende Aufnahmen wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 900 (Zeiss) verwendet, das mit einem Airyscan 2-Detektor ausgestattet war. Die Detektion erfolgte über einen GaASP-PMT-Detektor (Galliumarsenid-Phosphid-Photomultiplier), der Aufnahmen in einem Anregungsbereich zwischen 450 und 700 nm ermöglichte.

Für Langzeitaufnahmen eines größeren Bereiches wurde das Stereomikroskop Axio Zoom.V16 mit einer AxioCam 305 color Kamera verwendet.

## **Bild- und Datenanalyse**

Datendarstellung und statistische Auswertung wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 8.0.2) und Excel (Microsoft Office 365) durchgeführt. Die *P*-Werte wurden mittels GraphPad Prism mit einem ungepaarten t-Test ermittelt. Das Programm Fiji/ImageJ (Version 2.0) wurde zur Analyse von Fallengröße und Fallenanzahl und zur Bearbeitung von Bildern verwendet. AlphaFold 3 wurde verwendet, um Proteinstrukturen zu modellieren, welche dann mit UCSF Chimera dargestellt wurden (Abramson et al., 2024; Pettersen et al., 2021).

## Literaturverzeichnis

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.-M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V.C., Caillaud, M.-C., Coutinho, P.M., Dasilva, C., De Luca, F., Deau, F., Esquibet, M., Flutre, T., Goldstone, J.V., Hamamouch, N., Hewezi, T., Jaillon, O., Jubin, C., Leonetti, P., Magliano, M., Maier, T.R., Markov, G.V., McVeigh, P., Pesole, G., Poulain, J., Robinson-Rechavi, M., Sallet, E., Ségurens, B., Steinbach, D., Tytgat, T., Ugarte, E., van Ghelder, C., Veronico, P., Baum, T.J., Blaxter, M., Bleve-Zacheo, T., Davis, E.L., Ewbank, J.J., Favery, B., Grenier, E., Henrissat, B., Jones, J.T., Laudet, V., Maule, A.G., Quesneville, H., Rosso, M.-N., Schiex, T., Smant, G., Weissenbach, J., Wincker, P. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat. Biotechnol.* **26**: 909–915.
- 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., Žídek, A., Bapst, V., Kohli, P., Jaderberg, M., Hassabis, D., Jumper, J.M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* **630**: 493–500.
- Aguirre, J., Lambeth, J.D. (2010). Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* **49**: 1342–1353.
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* **13**: 111–118.
- Ambasta, R.K., Kumar, P., Griendling, K.K., Schmidt, H.H.H.W., Busse, R., Brandes, R.P. (2004). Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **279**: 45935–45941.

- Andersson, K.-M., Kumar, D., Bentzer, J., Friman, E., Ahrén, D., Tunlid, A. (2014).** Interspecific and host-related gene expression patterns in nematode-trapping fungi. *BMC Genomics* **15**: 968.
- Asano, Y., Hagiwara, D., Yamashino, T., Mizuno, T. (2007).** Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1800–1803.
- Balogh, J., Tunlid, A., Rosén, S. (2003).** Deletion of a lectin gene does not affect the phenotype of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Fungal Genet. Biol.* **39**: 128–135.
- Barron, G.L. (2003).** Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. *Biodiversity* **4**: 3–9.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D.D., Gierz, G., López-Franco, R., Bracker, C.E. (1995).** Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the Hyphoid model. *Exp. Mycol.* **19**: 153–159.
- Bedard, K., Krause, K.-H. (2007).** The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**: 245–313.
- Begum, R., Thota, S., Abdulkadir, A., Kaur, G., Bagam, P., Batra, S. (2022).** NADPH oxidase family proteins: signaling dynamics to disease management. *Cell. Mol. Immunol.* **19**: 660–686.
- Bhattacharjee, S. (2012).** The language of reactive oxygen species signaling in plants. *J. Bot.* **2012**: 1–22.
- Bicho, C.C., Kelly, D.A., Snaith, H.A., Goryachev, A.B., Sawin, K.E. (2010).** A catalytic role for Mod5 in the formation of the Tea1 cell polarity landmark. *Curr. Biol.* **20**: 1752–1757.
- Bischof, L., Schweitzer, F., Heinisch, J.J. (2024).** Functional conservation of the small GTPase Rho5/Rac1—A tale of yeast and men. *Cells* **13**: 472.

- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. & Fischer, R. (2005).** The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol.* **15**: 1833-1838.
- Brent Heath, I. (2003).** The interrelationships of actin and hyphal tip growth in the ascomycete *Geotrichum candidum*. *Fungal Genet. Biol.* **38**: 85–97.
- Browning, H., Hayles, J., Mata, J., Aveline, L., Nurse, P., McIntosh, J.R. (2000).** Tea2p is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast. *J. Cell Biol.* **151**: 15–28.
- Bugeda, A., Garrigues, S., Gandía, M., Manzanares, P., Marcos, J.F., Coca, M. (2020).** The antifungal protein AfpB induces regulated cell death in its parental fungus *Penicillium digitatum*. *mSphere* **5**: 10.1128/msphere.00595-20.
- Cano-Domínguez, N., Álvarez-Delfín, K., Hansberg, W., Aguirre, J. (2008).** NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **7**: 1352–1361.
- Cano-Domínguez, N., Bowman, B., Peraza-Reyes, L., Aguirre, J. (2019).** *Neurospora crassa* NADPH oxidase NOX-1 is localized in the vacuolar system and the plasma membrane. *Front. Microbiol.* **10**: 1825.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004).** Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS **61**: 192–208.
- Chen, S.-A., Lin, H.-C., Hsueh, Y.-P. (2022).** The cAMP-PKA pathway regulates prey sensing and trap morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *G3* **12**: jkac217.
- Chen, S.-A., Lin, H.-C., Schroeder, F.C., Hsueh, Y.-P. (2021).** Prey sensing and response in a nematode-trapping fungus is governed by the MAPK pheromone response pathway. *Genetics* **217**: iyaa008.
- Chevalier, L., Pinar, M., Le Borgne, R., Durieu, C., Peñalva, M.A., Boudaoud, A., Minc, N. (2023).** Cell wall dynamics stabilize tip growth in a filamentous fungus. *PLOS Biol.* **21**: e3001981.

- Choe, A., von Reuss, S.H., Kogan, D., Gasser, R.B., Platzer, E.G., Schroeder, F.C., Sternberg, P.W., (2012).** Ascarioside signaling is widely conserved among nematodes. *Curr. Biol.* **22**: 772–780.
- Citri, A., Malenka, R.C. (2008).** Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol.* **33**: 18–41.
- Clergeot, P.-H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M.-P., Pépin, R., Tharreau, D., Notteghem, J.-L., Lebrun, M.-H. (2001).** *PLSI*, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 6963–6968.
- Conesa, A., Punt, P.J., Van Den Hondel, C.A.M.J.J. (2002).** Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J. Biotechnol.* **93**: 143–158.
- De Gara, L., De Pinto, M.C., Tommasi, F. (2003).** The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 863–870.
- Delorenzi, M., Speed, T. (2002).** An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics* **18**: 617–625.
- Dirschnabel, D.E., Nowrousian, M., Cano-Domínguez, N., Aguirre, J., Teichert, I., Kück, U. (2014).** New insights into the roles of NADPH oxidases in sexual development and ascospore germination in *Sordaria macrospora*. *Genetics* **196**: 729–744.
- Dworakowski, R., Alom-Ruiz, S.P., Shah, A.M. (2008).** NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol. Rep.* **60**: 21–28.
- Egan, M.J., Wang, Z.-Y., Jones, M.A., Smirnoff, N., Talbot, N.J. (2007).** Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 11772–11777.
- Emser, J., Kriegler, M., Klemke, A.-L., Fischer, R. (2022).** Räuberische Pilze mit Potenzial zur Schädlingsbekämpfung. *Biol. Unserer Zeit - BiUZ* **53**: 32-39.

- Emser, J., Seidler, L., Kovačević, E., Yu, K., Rudolf, T., Wohlmann, E., 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., Fischer, R. (2024).** The cysteine-rich virulence factor NipA of *Arthrobotrys flagrans* interferes with cuticle integrity of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* **15**: 5795.
- Farah, M.E., Amberg, D.C. (2007).** Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. *MBoC* **18**: 1359–1365.
- Fischer, M.S., Glass, N.L. (2019).** Communicate and fuse: How filamentous fungi establish and maintain an interconnected mycelial network. *Front. Microbiol.* **10**: 619.
- Fischer, R., Requena, N. (2022).** Small-secreted proteins as virulence factors in nematode-trapping fungi. *Trends Microbiol.* **30**: 615–617.
- Fischer, R., Zekert, N., Takeshita, N. (2008).** Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol. Microbiol.* **68**: 813–826.
- Fleissner, A., Leeder, A.C., Roca, M.G., Read, N.D., Glass, N.L. (2009).** Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 19387–19392.
- Fleißner, A., Sarkar, S., Jacobson, D.J., Roca, M.G., Read, N.D., Glass, N.L. (2005).** The *so* locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **4**: 920–930.
- Fleißner, A., Simonin, A.R., Glass, N.L. (2008).** Cell fusion in the filamentous fungus, *Neurospora crassa*. 21–38.
- Free, S.J. (2013).** Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. 33–82.

- Fu, C., Iyer, P., Herkal, A., Abdullah, J., Stout, A., Free, S.J. (2011).** Identification and characterization of genes required for cell-to-cell fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **10**: 1100–1109.
- Fukuda, S., Yamamoto, R., Yanagisawa, N., Takaya, N., Sato, Y., Riquelme, M., Takeshita, N. (2021).** Trade-off between plasticity and velocity in mycelial growth. *mBio* **12**: e03196-20.
- Giesbert, S., Schürg, T., Scheele, S., Tudzynski, P. (2008).** The NADPH oxidase Cpnox1 is required for full pathogenicity of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Mol. Plant Pathol.* **9**: 317–327.
- Green, K.A., Eaton, C.J., Savoian, M.S., Scott, B. (2019).** A homologue of the fungal tetraspanin Pls1 is required for *Epichloë festucae* expressorium formation and establishment of a mutualistic interaction with *Lolium perenne*. *Mol. Plant Pathol.* **20**: 961–975.
- Gyöngyösi, N., Káldi, K. (2014).** Interconnections of reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythm in *Neurospora crassa*. *Antioxid. Redox Signal.* **20**: 3007–3023.
- Haj Hammadeh, H., Serrano, A., Wernet, V., Stomberg, N., Hellmeier, D., Weichert, M., Brandt, U., Sieg, B., Kanofsky, K., Hehl, R., Fischer, R., Fleißner, A. (2022).** A dialogue-like cell communication mechanism is conserved in filamentous ascomycete fungi and mediates interspecies interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**: e2112518119.
- Hansberg, W., Aguirre, J. (1990).** Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* **142**: 201–221.
- Hansberg, W., De Groot, H., Sies, H. (1993).** Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **14**: 287–293.
- Harris, S.D. (2011).** Cdc42/Rho GTPases in fungi: variations on a common theme. *Mol. Microbiol.* **79**: 1123–1127.
- Herb, M. (2024).** NADPH oxidase 3: Beyond the inner ear. *Antioxidants* **13**: 219.

- Herzog, S., Schumann, M.R., Fleißner, A. (2015).** Cell fusion in *Neurospora crassa*. *Curr. Opin. Microbiol.* **28**: 53–59.
- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N., Fischer, R. (2009).** The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **8**, 957–967.
- Houglund, J.L., Hicks, K.A., Hartman, H.L., Kelly, R.A., Watt, T.J., Fierke, C.A. (2010).** Identification of novel peptide substrates for protein farnesyltransferase reveals two substrate classes with distinct sequence selectivities. *J. Mol. Biol.* **395**: 176–190.
- Hsueh, Y.-P., Gronquist, M.R., Schwarz, E.M., Nath, R.D., Lee, C.-H., Gharib, S., Schroeder, F.C., Sternberg, P.W. (2017).** Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. *eLife* **6**: e20023.
- Hu, Q., Yu, Z.-X., Ferrans, V.J., Takeda, K., Irani, K., Ziegelstein, R.C. (2002).** Critical role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in generating  $Ca^{2+}$  oscillations in human aortic endothelial cells stimulated by histamine. *J. Biol. Chem.* **277**: 32546–32551.
- Hu, X., Hoffmann, D.S., Wang, M., Schuhmacher, L., Stroe, M.C., Schreckenberger, B., Elstner, M., Fischer, R. (2024).** GprC of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys flagrans* activates mitochondria and reprograms fungal cells for nematode hunting. *Nat. Microbiol.* **9**: 1752–1763.
- Hugot, J.-P., Baujard, P., Morand, S. (2001).** Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology* **3**, 199–208.
- Hyde, G.J., Heath, I.B. (1997).**  $Ca^{2+}$  gradients in hyphae and branches of *Saprolegnia ferax*. *Fungal Genet. Biol.* **21**: 238–251.
- Ishitsuka, Y., Savage, N., Li, Y., Bergs, A., Grün, N., Kohler, D., Donnelly, R., Nienhaus, G.U., Fischer, R., Takeshita, N. (2015).** Superresolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth. *Sci. Adv.* **1**: e1500947.

- Jansson, H., Poinar, G.O. (1986).** Some possible fossil nematophagous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **87**: 471–474.
- Ji, X., Yu, Z., Yang, J., Xu, J., Zhang, Y., Liu, S., Zou, C., Li, J., Liang, L., Zhang, K.-Q., (2020).** Expansion of adhesion genes drives pathogenic adaptation of nematode-trapping fungi. *iScience* **23**: 101057.
- Jiang, X., Xiang, M., Liu, X. (2017).** Nematode-trapping fungi. *Microbiol. Spectr.* **5**: 5.1.10.
- Johnson, D.I. (1999).** Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 54–105.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A.F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.-Y., Lopez, R., Hunter, S. (2014).** InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* **30**: 1236–1240.
- Kamei, M., Yamashita, K., Takahashi, M., Fukumori, F., Ichiishi, A., Fujimura, M. (2016).** Involvement of MAK-1 and MAK-2 MAP kinases in cell wall integrity in *Neurospora crassa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 1843–1852.
- Khalili, B., Lovelace, H.D., Rutkowski, D.M., Holz, D., Vavylonis, D. (2020).** Fission yeast polarization: Modeling Cdc42 oscillations, symmetry breaking, and zones of activation and inhibition. *Cells* **9**: 1769.
- Kokkoris, K., Castro, D.G., Martin, S.G. (2014).** Tea4-phosphatase I landmark promotes local growth by dual Cdc42 GEF recruitment and GAP exclusion. *J. Cell Sci.* **127.9**: 2005-2016.
- Konzack, S., Rischitor, P.E., Enke, C., Fischer, R. (2005).** The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **16**: 497–506.
- Kowalewski, G.P., Wildeman, A.S., Bogliolo, S., Besold, A.N., Bassilana, M., Culotta, V.C., (2021).** Cdc42 regulates reactive oxygen species production in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **297**: 100917.

- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567–580.
- Kuo, C.-Y., Chen, S.-A., Hsueh, Y.-P. (2020).** The high osmolarity glycerol (HOG) pathway functions in osmosensing, trap morphogenesis and conidiation of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J. Fungi* **6**: 191.
- 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., Hsueh, Y.-P. (2024).** The nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* detects prey pheromones via G protein-coupled receptors. *Nat. Microbiol.* **9**: 1738–1751.
- Lacaze, I., Lalucque, H., Siegmund, U., Silar, P., Brun, S. (2015).** Identification of NOXD / Pro41 as the homologue of the p22<sup>phox</sup> NADPH oxidase subunit in fungi. *Mol. Microbiol.* **95**: 1006–1024.
- Li, X., Kang, Y.-Q., Luo, Y.-L., Zhang, K.-Q., Zou, C.-G., Liang, L.-M. (2017).** The NADPH oxidase AoNoxA in *Arthrobotrys oligospora* functions as an initial factor in the infection of *Caenorhabditis elegans*. *J. Microbiol.* **55**: 885–891.
- Liang, L., Gao, H., Li, J., Liu, L., Liu, Z., Zhang, K.-Q. (2017).** The Woronin body in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* is essential for trap formation and efficient pathogenesis. *Fungal Biol.* **121**: 11–20.
- Lin, H.-C., De Ulzurrun, G.V.-D., Chen, S.-A., Yang, C.-T., Tay, R.J., Iizuka, T., Huang, T.-Y., Kuo, C.-Y., Gonçalves, A.P., Lin, S.-Y., Chang, Y.-C., Stajich, J.E., Schwarz, E.M., Hsueh, Y.-P. (2023).** Key processes required for the different stages of fungal carnivory by a nematode-trapping fungus. *PLOS Biol.* **21**: e3002400.
- Lin, T.-H., Chang, H.-W., Tay, R.J., Hsueh, Y.-P. (2025).** Predation by nematode-trapping fungus triggers mechanosensory-dependent quiescence in *Caenorhabditis elegans*. *iScience* **28**: 112792.
- Liu, Q., Li, D., Jiang, K., Zhang, K.-Q., Yang, J. (2022).** AoPEX1 and AoPEX6 are required for mycelial growth, conidiation, stress response, fatty acid utilization, and trap formation in *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiol. Spectr.* **10**: e00275-22.

- López-Franco, R., Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C.E. (1994).** Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 12228–12232.
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C.J., Marchler-Bauer, A. (2020).** CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res.* **48**: D265–D268.
- Ludewig, A. (2013).** Ascaroside signaling in *C. elegans*. *WormBook*: 1–22.
- MacDiarmid, C.W., Wang, Y., Taggart, J., Vashisht, A., Qing, X., Wohlschlegel, J.A., Eide, D.J. (2025).** The interactome of the Bakers' yeast peroxiredoxin Tsa1 implicates it in redox regulation of intermediary metabolism, glycolysis, and zinc homeostasis. *Metallomics* **17**: mfaf028.
- Manck, R., Ishitsuka, Y., Herrero, S., Takeshita, N., Nienhaus, G.U., Fischer, R. (2015).** Genetic evidence for a microtubule-capture mechanism during polarised growth of *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Sci.* **128**: 3569–3582.
- Marschall, R., Tudzynski, P. (2016).** BcIqg1, a fungal IQGAP homolog, interacts with NADPH oxidase, MAP kinase and calcium signaling proteins and regulates virulence and development in *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* **101**: 281–298.
- Martin, S.G., Chang, F. (2005).** New end take off: Regulating cell polarity during the fission. *Cell Cycle* **4**: 4046–4049.
- Martin, S.G., McDonald, W.H., Yates, J.R., Chang, F. (2005).** Tea4p links microtubule plus ends with the formin For3p in the establishment of cell polarity. *Dev. Cell* **8**: 479–491.
- Mata, J., Nurse, P. (1997).** *teal* and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* **89**: 939–949.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. (2010).** Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* **33**: 453–467.

- Mir, A.A., Park, S.-Y., Sadat, Md.A., Kim, S., Choi, J., Jeon, J., Lee, Y.-H. (2015).** Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Sci. Rep.* **5**: 11831.
- Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Messerli, M.A., Shi, C., Gilroy, S. (2007).** Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 20996–21001.
- Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., Ponts, N. (2015).** Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**: 295–308.
- Mori, T., Morikawa, C., Noda, T., Ban, S. (2000).** Effects of chelators (EGTA, EDTA) and calcium ions on nematode capture by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys ellipsospora*. *Mycoscience* **41**: 455–460.
- Mouyna, I., Fontaine, T. (2014).** Cell Wall of *Aspergillus fumigatus*: a dynamic Structure. 169–183.
- Nelson, W.J. (2003).** Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**: 766–774.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., Mitchison, T.J. (2009).** A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* **459**: 996–999.
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H., Tunlid, A. (2006).** Nematophagous fungi.
- Nordbring-Hertz, B., Mattiasson, B. (1979).** Action of a nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host–microorganism interaction. *Nature* **281**: 477–479.
- Nordzieke, D.E., Fernandes, T.R., El Ghalid, M., Turrà, D., Di Pietro, A. (2019).** NADPH oxidase regulates chemotropic growth of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* towards the host plant. *New Phytol.* **224**: 1600–1612.

- Nowrousian, M., Frank, S., Koers, S., Strauch, P., Weitner, T., Ringelberg, C., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Kück, U. (2007).** The novel ER membrane protein PRO41 is essential for sexual development in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *Mol. Microbiol.* **64**: 923–937.
- Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., Van Oppen, L.M.P.E., Szczepanowska, J., Koopman, W.J.H., Wieckowski, M.R. (2016).** Quantifying ROS levels using CM-H 2 DCFDA and HyPer. *Methods* **109**: 3–11.
- Patkar, R.N., Suresh, A., Naqvi, N.I. (2010).** MoTea4-mediated polarized growth is essential for proper asexual development and pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*. *Eukaryot. Cell* **9**: 1029–1038.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Meng, E.C., Couch, G.S., Croll, T.I., Morris, J.H., Ferrin, T.E. (2021).** UCSF CHIMERA-X: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* **30**: 70–82.
- Pop, M., Klemke, A.-L., Seidler, L., Wernet, N., Steudel, P.L., Baust, V., Wohlmann, E., Fischer, R. (2024).** *Caenorhabditis elegans* neuropeptide NLP-27 enhances neurodegeneration and paralysis in an opioid-like manner during fungal infection. *iScience* **27**: 109484.
- Pouvreau, S. (2014).** Genetically encoded reactive oxygen species (ROS) and redox indicators. *Biotechnol. J.* **9**: 282–293.
- Pujol-Carrion, N., De La Torre-Ruiz, M.A. (2010).** Glutaredoxins Grx4 and Grx3 of *Saccharomyces cerevisiae* play a role in actin dynamics through their Trx domains, which contributes to oxidative stress resistance. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7826–7835.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G.H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R.R., Takeshita, N., Fischer, R. (2018).** Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **82**: e00068-17.

- Riquelme, M., Bredeweg, E.L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R.W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P., Freitag, M. (2014).** The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Mol. Biol. Cell* **25**: 1312–1326.
- Riquelme, M., Sánchez-León, E. (2014).** The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**: 27–33.
- Román, E., Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., Pla, J. (2007).** MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol.* **15**: 181–190.
- Rosén, S., Ek, B., Rask, L., Tunlid, A. (1992).** Purification and characterization of a surface lectin from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology.* **138**: 2663-2672.
- Roze, L., Laivenieks, M., Hong, S.-Y., Wee, J., Wong, S.-S., Vanos, B., Awad, D., Ehrlich, K., Linz, J. (2015).** Aflatoxin biosynthesis is a novel source of reactive oxygen species—A potential redox signal to initiate resistance to oxidative stress? *Toxins* **7**: 1411–1430.
- Ryder, L.S., Dagdas, Y.F., Mentlak, T.A., Kershaw, M.J., Thornton, C.R., Schuster, M., Chen, J., Wang, Z., Talbot, N.J. (2013).** NADPH oxidases regulate septin-mediated cytoskeletal remodeling during plant infection by the rice blast fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 3179–3184.
- Sakai, J., Li, J., Subramanian, K.K., Mondal, S., Bajrami, B., Hattori, H., Jia, Y., Dickinson, B.C., Zhong, J., Ye, K., Chang, C.J., Ho, Y.-S., Zhou, J., Luo, H.R. (2012).** Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. *Immunity* **37**: 1037–1049.
- Sánchez-León, E., Riquelme, M. (2015).** Live imaging of  $\beta$ -1,3-glucan synthase FKS-1 in *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genet. Biol.* **82**: 104–107.
- Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R.W., Bartnicki-Garcia, S., Riquelme, M. (2011).** Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: Actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryot. Cell* **10**: 683–695.

- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R. (2005).** GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **62**: 3014–3038.
- Schmidt, S., Märker, R., Ramšak, B., Beier-Rosberger, A.M., Teichert, I., Kück, U. (2020).** Crosstalk between pheromone signaling and NADPH oxidase complexes coordinates fungal developmental processes. *Front. Microbiol.* **11**: 1722.
- Schürg, T., Brandt, U., Adis, C., Fleißner, A. (2012).** The *Saccharomyces cerevisiae* BEM 1 homologue in *Neurospora crassa* promotes co-ordinated cell behaviour resulting in cell fusion. *Mol. Microbiol.* **86**: 349–366.
- Schürmann, J., Buttermann, D., Herrmann, A., Giesbert, S., Tudzynski, P. (2013).** Molecular characterization of the NADPH oxidase complex in the ergot fungus *Claviceps purpurea* : CpNox2 and CpPls1 are important for a balanced host-pathogen interaction. *Mol. Plant-Microbe Interactions* **26**: 1151–1164.
- Scott, J.D., Pawson, T. (2009).** Cell signaling in space and time: Where proteins come together and when they're apart. *Science* **326**: 1220–1224.
- Segal, A.W., Jones, O.T.G. (1979).** The subcellular distribution and some properties of the cytochrome *b* component of the microbicidal oxidase system of human neutrophils. *Biochem. J.* **182**: 181–188.
- Segmüller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., Van Kan, J., Tudzynski, P. (2008).** NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interactions* **21**: 808–819.
- Semighini, C.P., Harris, S.D. (2008).** Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. *Genetics* **179**: 1919–1932.
- Serrano, A., Illgen, J., Brandt, U., Thieme, N., Letz, A., Lichius, A., Read, N.D., Fleißner, A. (2018).** Spatio-temporal MAPK dynamics mediate cell behavior coordination during fungal somatic cell fusion. *J. Cell Sci.* **131**: jcs213462.
- Shaw, B.D., Chung, D.-W., Wang, C.-L., Quintanilla, L.A., Upadhyay, S. (2011).** A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biol.* **115**: 541–546.

- Shoji, J., Kikuma, T., Kitamoto, K. (2014).** Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**: 1–9.
- Siegmund, U., Heller, J., Van Kan, J.A.L., Tudzynski, P. (2013).** The NADPH oxidase Complexes in *Botrytis cinerea*: Evidence for a close association with the ER and the tetraspanin Pls1. *PLoS one* **8.2**: e55879.
- Siegmund, U., Marschall, R., Tudzynski, P. (2015).** BcNoxD, a putative ER protein, is a new component of the NADPH oxidase complex in *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* **95**: 988–1005.
- Sinner, M.P., Masurat, F., Ewbank, J.J., Pujol, N., Bringmann, H. (2021).** Innate immunity promotes sleep through epidermal antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* **31**: 564-577.
- Snaith, H.A., Samejima, I., Sawin, K.E. (2005).** Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast. *EMBO J.* **24**: 3690–3699.
- Snaith, H.A., Sawin, K.E. (2003).** Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**: 647–651.
- Snell, V., Nurse, P. (1994).** Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast--a role for casein kinase II in the establishment of polarized growth. *EMBO J.* **13**: 2066–2074.
- Steinberg, G. (2007).** Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot. Cell* **6**: 351–360.
- Stöcker, S., Van Laer, K., Mijuskovic, A., Dick, T.P. (2018).** The conundrum of hydrogen peroxide signaling and the emerging role of peroxiredoxins as redox relay hubs. *Antioxid. Redox Signal.* **28**: 558–573.
- Su, H., Zhao, Y., Zhou, J., Feng, H., Jiang, D., Zhang, K.-Q., Yang, J. (2017).** Trapping devices of nematode-trapping fungi: formation, evolution, and genomic perspectives: Trapping devices of nematode-trapping fungi. *Biol. Rev.* **92**: 357–368.
- Südhof, T.C. (2013).** Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* **80**: 675–690.

- Sumimoto, H. (2008).** Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* **275**: 3249–3277.
- Takemoto, D., Kamakura, S., Saikia, S., Becker, Y., Wrenn, R., Tanaka, A., Sumimoto, H., Scott, B. (2011).** Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 2861–2866.
- Takemoto, D., Tanaka, A., Scott, B. (2007).** NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genet. Biol.* **44**: 1065–1076.
- Takemoto, D., Tanaka, A., Scott, B. (2006).** A p67<sup>Phox</sup>-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal–grass mutualistic symbiosis. *Plant Cell* **18**: 2807–2821.
- Takeshita, N., Evangelinos, M., Zhou, L., Serizawa, T., Somera-Fajardo, R.A., Lu, L., Takaya, N., Nienhaus, G.U., Fischer, R. (2017).** Pulses of Ca<sup>2+</sup> coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: 5701–5706.
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S., Fischer, R. (2008).** Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **19**: 339–351.
- Takeshita, N., Mania, D., Herrero, S., Ishitsuka, Y., Nienhaus, G.U., Podolski, M., Howard, J., Fischer, R. (2013).** The cell-end marker TeaA and the microtubule polymerase AlpA contribute to microtubule guidance at the hyphal tip cortex of *Aspergillus nidulans* to provide polarity maintenance. *J. Cell Sci.* **126**: 5400–5411.
- Tanaka, A., Takemoto, D., Hyon, G., Park, P., Scott, B. (2008).** NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. *Mol. Microbiol.* **68**: 1165–1178.
- Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R., Shiozaki, K. (2008).** Pom1 DYRK Regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr. Biol.* **18**: 322–330.

- Tatebe, H., Shimada, K., Uzawa, S., Morigasaki, S., Shiozaki, K. (2005).** Wsh3/Tea4 is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of Tea1 and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Curr. Biol.* **15**: 1006–1015.
- Tay, Y.D., Leda, M., Goryachev, A.B., Sawin, K.E. (2018).** Local and global Cdc42 guanine nucleotide exchange factors for fission yeast cell polarity are coordinated by microtubules and the Tea1–Tea4–Pom1 axis. *J. Cell Sci.* **131**: jcs216580.
- Temple, M.D., Perrone, G.G., Dawes, I.W. (2005).** Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* **15**: 319–326.
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S. (1996).** The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**: 1123–1133.
- Tunlid, A., Jansson, H.-B., Nordbring-Hertz, B. (1992).** Fungal attachment to nematodes. *Mycol. Res.* **96**: 401–412.
- Tunlid, A., Jansson, S. (1991).** Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2868–2872.
- Vaart, B. van der, Akhmanova, A., Straube, A. (2009).** Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochem. Soc. Trans.* **37**: 1007–1013.
- Valiante, V., Macheleidt, J., Föge, M., Brakhage, A.A. (2015).** The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front. Microbiol.* **6**: 325.
- Valinluck, M., Woraratanadharm, T., Lu, C., Quintanilla, R.H., Banuett, F. (2014).** The cell end marker Tea4 regulates morphogenesis and pathogenicity in the basidiomycete fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* **66**: 54–68.
- Vangalis, V., Papaioannou, I.A., Markakis, E.A., Knop, M., Typas, M.A. (2021).** The NADPH oxidase A of *Verticillium dahliae* is essential for pathogenicity, normal development, and stress tolerance, and it interacts with Yap1 to regulate redox homeostasis. *J. Fungi* **7**: 740.

- Veal, E.A., Findlay, V.J., Day, A.M., Bozonet, S.M., Evans, J.M., Quinn, J., Morgan, B.A. (2004).** A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol. Cell* **15**: 129–139.
- Veenhuis, M., Nordbring-Hertz, B., Harder, W. (1984).** Occurrence, characterization and development of two different types of microbodies in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**: 31–38.
- Wang, X., Li, G.-H., Zou, C.-G., Ji, X.-L., Liu, T., Zhao, P.-J., Liang, L.-M., Xu, J.-P., An, Z.-Q., Zheng, X., Qin, Y.-K., Tian, M.-Q., Xu, Y.-Y., Ma, Y.-C., Yu, Z.-F., Huang, X.-W., Liu, S.-Q., Niu, X.-M., Yang, J.-K., Huang, Y., Zhang, K.-Q. (2014).** Bacteria can mobilize nematode-trapping fungi to kill nematodes. *Nat. Commun.* **5**: 5776.
- Wei, W., Zhu, W., Cheng, J., Xie, J., Jiang, D., Li, G., Chen, W., Fu, Y. (2016).** Nox Complex signal and MAPK cascade pathway are cross-linked and essential for pathogenicity and conidiation of mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Sci. Rep.* **6**: 24325.
- Wernet, N., Wernet, V., Fischer, R. (2021).** 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., Kriegler, M., Kumpost, V., Mikut, R., Hilbert, L., Fischer, R. (2023).** Synchronization of oscillatory growth prepares fungal hyphae for fusion. *eLife* **12**: e83310.
- Wernet, V., Wäckerle, J., 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.
- Wessels, J.G.H., Mol, P.C., Sietsma, J.H., Vermeulen, C.A. (1990).** Wall structure, wall growth, and fungal cell morphogenesis. 81–95.
- Wilson, C., Núñez, M.T., González-Billault, C. (2015).** Contribution of NADPH-oxidase to the establishment of hippocampal neuronal polarity in culture. *J. Cell Sci.* **128**: 2989-2995.

- Xie, M., Bai, N., Yang, X., Liu, Y., Zhang, K.-Q., Yang, J. (2023).** Fus3 regulates asexual development and trap morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *iScience* **26**: 107404.
- Youssar, L., Wernet, V., Hensel, N., Yu, X., Hildebrand, H.-G., Schreckenberger, B., Kriegler, M., Hetzer, B., Frankino, P., Dillin, A., 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., Fischer, R. (2021).** Fatal attraction of *Caenorhabditis elegans* to predatory fungi through 6-methyl-salicylic acid. *Nat. Commun.* **12**: 5462.
- Zhang, W., Hu, C., Hussain, M., Chen, J., Xiang, M., Liu, X. (2019).** Role of low-affinity calcium system member Fig1 homologous proteins in conidiation and trap-formation of nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Sci. Rep.* **9**: 4440.
- Zhang, Z., Chen, Y., Li, B., Chen, T., Tian, S. (2020).** Reactive oxygen species: A generalist in regulating development and pathogenicity of phytopathogenic fungi. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**: 3344–3349.
- Zhao, X., Mehrabi, R., Xu, J.-R. (2007).** Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryot. Cell* **6**: 1701–1714.
- Zhao, Y.-L., Zhou, T.-T., Guo, H.-S. (2016).** Hyphopodium-specific VdNoxB/VdPls1-dependent ROS-Ca<sup>2+</sup> signaling is required for plant infection by *Verticillium dahliae*. *PLOS Pathog.* **12**: e1005793.
- Zhen, Z., Xing, X., Xie, M., Yang, L., Yang, X., Zheng, Y., Chen, Y., Ma, N., Li, Q., Zhang, K.-Q., Yang, J. (2018).** MAP kinase Slt2 orthologs play similar roles in conidiation, trap formation, and pathogenicity in two nematode-trapping fungi. *Fungal Genet. Biol.* **116**: 42–50.
- Zhen, Z., Zhang, G., Yang, L., Ma, N., Li, Q., Ma, Y., Niu, X., Zhang, K.-Q., Yang, J. (2019).** Characterization and functional analysis of calcium/calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs) in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**: 819–832.

- Zhou, D., Xie, M., Bai, N., Yang, L., Zhang, K.-Q., Yang, J. (2020).** The Autophagy-related gene Aolatg4 regulates hyphal growth, sporulation, autophagosome formation, and pathogenicity in *Arthrobotrys oligospora*. *Front. Microbiol.* **11**: 592524.
- Zhou, D., Zhu, Y., Bai, N., Xie, M., Zhang, K.-Q., Yang, J., (2022a)** Aolatg1 and Aolatg13 regulate autophagy and play different roles in conidiation, trap formation, and pathogenicity in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**: 824407.
- Zhou, D., Zhu, Y., Bai, N., Yang, L., Xie, M., Yang, Jianguo, Zhu, M., Zhang, K.-Q., Yang, Jinkui (2022b).** AoATG5 plays pleiotropic roles in vegetative growth, cell nucleus development, conidiation, and virulence in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Sci. China Life Sci.* **65**: 412–425.
- Zhu, M., Zhao, N., Liu, Y., Li, X., Zhen, Z., Zheng, Y., Zhang, K., Yang, J. (2022).** The cAMP-PKA signalling pathway regulates hyphal growth, conidiation, trap morphogenesis, stress tolerance, and autophagy in *Arthrobotrys oligospora*. *Environ. Microbiol.* **24**: 6524–6538.
- Zuriegat, Q., Abubakar, Y.S., Wang, Z., Chen, M., Zhang, J. (2024).** Emerging roles of exocyst complex in fungi: A review. *J. Fungi* **10**: 614.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Fischer bedanken, der mich nun bereits seit meiner Bachelor- und Masterarbeit bis hin zur Dissertation betreut hat. Ich danke ihm für das entgegengebrachte Vertrauen, die Freiheit, meinen eigenen Weg gehen zu dürfen, sowie für seine stets lehrreichen Ratschläge.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Jörg Kämper für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Ein großer Dank geht an alle Mitglieder der Wurmgruppe, die stets für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Ein besonderer Dank gilt Valentin und Nicole, die mich in die Welt der Pilze eingeführt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten, auch über ihre Zeit in der Wurmgruppe hinaus. Ebenso danke ich Jennifer, Kaiwei, Theresa, Anna-Lena, Lena, Pietrina, Maria P., Maria S., Paula, Xiaodi und Meihang, die mir den Laboralltag durch nette Gespräche sowie die gemeinsame Kaffee- und Kuchenzeit in der Küche versüßt haben.

Für die Unterstützung bei Experimenten, Bestellungen und allen sonstigen organisatorischen Anliegen danke ich Elke, Satur und Birgit. Ein herzlicher Dank gilt auch allen Bachelor- und Masterstudierenden, die großartige Arbeit geleistet haben und von denen auch ich viel lernen durfte. Dem gesamten Fischerlab danke ich für die Hilfsbereitschaft bei meinen unzähligen Anfragen.

Der größte Dank gebührt jedoch meiner Familie und meinen Freunden. Danke, dass ihr mich auf dieser langen Reise immer unterstützt habt, für euren Rückhalt und dafür, dass ihr in allen Phasen dieser Arbeit immer für mich da wart. Ohne euch wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.