

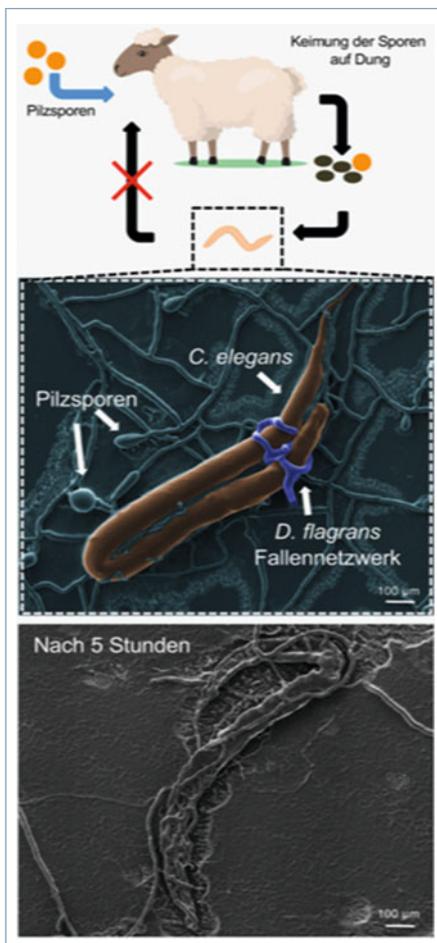
Interspezies-Kommunikation

Räuberische Pilze mit Anwendungspotenzial

VALENTIN WERNET, NICOLE WERNET, REINHARD FISCHER
 INSTITUT FÜR ANGEWANDTE BIOWISSENSCHAFTEN, KARLSRUHER INSTITUT FÜR
 TECHNOLOGIE (KIT)

Nematode-trapping fungi, such as *Duddingtonia flagrans*, are fascinating carnivorous microorganisms. In a nutrient-rich environment they live as saprotrophs, but if nutrients are scarce and in the presence of nematodes, they can switch to a predatory lifestyle. The switch is characterized by the formation of complex, adhesive trap structures. The interaction requires a sophisticated interspecies communication with pheromones, secondary metabolites, and virulence factors.

DOI: 10.1007/s12268-021-1668-3
 © Die Autorinnen und Autoren 2021



■ Nematodenfangende Pilze (NFP) wie *Duddingtonia flagrans* sind eine besonders faszinierende Gruppe karnivorer Mikroorganismen. In einer nährstoffreichen Umgebung ernähren sie sich von totem, organischem Material. Sind die Nährstoffe jedoch limitiert und befinden sich Nematoden in der Nähe, können die Pilze zu einem räuberischen Lebensstil wechseln, der durch die Ausbildung komplexer, klebriger Fallenstrukturen gekennzeichnet ist. Die Interaktion der beiden Organismen beruht auf einer ausgeklügelten Interspezies-Kommunikation mit Pheromonen, Sekundärmetaboliten und Virulenzfaktoren.

Der erste nematodenfangende Pilz *Arthrobotrys superba* wurde bereits 1839 beschrieben, wobei die Fähigkeit, Nematoden zu fangen, jedoch erst 36 Jahre später von Wilhelm Zopf entdeckt und 1994 von Donald H. Pfister mit der Gattung *Orbilbia* in Verbindung gebracht wurde [1]. Da eine Vielzahl von

◀ **Abb. 1:** Anwendung von *Duddingtonia flagrans* in der Tierhaltung. Die Pilzsporen keimen auf dem Dung aus und reduzieren dort die Zahl der Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) wie in den Bildern unten gezeigt. Dadurch wird die Reinfektion beim Grasens reduziert. Bild oben: Freepik.com; Bilder unten aus [13].

Nematoden Schädlinge von Tieren oder Pflanzen sind, haben NFP ein großes Potenzial als biologische Schädlingsbekämpfungsmittel [2]. *D. flagrans* bildet resistente Chlamydosporen, die sehr gut für die Anwendung der Pilze geeignet sind, und wurde bereits erfolgreich in Feldversuchen mit Nutztieren eingesetzt (Abb. 1, [3]). *D. flagrans* ist auch eng mit Pflanzenwurzeln assoziiert und verbessert deren Versorgung mit Phosphat, sodass dieser Pilz auch Potenzial zur nachhaltigen Produktion von Lebens- und Futtermitteln hat [4]. Neben dem großen Anwendungspotenzial ist *D. flagrans* ein attraktives Modellsystem, um verschiedene biologische Phänomene auf molekularer, zellbiologischer oder biochemischer Ebene zu untersuchen.

Pilz-Fadenwurm-Kommunikation durch flüchtige Substanzen

Die Interaktion zwischen NFP und Nematoden gilt als evolutionäre Anpassung an eine stickstoffarme Umgebung und geht auf eine über 419 Millionen Jahre andauernde Koevolution zurück, in der sich eine ausgeprägte Interspezies-Kommunikation entwickelt hat [5]. Die Pilze locken ihre Beute mit flüchtigen Stoffen in die Fallen, die für die Nematoden nach Paarungs- und Nahrungssignalen riechen. Nematodeneigene Pheromone, die Ascaroside, die Prozesse wie die Entwicklung der verschiedenen Larvenformen steuern, werden wiederum von den Pilzen wahrgenommen [6, 7].

Regulation der Fallenbildung durch pilzliche Sekundärmetabolite und nematodeneigene Pheromone

Eine interessante Frage betrifft die Regulation der Fallenbildung. Voraussetzung zur Einleitung des Entwicklungsprogramms ist eine Limitierung der Nährstoffe, und zusätzlich müssen Nematoden vorhanden sein. Die Fallenbildung sollte allerdings erst ab einer bestimmten Anzahl von Nematoden initiiert werden, damit die Fallen, die einige Stunden nach dem Kontakt mit den Nematoden gebildet wurden, auch erfolgreich eingesetzt wer-

den können. Die Nematoden, die zuerst mit dem Myzel in Kontakt kamen, sind dann wahrscheinlich in der Umgebung verschwunden. Zur zeitlichen und räumlichen Steuerung der Fallenbildung werden pilzliche Sekundärmetabolite und die oben genannten Ascaroside eingesetzt [8, 9]. *D. flagrans* nutzt eine Polyketidsynthese zusammen mit einigen modifizierenden Enzymen zur Bildung von Arthrosporol, was die Fallenbildung unterdrückt [7]. Wenn eine große Anzahl Nematoden vorhanden ist, steigt die Ascarosidkonzentration über einen Schwellenwert und hemmt die Arthrosporolsynthese – d. h. die Fallenbildung wird durch die Hemmung eines negativen Faktors eingeleitet. Da sowohl Arthrosporol als auch Ascaroside konzentrationsabhängig wirken, ist damit eine Populationsdichtebestimmung möglich (**Abb. 2**).

Kürzlich wurde ein weiterer Level an Komplexität entschlüsselt und gezeigt, dass nicht in allen Bereichen des Myzels der komplette Arthrosporolbiosyntheseweg abläuft, sondern in den Hyphenspitzen nur das erste

Intermediat, 6-Methylsalicylsäure (6-MSA), entsteht. Dieses Molekül dient als Lockstoff für *Caenorhabditis elegans* [7]. Methylsalicylsäure ist ein wichtiges Pheromon in Pilz-Pflanze-Interaktionen. Allerdings handelt es sich hier um einen Methylester von Salicylsäure (Shikimatweg), während *D. flagrans* 6-MSA über den Polyketidweg produziert.

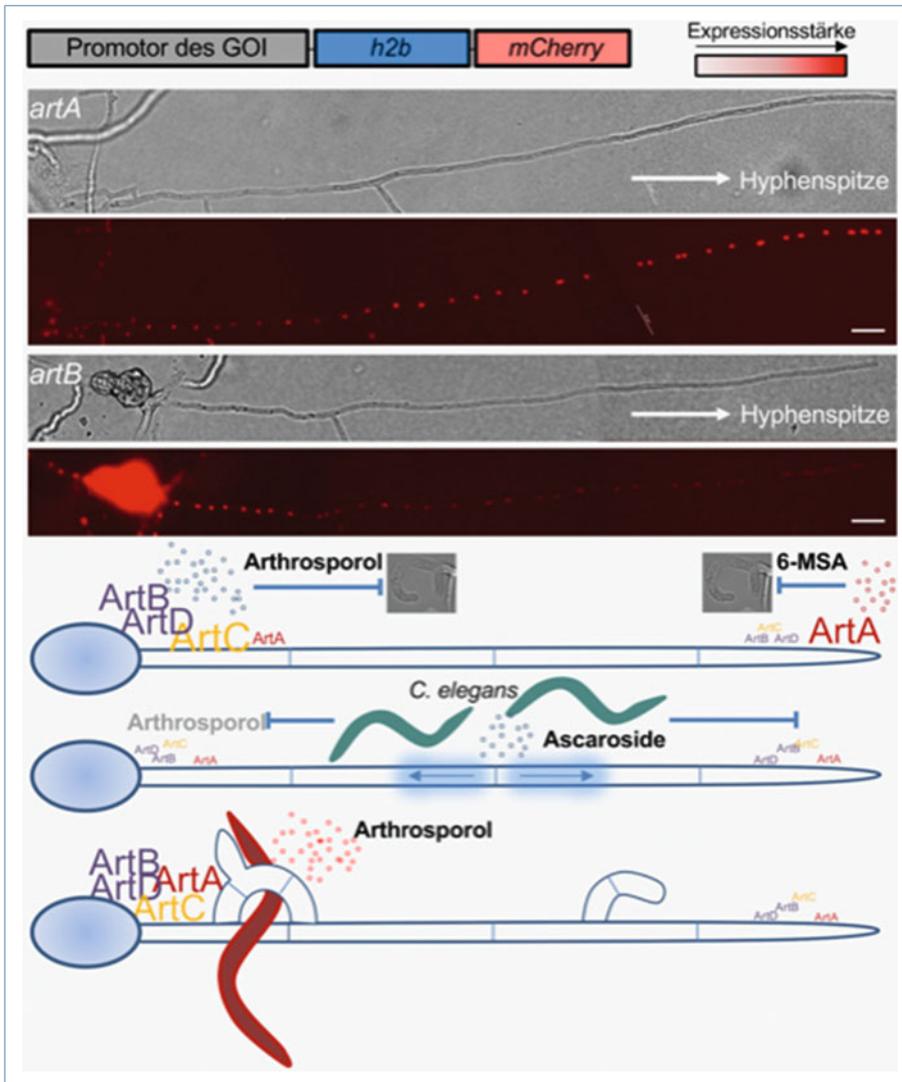
Perfekte Krümmung: Wie wird ein Ring gebildet?

Die Fallenbildung stellt eine zellbiologisch komplexe morphologische Veränderung dar, an der verschiedene Signalwege sowie das Cytoskelett beteiligt sind. Die Fallenringe entstehen durch die Abzweigung einer vegetativen Hyphe, die sich während des Wachstums krümmt, um mit der ursprünglichen Hyphe zu fusionieren. Schon vor physischem Kontakt zwischen den beiden Hyphen entsteht von der basalen Hyphe ausgehend eine weitere Hyphe, die der ersten entgegengewächst. Dies deutet auf eine interzelluläre Kommunikation hin, wie sie bei der Keimlingsfusion von *Neurospora crassa* anhand

des Zelldialogmodells beschrieben wurde. Hier fungieren die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) MAK-2, sowie das *Soft*-Protein als Vermittler des Zelldialogs, indem sie abwechselnd an die Plasmamembran der Hyphenspitzen lokalisieren [10]. So wechseln die Hyphen koordiniert den Zustand zwischen Signalsender und Empfänger. Eine Besonderheit der Fallenbildung von NFP liegt darin, dass die interagierenden Kompartimente im Gegensatz zur Keimlingsfusion nur vier bis fünf Hyphensegmente voneinander entfernt sind. Die Pilze müssen somit die intrazelluläre Selbststimulation durch die gleichzeitige Generierung und Wahrnehmung chemotroper Signale verhindern. Tatsächlich ist das Zellkommunikationsmodell in *D. flagrans* konserviert (**Abb. 3**). Intrazellulär wird der evolutionär konservierte STRIPAK-Signalkomplex für die Signalverarbeitung benötigt (**Abb. 3**, [11, 12]). Wie die Zell-Zell-Kommunikation und intrazelluläre Signalverarbeitung mit dem Cytoskelett, das letztlich die Ringbildung und den Ringschluss bewirkt, verbunden ist, ist noch nicht geklärt.

Hier steht eine Anzeige.

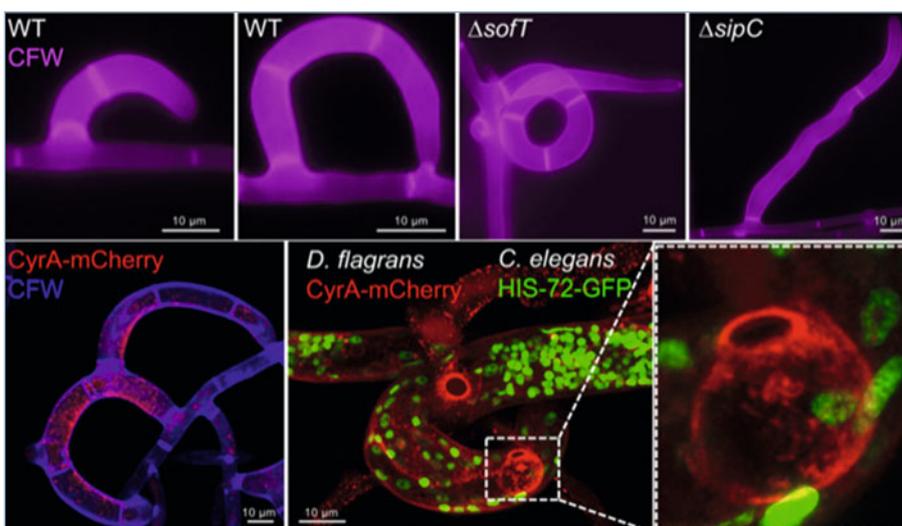
 Springer



◀ **Abb. 2:** Regulation der Fallenbildung. Der pilzliche Sekundärmetabolit Arthrosporol hemmt die Fallenbildung. Die Ascaroside (*Caenorhabditis elegans*-Pheromone) unterdrücken die Arthrosporolbildung. Hyphenspitzen exprimieren nur die Polyketidsynthase, ArtA, sodass 6-MSA gebildet wird. 6-MSA ist ein Lockstoff für *C. elegans*. Die hinteren Kompartimente bilden auch die anderen Enzyme, sodass 6-MSA zu Arthrosporol umgesetzt wird. So werden Fallen nur gebildet, wenn genügend Nematoden und somit eine hohe Konzentration von Ascarosiden in der Umgebung vorhanden sind. Für die Fallenbildung ist die Krümmung der Hyphe mithilfe des Cytoskeletts notwendig, sodass der Ringschluss durch Fusion mit der ursprünglichen Hyphe stattfinden kann. Die Expression der Gene (GOI = *gene of interest*) wurde durch einen Promotor-Reporter-Assay mittels mCherry untersucht. mCherry ist durch die Histone-2B(H2B)-Sequenz mit einem Kernlokalisierungssignal fusioniert, sodass das Protein (mCherry) die Zellkerne rot färbt, wenn der Promotor aktiv ist. Bilder entnommen aus [7]. Maßstab: 20 µm.

Pilzattacke benötigt lytische Enzyme und kleine, sekretierte Proteine

Nach der Fallenbildung kommt es zur Adhäsion und Penetration der Fadenwürmer, wozu Druck und lytische Enzyme nötig sind. Darüber hinaus spielen aber vermutlich Virulenzfaktoren eine Rolle, die in vielen Wirts-Pathogen-Interaktionen beschrieben wurden. Sie manipulieren beispielsweise das Immunsystem, verhindern die Erkennung des Pathogens durch den Wirt oder könnten im Falle von NFP an der Auflösung des Zellverbands oder der Paralyse beteiligt sein. Tatsächlich codiert das *D. flagrans* Genom 638 Proteine (6,4 %) mit einem N-terminalen Signalpeptid für die Sekretion. Davon waren 249 kleiner als 300 Aminosäuren, gehören also zu den *small secreted proteins* (SSPs), die häufig mit Virulenz in Verbindung gebracht werden [13]. Mit dem cysteinreichen Protein, CyrA, wurde ein erster potenzieller Virulenzfaktor charakterisiert [14]. Das CyrA-Protein lokalisierte vor allem im Infektionsbulbus, einer von der pilzlichen Infektionshyphe ausgebildeten Struktur im inneren der Nematoden (**Abb. 3**). Der *cyrA*-Deletionsstamm zeigte eine verringerte Virulenz, gemessen an der Zeit, die der Pilz benötigt, um die Fadenwürmer zu paralisieren. Die Expression des pilzlichen Gens in *C. elegans* verringerte die Lebensdauer der Nematoden. CyrA ist somit vermutlich als eines von vielen Proteinen an der Virulenz von *D. flagrans* beteiligt. Um eine verhältnismäßig große Beute wie einen Fadenwurm zu „erlegen“, bedarf es jedoch



▲ **Abb. 3:** Zellbiologie der Fallenbildung und der Penetration. **Oben:** Eine Zell-Zell-Kommunikation mittels des Soft-Proteins und der STRIPAK-Komponente SipC ist für den Ringschluss nötig. Die Zellwände sind mit Calcofluor White (CFW) gefärbt. **Unten:** Der Virulenzfaktor CyrA lokalisiert in leeren Fallen in vesikelartigen Strukturen an der Fallenninnenseite (links) und akkumuliert nach Eindringen der Hyphen in den Fadenwurm am Infektionsbulbus (Mitte und rechts). Die Zellwände des Pilzes (links) sind mit Calcofluor blau und die Zellkerne des Fadenwurms (Mitte und rechts) mit GFP grün gefärbt. Bilder entnommen aus [11, 14].

offensichtlich eines Zusammenspiels vieler Proteine. Man darf gespannt sein, welche weiteren Erkenntnisse aus dieser Räuber-Beute-Beziehung gewonnen werden können. ■

Literatur

- [1] Pfister DH (1994) *Orbilia fimicola*, a nematophagous discomycete and its *Arthrobotrys* anamorph. *Mycologia* 86: 451–453
- [2] Ahmad G, Khan A, Khan AA et al. (2021) Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 114: 885–912
- [3] Healey K, Lawlor C, Knox MR et al. (2018) Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: tracer studies in sheep. *Vet Parasitol* 253: 48–54
- [4] Monteiro TSA, Valadares SV, Kramer de Mello IN et al. (2018) Nematophagus fungi increasing phosphorus uptake and promoting plant growth. *Biol Contr* 123: 71–75
- [5] Yang E, Xu L, Yang Y et al. (2012) Origin and evolution of carnivorism in the Ascomycota (fungi). *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 10960–5
- [6] Vidal-Diez de Ulzurrun G, Hsueh YP (2018) Predator-prey interactions of nematode-trapping fungi and nematodes: both sides of the coin. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 3939–3949
- [7] Yu X, Hu X, Mirza M et al. (2021) Fatal attraction of *Caenorhabditis elegans* to predatory fungi through 6-methyl-salicylic acid. *Nat Commun* 12: 5462
- [8] Niu XM, Zhang KQ (2011) *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology* 2: 59–78
- [9] Xu ZF, Wang BL, Sun HK et al. (2015) High trap formation and low metabolite production by disruption of the polyketide synthase gene involved in the biosynthesis of arthrosporols from nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J Agric Food Chem* 63: 9076–9082

- [10] Fischer MS, Glass NL (2019) Communicate and fuse: how filamentous fungi establish and maintain an interconnected mycelial network. *Front Microbiol* 10: 619
- [11] Wernet V, Wäckerle J, Fischer R (2021) The STRIPAK component SipC is involved in morphology and cell-fate determination in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *Genetics*, im Druck
- [12] Kück U, Radchenko D, Teichert I (2019) STRIPAK, a highly conserved signaling complex, controls multiple eukaryotic cellular and developmental processes and is linked with human diseases. *Biol Chem* 400: 1005–1022
- [13] Youssar L, Wernet V, Hensel N et al. (2019) Intercellular communication is required for trap formation in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *PLoS Genet* 15: e1008029
- [14] Wernet N, Wernet V, Fischer R (2021) The small-secreted cysteine-rich protein CyrA is a virulence factor of *Duddingtonia flagrans* during the *Caenorhabditis elegans* attack. *PLoS Path* 17:e1010028

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Reinhard Fischer
Institut für Angewandte Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fritz-Haber-Weg 4
D-76131 Karlsruhe
Reinhard.fischer@kit.edu
www.iab.kit.edu/microbio

AUTORINNEN UND AUTOREN



Valentin Wernet, Nicole Wernet und Reinhard Fischer (v.l.n.r.)

Valentin Wernet

2011–2017 Biologiestudium am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2018–2021 Promotion unter Anleitung von Prof. Fischer. Seit August 2021 Postdoc in der gleichen Gruppe.

Nicole Wernet

2012–2015 Biologiestudium (Bachelor), Universität Marburg. 2015–2018 Masterstudium am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2018–2021 Promotion unter Anleitung von Prof. Dr. R. Fischer. Seit August 2021 Postdoc in der gleichen Gruppe.

Reinhard Fischer

Biologiestudium und Promotion in Mikrobiologie. Anschließend Postdoc, Universität Marburg und University of Georgia, USA. 1994–2004 Research Associate, Universität Marburg und MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. 1998 Habilitation. Seit 2004 Professor für Mikrobiologie, Institut für Angewandte Biowissenschaften, KIT. Weitere Arbeitsgebiete: Zellbiologie von *Aspergillus nidulans*, Phytochromantwort in *A. nidulans* und *Alternaria alternata*, Sekundärmetabolismus in *A. alternata*.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer