

Untersuchung der Fallenbildung und Anwendung des Nematoden-fangenden Pilzes *Duddingtonia flagrans*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION
von
Valentin Wernet

Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm
Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper
Tag der mündlichen Prüfung: 19. 7. 2021

**Untersuchung der Fallenbildung
und Anwendung
des Nematoden-fangenden Pilzes
*Duddingtonia flagrans***

**Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)**

**von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)**

**genehmigte
DISSERTATION
von
Valentin Wernet**

Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm
Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper
Tag der mündlichen Prüfung: 19. 7. 2021

Cuant che tu sês su la biciclete, tocje pedalâ

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

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie in der gültigen Fassung vom 26.06.2017 wurden beachtet. Die elektronische Version der vorliegenden Arbeit stimmt mit der schriftlichen Arbeit überein. Weiterhin ist die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. 1 § 3 der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie beim Institut gesichert.

Datum / Ort

Wernet, Valentin

Publikationsliste

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Serrano, A.*, Hammadeh, H. H.*, **Wernet, V.***, Stomberg, N., Hellmeier, D., Weichert, M., Brandt, U., Sieg, B., Fischer, R. & Fleißner, A. (2021). A dialog-like cell communication mechanism is highly conserved in filamentous ascomycete fungi and mediates interspecies interactions. *Proc Natl Acad Sci*, eingereicht.

Wernet, V. & Fischer, R. (2021). The STRIPAK component Strip 1/2 is involved in morphology and cell fate determination in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *Genetics*, eingereicht.

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

Weitere Publikationen, die nicht direkt mit dem Thema dieser Arbeit verknüpft sind:

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

Gao, X., Herrero, S., **Wernet, V.**, Erhardt, S., Valerius, O., Braus, G. H. & Fischer, R. (2021). The role of *Aspergillus nidulans* polo-like kinase PlkA in microtubule-organizing center control. *J Cell Sci*, in Revision.

Wernet, V., Herrero, S. & Fischer, R. (2021). Soft but not too soft – how a rigid tube expands without breaking. *mBio*, Kommentar, in press.

Zhou, L., Evangelinos, M., **Wernet, V.**, Eckert, A.F., Ishitsuka, Y., Fischer, R., Nienhaus, G.U. & Takeshita, N. (2018) Superresolution and pulse-chase imaging reveal the role of vesicle transport in polar growth of fungal cells. *Sci Adv*, 4, e1701798

Takeshita, N., **Wernet, V.**, Tsuizaki, M., Grün, N., Hoshi, H., Ohta, A., Fischer, R. & Horiuchi, H. (2015) Transportation of *Aspergillus nidulans* class III and V chitin synthases to the hyphal tips depends on conventional kinesin, *PLoS One*, 10(5):e0125937

* zu gleichen Teilen beigetragen

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1. Abstract	3
2. Einleitung	5
2.1 Pflanzenparasitäre Nematoden und Anwendung NFP	7
2.2 Lebenszyklus Nematoden-fangender Pilze.....	10
2.3 Kommunikation und Zellfusion	14
2.4 Soft Orthologe in filamentösen Pilzen.....	18
2.5 striatin interacting phosphatases and kinases (STRIPAK) Komplex	19
3. Ergebnisse	23
3.1 Etablierung eines in vitro CRISPR-Cas9 Systems zur gerichteten Gendeletion in D. flagrans	23
3.2 Der Zelldialog vegetativer Hyphen und Fallen in D. flagrans	27
3.3 Bakterien-induzierte Fallenbildung in D. flagrans	36
3.4 Der STRIPAK Komplex in D. flagrans	48
3.5 Anwendung von D. flagrans zur biologischen Schädlingsbekämpfung von Xiphinema index	59
4. Diskussion.....	64
4.1 Das Zelldialog-Modell ist in filamentösen Pilzen konserviert.....	64
4.2 Bakterien induzieren die Fallenbildung in der D. flagrans Δsoft Mutante.....	68
4.3 Die STRIPAK Komplex Komponente SipC wird für die Septierung und korrekte Fallenbildung in D. flagrans benötigt.....	76
4.4 Anwendungspotenzial von NFP zur biologischen Schädlings-bekämpfung von X. index	78
5. Material & Methoden	81
5.1 Chemikalien und Geräte.....	81
5.2 Kultivierung der Organismen.....	82
5.3 Molekularbiologische Methoden	90
5.4 Proteinbiochemische Methoden	104
5.5 Mikroskopische Methoden	106
Literaturverzeichnis	110

1. Zusammenfassung

Nematoden-fangende Pilze (NFP) bilden komplexe Fallenstrukturen mit ihren Hyphen aus, um Nematoden zu fangen und zu verdauen. Als natürliche Antagonisten besitzen sie ein großes Potenzial zur biologischen Schädlingsbekämpfung von pflanzen- sowie tierparasitärer Nematoden. Die Bildung der Fallen ist der Hauptindikator des Wechsels vom saprothrophen zum räuberischen Lebensstil. Die molekularen Mechanismen der Fallenbildung sind bisher kaum untersucht. In dieser Arbeit wurde die Fallenbildung des NFP *Duddingtonia flagrans* untersucht, der dreidimensionale klebrige Fallennetzwerke ausbildet.

Während des Ringschlusses kommt es zu einem Zelldialog, indem eine kleine Hyphenspitze in Richtung der sich bildenden Falle wächst. Normalerweise findet man in filamentösen Pilzen Zellfusionen (Anastomosen) bei Keimlingen oder vegetativen Hyphen. Im Pilz *Neurospora crassa* wurde ein Zelldialog-Modell entdeckt, welches durch die zeitliche und räumliche Anordnung einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase und einem weiteren Signalprotein reguliert wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Zelldialog-Modell aus *N. crassa* in *D. flagrans* bei der vegetativen Zellfusion aber auch während der Fallenbildung konserviert ist. Die Proteine MakB, SofT, HexA, und HamA waren dabei für die Interaktion notwendig. Während SofT in oszillierenden Phasen an der Plasmamembran interagierender Zellen lokalisierte, zeigte MakB eine oszillierende Akkumulation in den Zellkernen. Die Zellfusion während der Fallenbildung war in Gendelektionsmutanten von *soft*, *makB*, *hexA* und *hamA* gestört, und führte zu ungeschlossenen Ringfallen, die jedoch weiterhin klebrig waren und Nematoden fingen. Die Lokalisation von SofT war dabei abhängig vom Woronin Körper Protein HexA. Diese Ergebnisse deuten auf eine Regulation des Zelldialogs bei der Fallenbildung am Septum hin.

Die Fallenbildung wird bei Nährstoffmangel nicht nur durch Anwesenheit von Nematoden, sondern auch durch verschiedene Bakterien induziert. Durch einen Zufallsbefund wurden Bakterien der Gattung *Delftia* identifiziert, die die Fallenbildung in *D. flagrans* induzierten, wenn die SofT Lokalisation fehlte oder das Gen deletiert war. Für die reprimierende Funktion des Proteins war das Vorhandensein des N-Terminus mit einer konservierten Protein-Protein-Interaktionsdomäne notwendig. Damit wurde eine neue Funktion des SofT Proteins bei der Induktion der Fallenbildung beschrieben.

Die Krümmung der Falle ist mit der Ascogonienbildung des Pilzes *Sordaria macrospora* vergleichbar, bei der der *striatin-interacting phosphatase and kinase* (STRIPAK) Komplex beteiligt ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Deletion der STRIPAK Komponente SipC (STRIP1/2) zu unvollständigen, säulenartigen Fallen mit stark verlängerten Kompartimenten führte. Die Lokalisation der Fallenspezifischen Serinprotease P12 zeigte den Verlust der Lokalisation beim Übergang von Fallen- zu vegetativem Wachstum in der $\Delta sipC$ Mutante. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fallenkompimente ihre Fallenidentität verloren hatten. Ein vergleichbarer Effekt wurde durch die Zugabe der Aktin-depolymerisierenden Chemikalie Cytochalasin A beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle des STRIPAK Komplexes und des Aktinzyoskeletts bei der Bestimmung der Fallenidentität hin.

Das Anwendungspotenzial von *D. flagrans* wurde in Infektionsstudien mit dem Wein-pathogenen Nematoden *Xiphinema index* untersucht. Es wurde eine *X. index* Zucht im Labor etabliert und Infektionsstudien an Feigenkeimlingen durchgeführt. Durch die Zugabe von *D. flagrans* kam es *in vitro* zu einer starken Verminderung von *X. index*. In Versuchen mit Topfkulturpflanzen wurde nach 40 Tagen Co-Inkubation eine Verringerung der Nematoden Jungtiere durch *D. flagrans* erzielt. Weiterhin wurden unterschiedliche NFP aus Erde eines Weinguts angereichert. Auch *D. flagrans* zeigte erfolgreiches Wachstum in der getesteten Erde des Weinguts, sodass in diesem Umfeld NFP zur biologischen Schädlingsbekämpfung von Nematoden einsetzbar wären.

1. Abstract

Nematode-trapping fungi (NTF) form complex trap structures with their hyphae to trap and digest nematodes. As natural antagonists, they have great potential for biological control of plant as well as animal parasitic nematodes. The formation of traps indicates the change from saprotrophic to a predatory lifestyle. The molecular mechanisms of trap formation however are poorly understood. In this work trap formation of the NTF *Duddingtonia flagrans* was studied which forms three-dimensional sticky trap networks.

During ring closure, cell dialogue occurs as a small hyphal peg grows toward the forming trap. In fungi, cell fusions (anastomoses) are observed in germling or vegetative hyphae. In the fungus *Neurospora crassa*, a cell dialogue model was discovered that is regulated by the temporal and spatial arrangement of a mitogen-activated protein kinase and a signaling protein. In this work, it was shown that the cell dialogue model from *N. crassa* is conserved in *D. flagrans* during vegetative cell fusion but also during trap formation. The proteins MakB, SofT, HexA and HamA were necessary for the interaction during this process. While SofT localized in oscillatory phases at the plasma membrane of interacting cells, MakB showed oscillatory accumulation in the nuclei. Cell fusion during trap formation was disrupted in gene deletion mutants of *soft*, *makB*, *hexA*, and *hamA*, resulting in unclosed traps that nevertheless remained sticky and trapped nematodes. The localization of SofT was thereby dependent on the Woronin body protein HexA. These results suggest a regulation of cell dialogue in trap formation at the septum.

Trap formation in nutrient-deficient conditions is induced not only by the presence of nematodes but also by various bacteria. By a chance finding, bacteria of the genus *Delftia* were identified that induced trap formation in *D. flagrans* when SofT localization was absent, or the gene was deleted. The presence of the N-terminus with a conserved protein-protein interaction domain was necessary for the repressive function of the protein. Thus, a novel function of the SofT protein in the induction of trap formation was described.

Trap curvature is comparable to ascogonia formation of the fungus *Sordaria macrospora*, which involves the striatin-interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) complex. In this work, it was shown that deletion of the STRIPAK component SipC (STRIP1/2) resulted in incomplete, column-like traps with greatly

elongated compartments. Localization of the trap-specific serine protease P12 showed loss of localization during the transition from trap to vegetative growth in the $\Delta sipC$ mutant. These results indicate that the trap compartments had lost their trap identity. A comparable effect was observed by the addition of the actin-depolymerizing chemical cytochalasin A. These results suggest a role for the STRIPAK complex and actin cytoskeleton in determining trap identity.

The potential of *D. flagrans* as a biocontrol agent was investigated in infection studies with the wine pathogenic nematode *Xiphinema index*. A *X. index* culture was established in the laboratory and infection studies were conducted on fig seedlings. Addition of *D. flagrans* resulted in a strong reduction of *X. index in vitro*. In experiments with pot-cultured plants, a reduction of nematode juveniles by *D. flagrans* was obtained after 40 days of co-incubation. Furthermore, different NTF were enriched from soil of a vineyard. *D. flagrans* also showed successful growth in the tested soil of the vineyard, so in this environment NTF would be applicable for biological control of nematodes.

2. Einleitung

Nematoden sind mit Schätzungen von $4,5 \times 10^{20}$ Individuen die am häufigsten vorkommenden Tiere auf der Erde (Hoogen et al., 2019). Von den bisher über 28.000 beschriebenen Arten sind 16.000 einem parasitären Lebensstil an Pflanze, Tier oder Mensch zuzuordnen, wobei der weltweite finanzielle Verlust durch pflanzenparasitäre Nematoden auf über 100 Mrd. USD pro Jahr geschätzt wird (Chitwood, 2003; Degenkolb & Vilcinskas, 2016; Kiontke & Fitch, 2013; Nicol et al., 2011). Obwohl chemische Nematizide verfügbar sind, stellen sie ein schwerwiegendes Risiko für Umwelt und den Menschen dar, sodass lediglich eins in Deutschland verfügbar ist (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Liste der zugelassenen Pflanzenschutzmittel in Deutschland, Stand April 2021). Daher muss zur Bekämpfung von Nematoden im Feld oft auf biologische und thermische Verfahren zurückgegriffen werden (Ahmad et al., 2021). Eine Foliendämpfung bei 70 °C entspricht beispielsweise einer chemischen Entseuchung des Bodens und dient als Schutz vor Ertragsausfall, wobei ein erhöhter Arbeits- und Energieaufwand berücksichtigt werden müssen (Eder, 2020). Deshalb werden häufig mehrere Methoden zum langfristigen Nematoden-Management im Feld eingesetzt. Als natürliche Antagonisten von Nematoden bieten daher räuberische Pilze ein großes Potenzial zur biologischen Schädlingsbekämpfung (Haarith et al., 2020; Haarith et al., 2021).

Der Lebensstil von räuberischen Pilzen, die Nematoden als Beute haben, hat sich mehrmals, unabhängig voneinander im Reich der Pilze in den Abteilungen der Ascomyceten, Basidiomyceten und Zygomyceten entwickelt und ist eine Anpassung an stickstoffarme Bedingungen, in denen die Aufnahme von Stickstoff von Beutetieren einen kompetitiven Vorteil über strikt saprotrophe Pilze gibt (Li et al., 2016a; Yang et al., 2012)

Nematoden-fangende Pilze (NFP) sind eine Gruppe nematophager Pilze, die komplexe Fallenstrukturen mit ihren Hyphen entwickeln, um Nematoden zu fangen und anschließend zu verdauen (Jiang et al., 2017; Pramer, 1964; Ulzurrun & Hsueh, 2018). Diese Fallen sind eine bemerkenswerte morphologische Anpassung, die je nach Spezies in Morphologie und Fangmechanismus verschieden ist. Bisher kann man circa 380 Arten den NFP zuordnen, wobei die meisten der Ordnung der Orbiliales (Ascomycota) zuzuordnen sind (Li et al., 2014). Mit Hilfe fossiler Funde wird angenommen, dass sich der räuberische Lebensstil etwa vor 419 Millionen Jahren

vom strikt saprotrophen Lebensstil, kürzlich nach der Entstehung von Nematoden vor circa 550 – 600 Millionen Jahren, getrennt hat (Jansson & Poinar, 1986; Schmidt et al., 2007; Yang et al., 2012). Man kann unterschiedliche Gattungen anhand der Fallentypen unterscheiden. Man unterscheidet zwischen kontraktilem und nicht-kontraktilem Ringen, klebrigen Säulen und Fangknoten, und klebrigen Fallennetzwerken (Su et al., 2015) (**Abb. 1**). Die Nematoden werden durch die Fallen angelockt und je nach Fangmechanismus festgehalten. Nach kurzer Zeit werden die Nematoden paralytisiert und eine Penetrationshyphe durchdringt die Kutikula, sodass der Pilz im Inneren der Beute wächst und diese vollständig verdaut.

Man findet NFP weltweit von tropischen bis hin zu polaren Gebieten (Jiang et al., 2017). Häufig können sie aus den oberen Erdschichten und der Rhizosphäre von Pflanzen isoliert werden (Yang et al., 2020). Dort interagieren sie nicht nur mit den Nematoden, sondern auch mit den Wurzeln, wodurch positive Effekte für die Pflanzen beschrieben werden konnten (Bordallo et al., 2002; Monteiro et al., 2018).

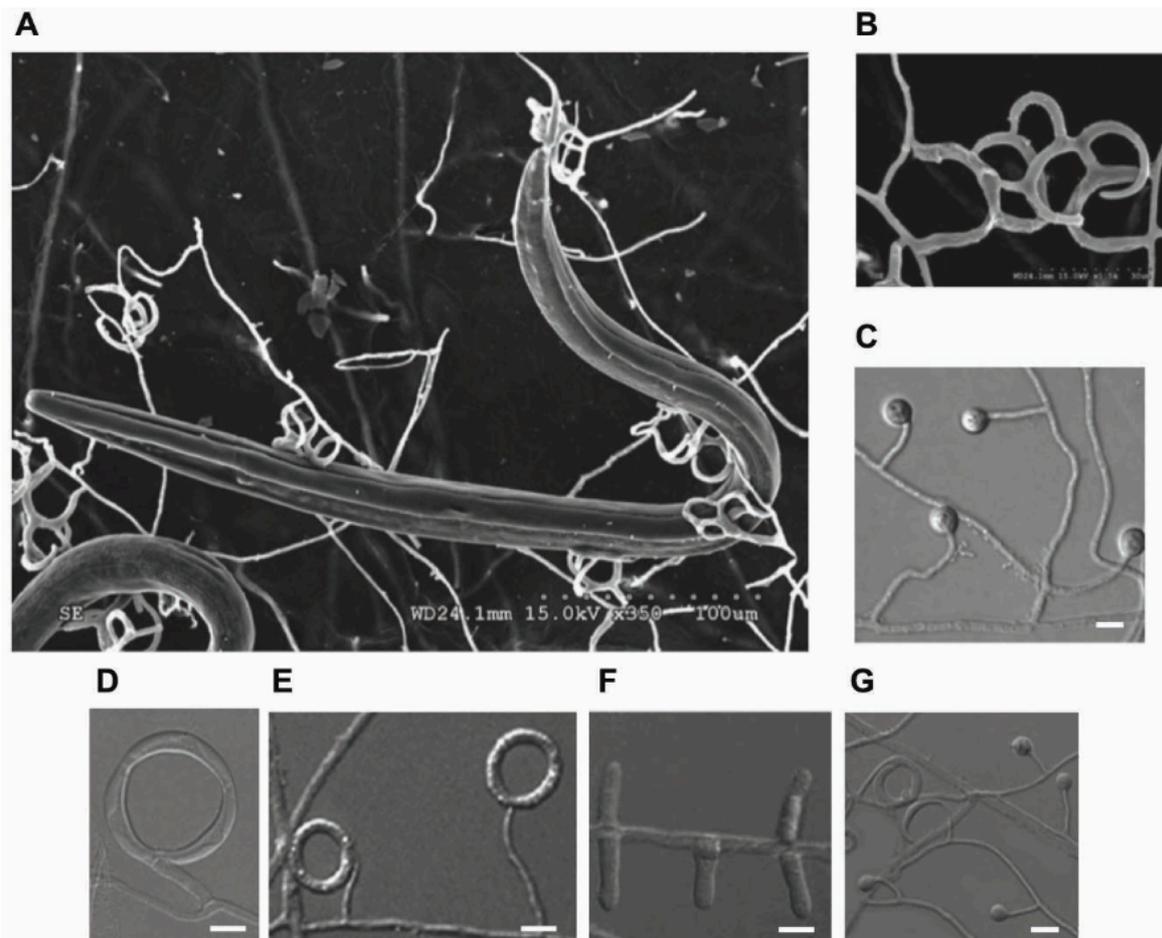


Abbildung 1: Unterschiedliche Fallentypen der NFP: (A + B) Adhäsive dreidimensionale Fallennetzwerke von *Arthrobotrys oligospora*. **(C)** Klebrige Fangknoten von *Monacrosporium elliposporum*. **(D)** Kontraktile Ringfalle von *M. bembicodes*. **(E)** Nicht-kontraktile Ringfalle von *M. lysipagum*. **(F)** Klebrige Säulen von *M. cionopagum*. **(G)** Nicht-kontraktile Ringe und klebrige Fangknoten von *M. candidum*. Maßstabsbalken in C – G 10 µm. Verändert nach (Su et al., 2015).

2.1 Pflanzenparasitäre Nematoden und Anwendung NFP

Es wird geschätzt, dass durch pflanzenparasitäre Nematoden 15 % des globalen Ertrags verloren gehen (Coyne et al., 2018; Oro et al., 2012; Singh et al., 2015; Waele & Elsen, 2007). Bisher sind über 4100 Arten pflanzenparasitärer Nematoden beschrieben (Jones et al., 2013). Alle pflanzenparasitären Nematoden besitzen ein Odontostylet, mit dem sie Wurzelzellen penetrieren können, um sich von diesen zu ernähren (Carter & Wright, 1984) (**Abb. 2 A**). Einige von ihnen bewegen sich als Ektoparasiten in der Erde fort und verwenden die Wurzeln als Nahrungsquelle. Endoparasitäre Nematoden dringen in die Wirtspflanzen ein und können durch die Migration im Gewebe große Schäden verursachen. Eine große Gruppe der endoparasitären Nematoden sind Wurzelgallennematoden der Gattung *Meloidogyne*. Diese dringen in die Wurzeln ein und lösen eine zu Gallen führenden Proliferationsprozess der Zellen aus (Bird, 1974) (**Abb. 2 B**). Als Symptome werden eine reduzierte Fitness der Pflanze, Blattwelken und Chlorosen beobachtet, die oft als Nährstoffmangel oder Dürre-Symptome fehlinterpretiert werden (Mesa-Valle et al., 2020). Die durch Nematoden verursachten physikalischen Schäden führen zur Bildung von Läsionen und nekrotischem Wurzelgewebe, wodurch eine sekundäre Infektion der Pflanze erleichtert wird (Duncan & Moens, 2006). Als Vektoren können Nematoden weiterhin Bakterien- sowie Pilzinfektionen, aber auch Viruskrankheiten auf die Pflanze übertragen (Ethiopia & Beyan, 2019; Garcia et al., 2019; Hajji-Hedfi et al., 2019).

Der ektoparasitäre Nematode *Xiphinema index* ist ein gefährlicher Parasit der Weinrebe (*Vitis vinifera*) und bedroht den Weinbau weltweit (Belval et al., 2019; Jones et al., 2013; Villate et al., 2008). Durch das Verletzen der Wurzelzellen kommt es zur Ausbildung von Wurzelgallen (**Abb. 2 D, E**). Die größten Schäden werden durch *X. index* jedoch verursacht, indem er als Vektor für das Reisivirus (*grapevine fanleaf virus*) dient, und somit die Reisigkrankheit bei Weinreben auslöst (Ghelder et al., 2015; Harris, 1983; Peneva et al., 2012). Die durch Nepoviren verursachte Reisiviruskrankheit verursacht einen verkürzten Abstand zwischen den Knospen, eine verminderte Fruchtqualität und Ertragsverlust (Andret-Link et al., 2004; Rubio et al., 2020) (**Abb. 2F, G**). *X. index* kann in der Erde der Weinberge für viele Jahre ohne das Vorhandensein einer Wirtspflanze überleben, sodass weiterhin eine Virusübertragung möglich ist (Villate et al., 2012). Die höchste Anzahl an Individuen findet man in 40 bis 110 cm Tiefe, sodass eine thermische Behandlung zur Bekämpfung nicht ausreichend ist (Villate et al., 2008). Eine bis zu sieben Jahre lange Brachezeit ist die bis heute

einzig verfügbare direkte Methode zur Bekämpfung von *X. index* im Feld. Weiterhin setzt man auf resistente Rebuterlagen. Die Veredelung der Weinrebe mit Rebuterlagen aus Amerika wird weltweit durchgeführt, um Schäden durch die Reblaus zu verhindern (Schurig et al., 2021).

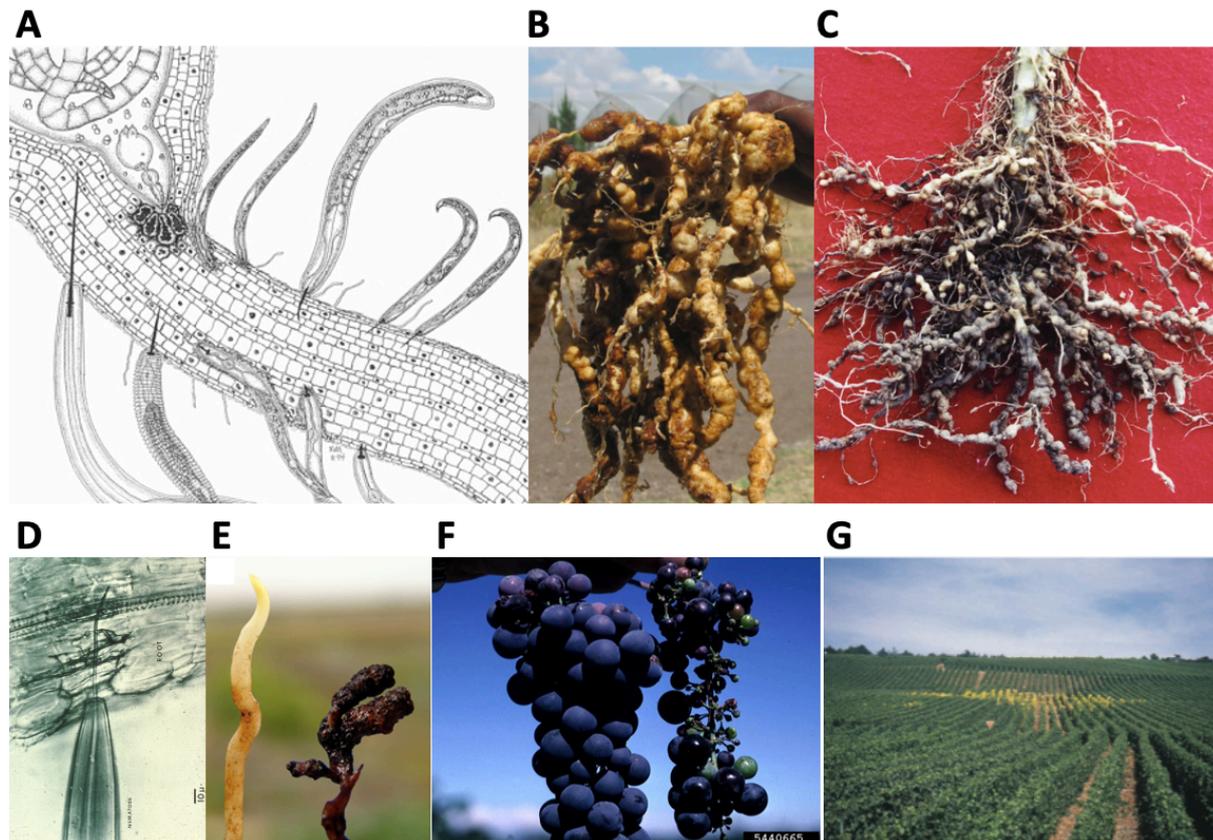


Abbildung 2: Durch pflanzenparasitäre Nematoden verursachte Schäden. (A) Pflanzenparasitäre Nematoden verletzen mit Hilfe eines Mundstachels die Wurzeln. Manche Arten können anschließend als Endoparasiten in das Wurzelgewebe eindringen. (B) Durch den Wurzelgallennematoden *M. incognita* verursachte Schäden an Wurzeln einer Tomatenpflanze. (C) *Nacobbus aberrans* Infektion an Wurzeln einer Tomatenpflanze. (D) Infektion des ektoparasitären Nematoden *X. index* an Wurzeln einer Weinrebe. (E) Durch *X. index* verursachte Symptome zeigen das Anschwellen infizierter Wurzeln (rechts) im Vergleich zu einer gesunden Wurzel einer Weinrebe (links). (F) Die durch *X. index* übertragene Reisigkrankheit verursacht Verrieselung. (G) Durch die Reisigkrankheit verursachten infektiöse Panaschüren sind an gelb verfärbten Blättern im Weinbau zu erkennen und deuten auf einen Infektionsherd hin. Verändert nach (Jones et al., 2013).

Durch klassische Züchtung werden unterschiedliche *Vitis* Arten miteinander gekreuzt, um weitere wünschenswerte Eigenschaften zu generieren (Cui et al., 2019; Ollat et al., 2015). Die *Vitis* Untergattung *Muscadinia* zeigt Resistenzen gegenüber der Reblaus, sowie unterschiedlicher pflanzenparasitärer Nematoden, eignet sich jedoch nicht als wirtschaftlich erfolgreiche Rebuterlage, sodass durch jahrelanges Kreuzen Hybride erstellt werden müssen (Nguyen et al., 2020; Rubio et al., 2020).

Als ökologische und kostengünstige Alternative könnten NFP zur biologischen Schädlingsbekämpfung von Nematoden eingesetzt werden. Der Pilz *Duddingtonia flagrans* zeigt dabei ein großes Potenzial als biologisches Nematizid (Braga et al.,

2020; Hernández et al., 2016; Monteiro et al., 2018; Silva et al., 2013; Silva et al., 2014; Silva et al., 2015). Der Pilz bildet dreidimensionale klebrige Fallennetzwerke aus, um Nematoden zu fangen (**Abb. 3**). Unter Laborbedingungen bildet der Pilz neben den normalen Konidiosporen auch resistente Chlamydosporen aus, die im schon bestehenden Wettbewerb der Mikrofauna des Anwendungsbereichs dem Pilz Vorteile verschaffen (Burgess, 1998; Burgess & Jones, 2011). Der Pilz wird bisher hauptsächlich zur Bekämpfung von Nematodenbefall bei Tieren eingesetzt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass dem Futter beigemischte Pilzsporen den Befall verminderten (Grønvold et al., 1993; Rodrigues et al., 2017). Die Chlamydosporen passieren durch ihre Widerstandsfähigkeit den Darmtrakt des Tieres und werden ausgeschieden. Sie können bei Körpertemperatur nicht auskeimen und schädigen somit das Tier nicht. Die Sporen keimen daher erst im Kot des Tieres aus. Die Entwicklung der Nematodeneier findet hauptsächlich im Kot der Tiere statt und stellt damit einen Herd für die Reinfektion des Wirts dar (Tunlid & Ahrén, 2011). Über die Zeit kann es durch den Pilz zu einer Verminderung des Nematodenbefalls kommen. Das Forschungsinstitut für Biologischen Landbau (FiBL) hat vor kurzem die Verwendung von *D. flagrans* zur biologischen Schädlingsbekämpfung in der Tierzucht patentiert (WO2017125468 A1).

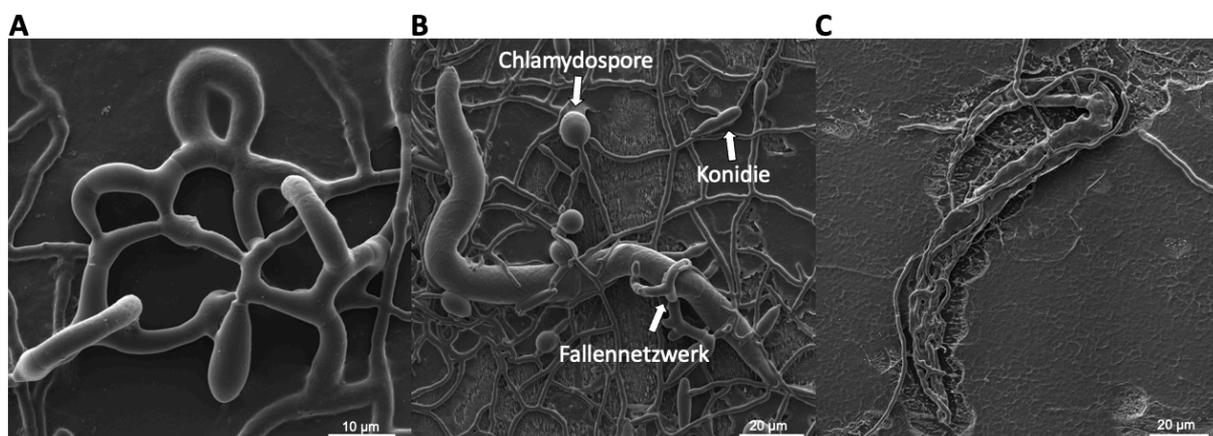


Abbildung 3: Der räuberische Lebensstil von *D. flagrans*. (A) Klebriges dreidimensionales Fallennetzwerk von *D. flagrans*. Innerhalb zwei Stunden ist eine Ringfalle gebildet. (B) Gefangene *C. elegans* Larve. Die Pfeile zeigen gebildete Chlamydosporen, Konidien und Fallennetzwerke des Pilzes. (C) Eine durch den Pilz vollständig verdaute *C. elegans* Larve. Innerhalb fünf Stunden ist eine *C. elegans* Larve vollständig mit Ernährungshyphen kolonisiert und verdaut. Verändert nach (Youssar et al., 2019).

Erste Versuche mit Topfkulturpflanzen und in Gewächshäusern zeigen das Potenzial der NFP. So wurde beispielsweise *A. oligospora* erfolgreich verwendet, um *M. incognita* Befall an Tomatenpflanzen zu reduzieren (Soliman et al., 2021). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Pflanzenwurzeln durch *A. oligospora* kolonisiert werden, und dadurch die Interaktion mit endophytischen Pilzen vergleichbar ist

(Bordallo et al., 2002). Auch Versuche mit *D. fragrans* und Tomatenpflanzen zeigten einen positiven Effekt des Pilzes auf das Wachstum der Pflanze. Durch die Co-Kultivierung kam es bei den Pflanzen zu einer erhöhten Aufnahme von Nährstoffen (Monteiro et al., 2018). Diese Beobachtungen stellen eine Grundlage für die Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden durch NFP dar.

2.2 Lebenszyklus Nematoden-fangender Pilze

Falleninduktion

Die Fallenbildung ist als morphologische Differenzierung mit einem erhöhten Energiebedarf verbunden und stellt daher eine größere Investition des Pilzes dar, die gut auf aktuelle Umwelteinflüsse abgestimmt werden muss. Daher wird die Fallenbildung der meisten NFP Arten nur durch spezifische Signale induziert (Dijksterhuis et al., 1994). Jedoch ist eine nährstoffarme Umgebung und Stickstoffmangel eine grundlegende Voraussetzung zum Wechsel von strikt saprotrophem Wachstum zu einem räuberischen Lebensstil (Ulzurrun & Hsueh, 2018). Die direkte Präsenz von Nematoden induziert am stärksten die Fallenbildung. In frühen Studien der 1950er und 1970er Jahren wurde beschrieben, dass Nematodenextrakt und Kulturfiltrat (Nemin), sowie bestimmte Aminosäuren und Dipeptide wie Phenylalanin-Valin die Fallenbildung in *A. oligospora* auslösten (Nordbring-Hertz, 2004; Pramer & Stoll, 1959). Kürzlich wurde gezeigt, dass konservierte Signalmoleküle von Nematoden, die normalerweise zur Differenzierung oder als Sexualpheromone fungieren, von NFP wahrgenommen werden und Fallen-induzierende Eigenschaften besitzen (Hsueh et al., 2013). Diese sogenannten Ascaroside sind Glycolipide, und bestehen aus dem Zucker Ascarylose, der an eine Seitenkette einer Fettsäure gebunden ist (Panda et al., 2017; Pungalija et al., 2009). Diese werden auf bisher noch unbekannte Weise von NFP unter nährstoffarmen Bedingungen wahrgenommen und induzieren die Fallenbildung.

Auch Bakterien sind in der Lage, die Fallenbildung in einigen NFP auszulösen. Kürzlich wurde die Funktionsweise aufgedeckt, wie Bakterien, die als Beute bacteriophorer Nematoden dienen, Harnstoff sekretieren und als Abwehrmechanismus NFP rekrutieren (Wang et al., 2014). Der Harnstoff wird als Signalmolekül innerhalb *A. oligospora* in Ammonium umgewandelt und induziert die Fallenbildung (**Abb. 4 A**). Des Weiteren wurden von Bakterien der Gattungen

Stenotrophomonas und *Rhizobium* sekretierte Diketopiperazine als Auslöser der Fallenbildung in *A. oligospora* identifiziert (Li et al., 2016b). Kulturüberständen der Bakteriensuspensionen enthielten die Peptide und waren ausreichend, die Fallenbildung zu induzieren. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass lediglich der direkte Kontakt von Bakterien der Gattung *Chryseobacterium* und *A. oligospora* die Fallenbildung im Pilz induzieren (Li et al., 2011). Die verursachenden Signalmoleküle konnten dabei nicht identifiziert werden.

Anlockung

NFP sind in der Lage, ihre Beute anzulocken. So wurde gezeigt, dass *A. oligospora* mehrere flüchtige, organische Geruchsstoffe produziert, die Nematoden anlocken, indem sie olfaktorische Reize von Nahrung imitieren (Hsueh et al., 2017). Genetische Studien in *C. elegans* zeigten, dass die Anlockung durch olfaktorische Neuronen und möglicherweise durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird (**Abb. 4 B**).

Penetration, Verdau und Nährstoffaufnahme

Unterschiedliche Arten NFP haben verschiedenste Fangmechanismen entwickelt, um ihre Beute in der Falle festzuhalten. Mechanische Fallen bestehen aus kontraktile Zellen, die sich aktiv bei Kontakt mit der Beute zusammenziehen, oder aus Ringschleifen, in denen die Beute hängen bleibt (**Abb. 1**).

Wenn Nematoden in einer Falle gefangen sind, werden sie innerhalb ein bis zwei Stunden paralytisch, bevor der Pilz die Kutikula mit Hilfe mechanischen Drucks und lytischer Enzyme penetriert. Nachdem die Penetrationshyphe das Innere der Beute erreicht hat, schwillt sie zu einem runden Infektionsbulbus an. Neue Ernährungshyphen werden vom Bulbus geformt und kolonisieren den Nematoden. Durch die Sekretion hydrolytischer Enzyme wie Serinproteasen und Kollagenasen werden schließlich Nährstoffe absorbiert. In wenigen Stunden werden Nematoden dadurch vollständig kolonisiert und verdaut (Braga et al., 2012; Cruz et al., 2015).

Molekulare Mechanismen

Molekulare Mechanismen des Wechsels von saprotrophem zum räuberischen Lebensstil sind bisher noch nicht gut verstanden, bilden jedoch ein Fundament für eine sichere und erfolgreiche Anwendung der Pilze in der Landwirtschaft. Seit 2011 wurden

die Genome von *A. oligospora* (Yang et al., 2011), *Dactylellina haptotyla* (Meerupati et al., 2013) und *Drechlerella stenobrocha* (Liu et al., 2014) sequenziert, sodass molekulare Analysen und Vergleiche an den dreidimensionalen Fallennetzwerken, klebrigen Säulen, und kontraktile Ringfallen möglich sind. Innerhalb der Fallen findet eine differentielle Genexpression im Vergleich zu den vegetativen Hyphen statt. So konnte gezeigt werden, dass 23 % der Gene in *D. haptotyla* eine veränderte Expression in den Fallen besaßen (Ahrén et al., 2005).

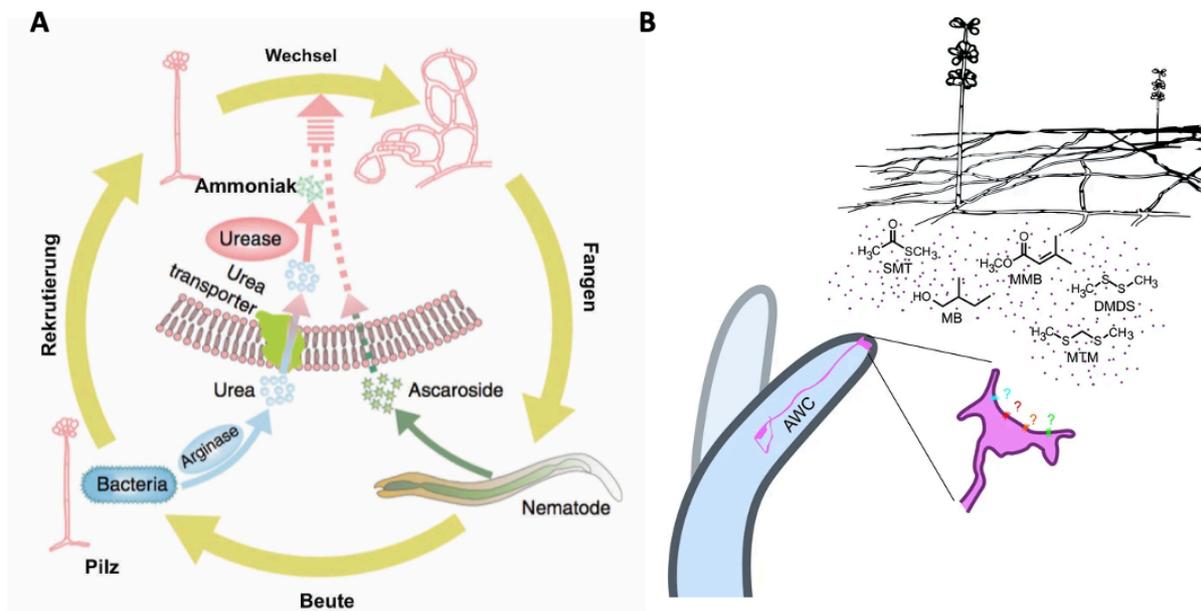


Abbildung 4: Interspezies Kommunikation zwischen NFP, Nematoden und Bakterien. (A) Vorgesprochenes Modell, wie Bakterien Harnstoff sekretieren, um sich vor bakteriophoren Nematoden zu schützen. Bei Kontakt mit Nematoden wird durch Arginase vermehrt Harnstoff gebildet. Durch ein membrangebundenes Transportprotein nimmt *A. oligospora* Harnstoff in die Zellen auf, welches durch das Enzym Urease Ammoniak freisetzt und den Wechsel hin zu zum räuberischen Wachstum induziert. Nematoden sekretieren Ascaroside, die auf bisher unbekannte Weise durch NFP wahrgenommen werden, und die Fallenbildung induzieren. **(B)** *A. oligospora* produziert flüchtige organische Duftstoffe, die Essensreize nachahmen und dadurch *C. elegans* durch die Signalweiterleitung des AWC Neurons anlocken. Verändert nach (Hsueh et al., 2017; Wang et al., 2014).

Dabei kam es zur veränderten Expression in Genen, die eine Rolle bei der Zellpolarität, Stressantwort, Proteinsynthese und Degradation, so wie im Kohlenstoff-Metabolismus spielen. Transkriptomanalysen in *A. oligospora* identifizierten 261 hochregulierte und 682 herunterregulierte Transkripte beim Kontakt mit Nematoden (Chen et al., 2020).

Erste molekulare Analysen zeigten, dass Gene bestimmter Signalwege essenziell für die Fallenbildung in *A. oligospora* sind. So wurde gezeigt, dass die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Sit2 (MAK-1, Signalweg der Zellwandintegrität) (Zhen et al., 2018) sowie Fus-3 (MAK-2, Pheromonwahrnehmung) (Chen et al., 2020) essenziell für den Wechsel zum räuberischen Lebensstil sind. Weiterhin werden ein pH-wahrnehmender Rezeptor PalH (Li et al., 2019) und eine

NADPH-Oxidase NoxA (Li et al., 2017), die in Signalantworten von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt ist, für den Wechsel des Lebensstils benötigt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Beta-Untereinheit des G-Proteins Gpb1 und die MAPK Hog1 für den Wechsel in *A. oligospora* benötigt werden, wobei die *gpb1*-, beziehungsweise *hog1*-Gendeletionsmutanten eine verminderte Fallenmenge nach Induktion durch den Nematoden *Caenorhabditis elegans* im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Kuo et al., 2020; Yang et al., 2020). Neben Gendeletionen wurden kürzlich weitere genetische Methoden in NFP etabliert, um auch die noch unbekanntes Zellbiologie der Fallenmorphogenese zu untersuchen. So wurden in einer zufälligen Mutagenese 15 *A. oligospora* Mutanten mit Defekten in der Fallenmorphogenese aus insgesamt über 5500 mutagenisierten Klonen identifiziert (Huang et al., 2020). *Next generation sequencing* Methoden ermöglichen zwar die Identifizierung der Mutationen, jedoch führen weitere Hintergrundmutationen und Heterokaryonbildung zu Schwierigkeiten bei der anschließenden Analyse und Zuordnung der Phänotypen. Der sexuelle Zyklus von NFP konnte unter Laborbedingungen noch nicht induziert werden, sodass die genetische Methode des Rückkreuzen hier noch nicht möglich ist. Dadurch erschweren Hintergrundmutationen die Analysen.

Fallenmorphogenese

Die Fallen unterscheiden sich stark vom restlichen vegetativen Myzel. Die Hyphen besitzen einen breiteren Durchmesser und besitzen eine Vielzahl runder, zytosolischer Organellen, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen einen starken Kontrast aufweisen (*electron dense bodies*) und mit der Infektion der Nematoden in Verbindung gebracht werden (Dijksterhuis et al., 1994). Adhäsive Fallen sind umgeben von einer extrazellulären, klebrigen Schicht, die wichtig für die Adhäsion an der Nematodenoberfläche ist (Nordbring-Hertz, 1972; Tunlid et al., 1991).

Dreidimensionale Fallennetzwerke von *A. oligospora* oder *D. flagrans* sind das Ergebnis vieler Zellfusionen. Die Entwicklung beginnt, indem eine Hyphenverzweigung von einer basalen Hyphe entsteht. Diese Verzweigung krümmt sich jedoch während des Wachstums, um circa 20 – 30 µm entfernt von der Austrittsstelle erneut mit der basalen Hyphe zu fusionieren, wodurch eine Ringfalle entsteht. Ausgehend von diesem Ring entstehen weitere Hyphenverzweigungen, die sich zu Ringfallen entwickeln und schlussendlich ein dreidimensionales Fallennetzwerk ausbilden. Eine Ringfalle besteht dabei meistens aus drei bis vier Kompartimenten und wird innerhalb

von einer bis zwei Stunden gebildet. Die Fallenbildung und der Ringschluss durch Zellfusion sind faszinierende Phänomene und benötigen vermutlich ein koordiniertes Zusammenspiel verschiedener Signalkaskaden und der interagierenden Zellen. Welche Signale die Wachstumsrichtung und Zellfusion regulieren, sind bisher unbekannt.

2.3 Kommunikation und Zellfusion

In multizellulären Organismen können zwei Zellen miteinander fusionieren, um größere, multinucleäre Zellen zu generieren, die schlussendlich Organe, Muskeln, Knochen oder die Plazenta bilden (Aguilar et al., 2013). Im Reich der Pilze wird die somatische Zellfusion (Anastomose) für verschiedene Entwicklungszwecke eingesetzt. Sie erhöht die Vernetzung eines Pilzmyzels, um die Stabilität zu erhöhen, aber auch Nährstoffe innerhalb des Myzels effizienter auszutauschen (Nagy et al., 2020). Es wurde gezeigt, dass die Hyphenfusion für die Virulenz pathogener Pilze, sowie Kolonisierung symbiontisch-lebender Pilze notwendig ist (Charlton et al., 2012; Craven et al., 2008).

Als Grundvoraussetzung für eine vegetative Fusion ist das gegenseitige Erkennen und Kommunizieren der Fusionspartner. In filamentösen Pilzen ist dieser Prozess am besten in den Modellorganismen *Neurospora crassa* und *Sordaria macrospora* untersucht (Fischer & Glass, 2019; Teichert et al., 2020). Da es sich bei einer vegetativen Zellfusion um genetisch identische Fusionspartner handelt, muss ein Kommunikationssystem verwendet werden, welches auf dem Wechsel physiologischer Zustände beruht, um die Selbststimulation der Zelle durch ein sendendes Signal zu verhindern. In *N. crassa* wurden bisher über 70 Gene identifiziert, die für die Fusion von Keimlingen, beziehungsweise Hyphen essenziell sind (**Abb. 5**).

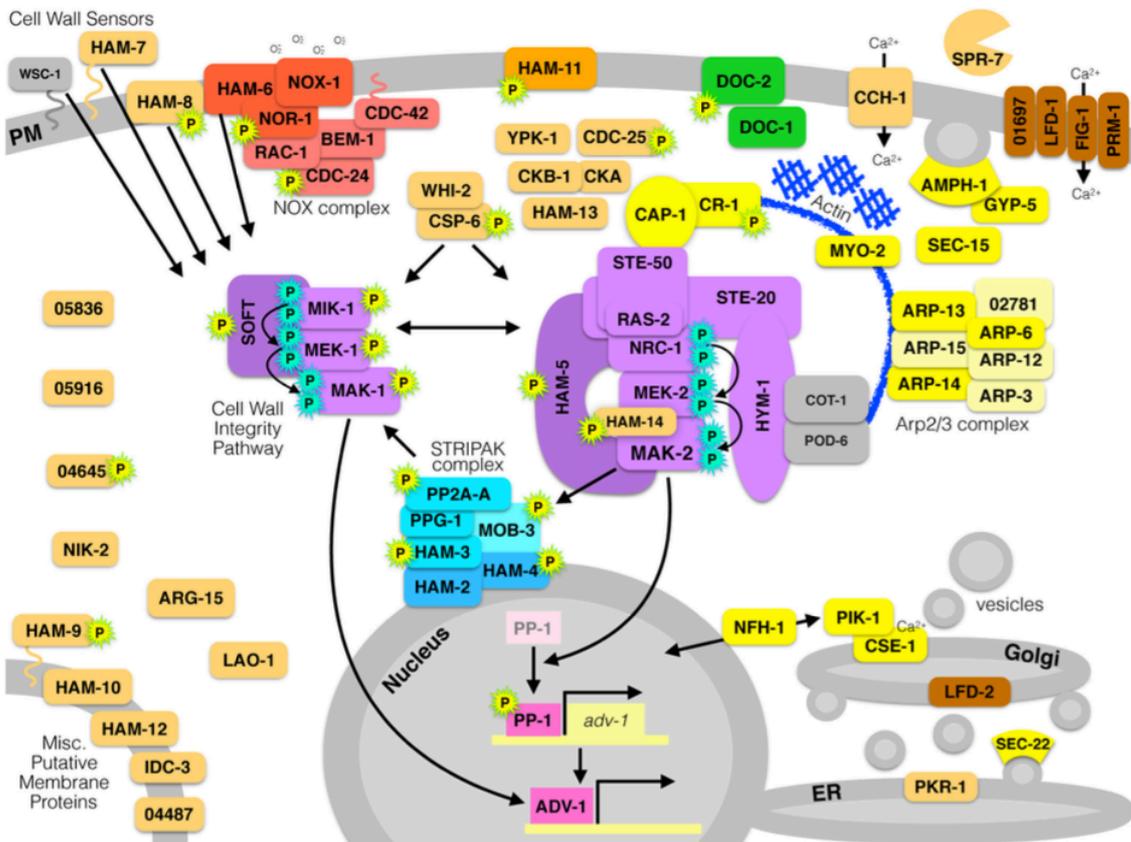


Abbildung 5: Darstellung aller bisher bekannten Signalwege und beteiligte Proteine bei der Zell-Zell Kommunikation in *N. crassa*. Lila markierte Proteine sind an den zwei MAPK Signalwegen der Zellwandintegrität/MAK-1, oder der orthologen Pheromonwahrnehmung/MAK-2 beteiligt. Blaue Proteine sind Untereinheiten des STRIPAK Komplexes. Rote Proteine sind Komponenten des NOX Komplexes, der Superoxid durch die Reduktion von NADPH und Oxidation von Sauerstoff produziert. Grüne Proteine sind in der Fremderkennung involviert. Pinke Proteine sind Transkriptionsfaktoren. Braune Proteine sind bei der Membranfusion beteiligt. Gelbe Proteine sind beim Vesikeltransport, Endo- und Exozytose, Sekretion und Aktindynamiken beteiligt. Orangene Proteine sind entweder nicht charakterisiert, oder haben eine bisher unbekannt Funktion. Graue Proteine sind wichtig, aber entbehrlich für die Zell-Zell-Kommunikation, oder Fusion. Proteine mit Cyan P-Markierung werden durch eine MAPK-Kaskade phosphoryliert. Proteine mit gelber P-Markierung werden MAK-2-abhängig phosphoryliert. Verändert nach (Fischer & Glass, 2019).

Während notwendige Signalmoleküle und Rezeptoren für die chemotrope Interaktion noch nicht identifiziert wurden, konnten weitläufige interzelluläre Signalnetzwerke identifiziert werden, die die Zell-Zell Kommunikation vermitteln.

Ein vorgeschlagenes Zelldialog-Modell beschreibt, wie zwei interagierende Fusionspartner miteinander kommunizieren, indem sie koordiniert zwischen zwei physiologischen Zuständen hin und her wechseln (Fleissner et al., 2009; Serrano et al., 2018). Während sich eine Zelle im Signal-sendenden Zustand befindet, ist die andere im Signal-empfangenden Zustand. Die Koordination der Zustände erfolgt dabei bereits bevor physischer Zellkontakt besteht und ist vergleichbar mit einem Dialog. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass in *N. crassa* zwei MAPK-Signalwege (MAK-1 und MAK-2), NADPH-Oxidasekomplexe und der *striatin interacting phosphatases and kinase* (STRIPAK) Komplex essenziell für die Signalverarbeitung

sind (Daskalov et al., 2017). Keimlinge und vegetativen Hyphen von Gendelektionsmutanten dieser Signalwege konnten sich nicht mehr erkennen, und die Fusion blieb aus (Dettmann et al., 2013; Fu et al., 2011; Fu et al., 2014; Jonkers et al., 2014).

Die zwei physiologischen Zustände der kommunizierenden Zellen sind durch eine abwechselnde Rekrutierung der Proteine MAK-2 und Soft (SO) an die Plasmamembran gekennzeichnet (**Abb. 6**). Während MAP-Kinasen in eukaryotischen Organismen hoch konserviert sind und an der Signalweiterleitung extrazellulärer Signale beteiligt sind, ist das SO-Protein lediglich in Ascomyceten zu finden (Fleißner et al., 2005). Über die molekularen Funktionen von SO-orthologen ist bisher nur wenig bekannt (Teichert et al., 2014). Während der Keimlingsfusion in *N. crassa* akkumulieren beide Proteine an der Membran der wachsenden Zellspitzen in einer Phase von 6 bis 12 Minuten, bis physischer Kontakt hergestellt und die Zellfusion eingeleitet wird. Die Membranrekrutierung von MAK-2 und SO erfolgt dabei exakt gegenphasig, und stellt eine Koordination der Zellen über eine Distanz dar. Auch im vegetativen Myzel kann das koordinierte Wachstum und die dynamische Lokalisation der Proteine beobachtet werden (Serrano et al., 2018). Rezeptoren oder Signalmoleküle für die Wahrnehmung konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Mathematischer Modellierungen zeigen jedoch, dass die koordinierte Zellfusion genetisch identischer Zellen mit lediglich einem Signalmolekül und Rezeptor möglich wäre, und Selbststimulation durch ein sendendes Signal vermeiden würde (Goryachev et al., 2012; Read et al., 2012). Bisher ist es jedoch nicht geklärt, ob das System auch in anderen filamentösen Pilzen konserviert ist.

Nachdem interagierende Zellen physikalischen Kontakt hergestellt haben, wird die Zellfusion eingeleitet. Die Zellwand und Plasmamembran werden umgebaut, um schließlich die Zytoplasmen der Fusionspartner zu vermischen. An Kontrollpunkten wird Fusion mit genetisch ähnlichen Zellen gewährt, und Fusion mit genetisch verschiedenen Zellen blockiert. Falls zwei genetisch verschiedene Zellen miteinander fusionieren, wird durch einen Nicht-Selbsterkennungs-Kontrollpunkt nach der Fusion ein Zelltod induziert. Die Identität wird durch Heterokaryon-Inkompatibilitäts-Loci (*het*) vermittelt (Daskalov et al., 2017; Daskalov et al., 2020).

Während der Zelltod augenscheinlich einen Nachteil darstellt, verhindert er das Ausbreiten von Mykoviciden und Betrügergenotypen innerhalb des Pilzmyzels (Glass et al., 2004; Grum-Grzhimaylo et al., 2021).

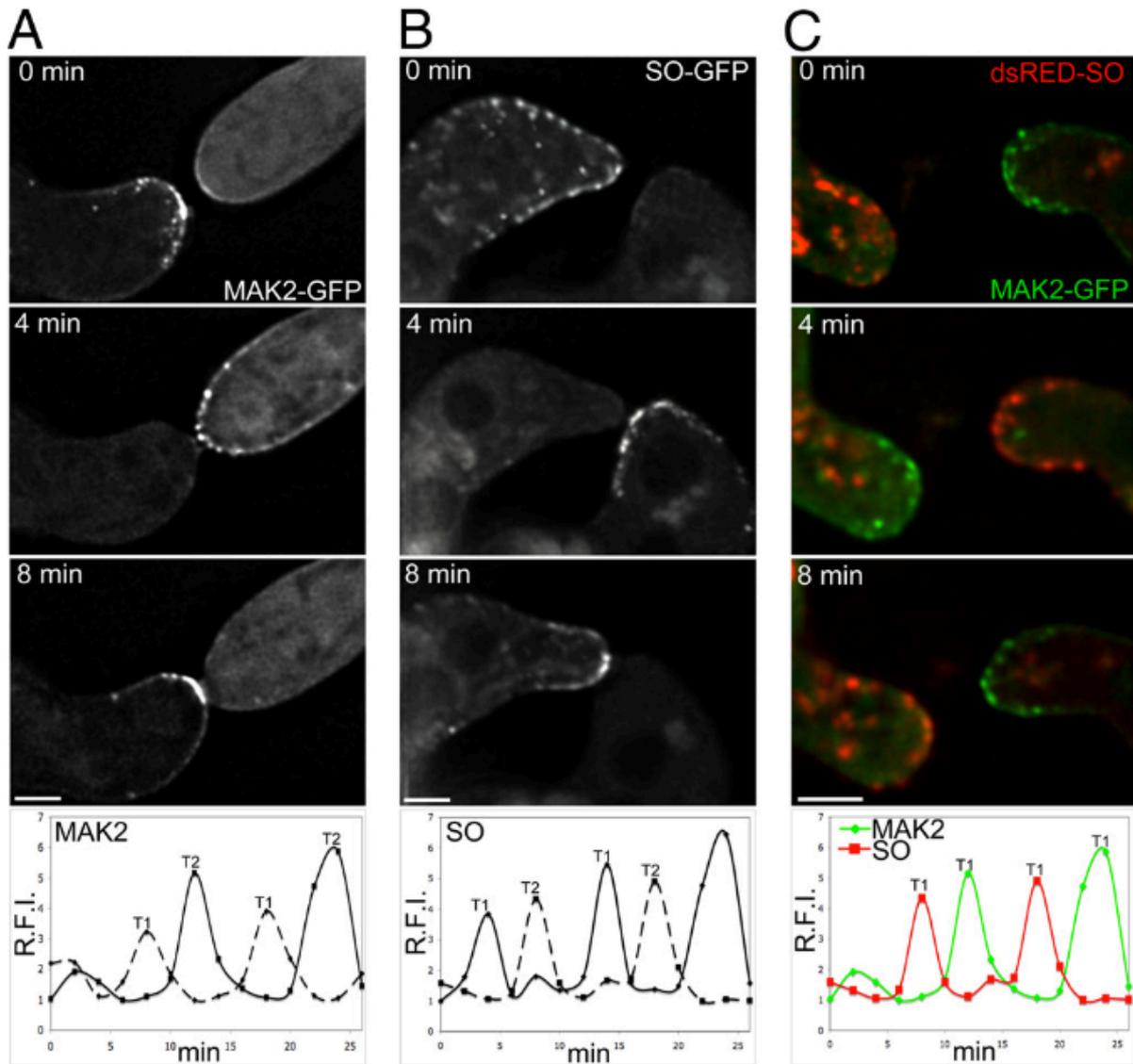


Abbildung 6: MAK-2 und SO werden alternierend an die Plasmamembran interagierender *N. crassa* Keimlinge rekrutiert. (A) Rekrutierung von MAK-2-GFP an der Zellspitze zweier fusionierender Keimlinge. Die Oszillation in beiden Keimlingen erfolgt gegenphasig. **(B)** Rekrutierung von SO-GFP an der Zellspitze zweier fusionierender Keimlinge. Die Oszillation in beiden Keimlingen erfolgt gegenphasig. **(C)** MAK-2-GFP und dsRED-SO zeigen eine exakt gegenphasige Rekrutierung an der Keimlingsspitze. T1 = Keimling 1; T2 = Keimling 2. Die x-Achse zeigt die Zeit in Minuten an. Die y-Achse zeigt die relative Fluoreszenzintensität (R.F.I.) an der Plasmamembran an. Maßstabsbalken: 2 μ m. Verändert nach (Fleissner et al., 2009).

2.4 Soft Orthologe in filamentösen Pilzen

Hyphal anastomosis mutant 1 (ham-1) war die erste identifizierte Zellfusionsmutante in *N. crassa* (Wilson & Dempsey, 1999). Das korrespondierende Gen wurde aufgrund des Wachstumsphänotyps *soft (so)* benannt. Seitdem konnte gezeigt werden, dass das Soft Protein essenziell für die Zellfusion in vielen filamentösen Pilzen wie *N. crassa*, *S. macrospora*, *Aspergillus oryzae*, *Epichloe festucae*, oder *Zymoseptoria tricii* ist (Charlton et al., 2012; Fleißner & Glass, 2007; Francisco et al., 2020; Huang et al., 2013). Das Protein ist in der Gruppe der Pezizomycotina hoch konserviert, und keine Orthologen konnten in anderen Organismen, sowie in Basidiomyceten oder Hefen identifiziert werden. Neben der Rekrutierung an die Plasmamembran während der Zell-Zell Kommunikation, konnten weitere Lokalisationen des Proteins identifiziert werden. So bilden sich beispielsweise SO-Aggregate an der Septumspore bei Verletzungen der Hyphen, um übermäßigen Verlust von Zytoplasma zu vermeiden: eine Funktion, die der des Woronin Körpers ähnelt (Maruyama et al., 2010; Steinberg et al., 2017). Woronin Körper sind von Peroxisomen abstammende Organelle, deren Hauptfunktion das Verschließen der Septumspore bei Verletzung der Hyphe ist. Das *Aspergillus oryzae* SO-homologe AoSO akkumuliert an der Septumspore als Antwort auf unterschiedliche abiotische Stressoren, wie zum Beispiel hohe und niedrige Temperatur, stark sauer oder alkalischer pH-Wert, sowie Stickstoff- und Kohlenstoffmangel. Dies deutet darauf hin, dass AoSO weitere Funktionen besitzt, die mit der interzellulären Weiterleitung von Stress in Verbindung gebracht werden. SO-orthologe sind große Proteine, die aus 1200 bis 1300 Aminosäuren bestehen und eine konservierte WW-Domäne besitzen. Die Domäne besitzt zwei konservierte Tryptophanreste (abgekürzt mit „W“), und führt zu Protein-Protein-Wechselwirkungen. Es konnte gezeigt werden, dass das *S. macrospora* orthologe PRO40 als Gerüstprotein für die Interaktion der Proteinkinase C (PKC) und den MAPK MIK1 und MEK1 des Zellwandintegritäts-Signalwegs ist (Teichert et al., 2014). In *A. oryzae* konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus zwischen Aminosäuren 556 und 1146 für die stressinduzierte Akkumulation von AoSO an der Septumspore ausreichend ist (Tsukasaki et al., 2016) (**Abb. 7**). Das vollständige Protein war jedoch notwendig für erfolgreiche Zell-Zell-Kommunikation.

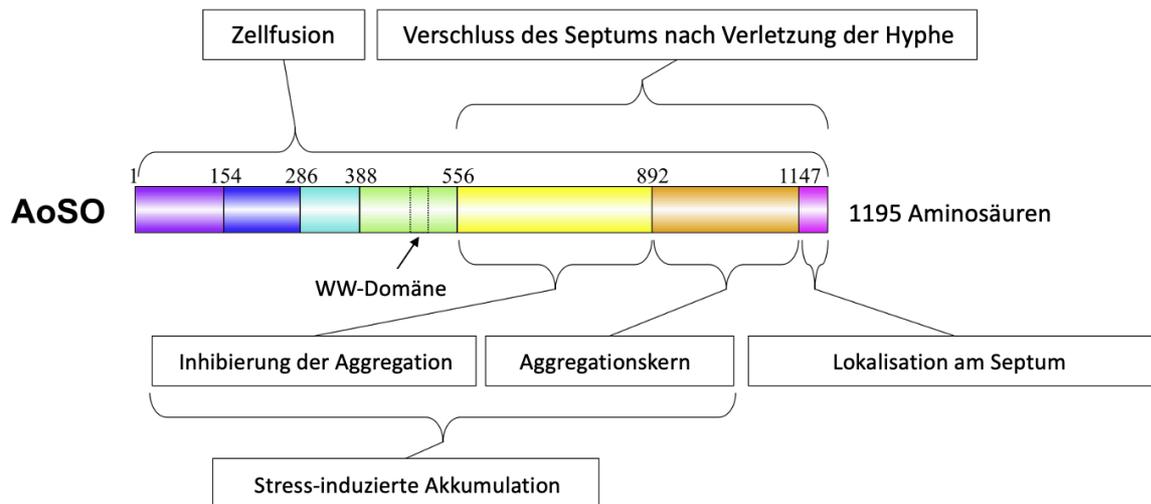


Abbildung 7: Schematisches Modell des *A. oryzae* AoSO mit Funktionen der einzelnen Regionen. In *A. oryzae* ist das vollständige AoSO Proteine für erfolgreiche Zellfusionen notwendig. Der C-Terminus ist für eine Stress-induzierte Akkumulation an der Septumspore ausreichend. Die WW-Domäne vermittelt Protein-Protein Wechselwirkungen. Verändert nach (Tsukasaki et al., 2016).

2.5 *striatin interacting phosphatases and kinases* (STRIPAK) Komplex

Ein faszinierendes Phänomen der Fallenbildung ist die Fähigkeit der Falle, nach kurzer Zeit sich zu krümmen, um schließlich mit der basalen Hyphe zu fusionieren. Dieses frühe Stadium der Fallenbildung ähnelt dem spiralförmigen Wachstum von Ascogonien oder der Crozier-Bildung von Ascomyceten (Read & Beckett, 1996). Die Crozier-Bildung trägt dazu bei, einen dikaryotischen Zustand im Ascogonium aufrechtzuerhalten, und die weitere Entwicklung des Ascus fortgesetzt wird (Coppin et al., 1997). Während der Entwicklung verlängert sich eine Hyphe des Ascus und krümmt sich zu einer hakenförmigen Struktur. Im filamentösen Pilz *S. macrospora* hat ein genetisches Screening viele „pro“ Mutanten identifiziert, die durch einen Entwicklungsstillstand im Protoperithezien- und Perithezienstadium während der sexuellen Entwicklung gekennzeichnet sind. Dabei stellte sich heraus, dass mehrere PRO-Proteine Bestandteile des *striatin interacting phosphatases and kinases* (STRIPAK) Komplex sind (Pöggeler & Kück, 2004).

Der STRIPAK Komplex ist ein hoch konservierter eukaryotischer Signalkomplex, der für die Regulation zahlreicher zellulärer und Entwicklungsprozesse verantwortlich ist. Ursprünglich wurde er in Säugetieren durch Affinitätsaufreinigung/ Massenspektrometrie identifiziert (Goudreault et al., 2009). Mehrere Krankheiten wie Alzheimer, Diabetes und Herzerkrankungen werden in Verbindung mit dem STRIPAK Komplex gebracht (Hwang & Pallas, 2014; Shi et al., 2016). Vor kurzem wurde die Kristallstruktur des STRIPAK Kerns durch Kryo-Elektronenmikroskopie identifiziert

(Jeong et al., 2021) (**Abb. 8**). Die Serin-Threonin-Phosphatase PP2A besteht aus der Struktureinheit A (PP2A), der katalytischen Untereinheit C (PP2AC), und einer regulatorischen Untereinheit der B''(Striatin)-Familie. Zusätzlich sind mehrere Untereinheiten mit der Phosphatase assoziiert. *Striatin-interacting protein 1* oder 2 (STRIP1/2), *monopolar-spindle one-binder* (Mob) Protein 3 (Mob3), *cerebral cavernous malformation 3* (CCM3), *sarcolemma membrane-associated protein* (SLMAP), *coiled-coil protein suppressor of I κ B kinase- ϵ* (IKK ϵ). Des Weiteren sind weitere *germinal center kinases* (GCKs) mit dem STRIPAK Komplex assoziiert, um die Regulation zu verstärken.

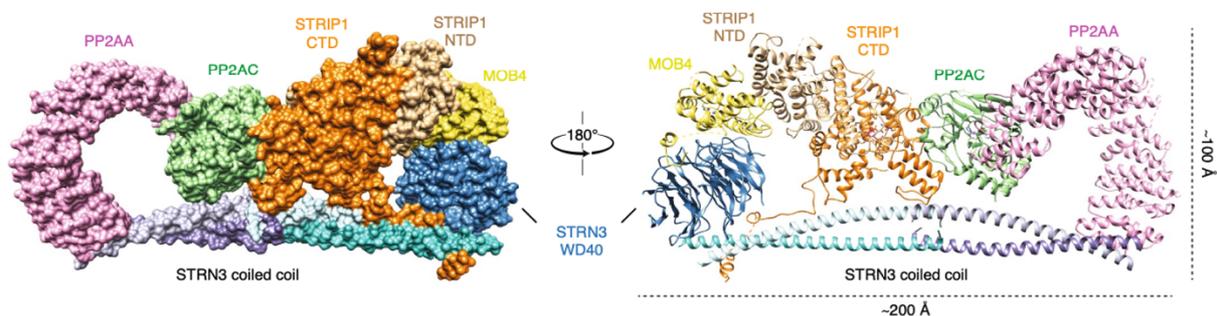


Abbildung 8: Cryo-EM Struktur des menschlichen STRIPAK Kerns. Strukturansicht in Oberflächen (links) und Cartoon (rechts) Ansicht. Die Phosphatase PP2A besteht aus einer strukturellen und katalytischen Untereinheit, mit Striatin als regulatorische Untereinheit. Durch die zusätzlichen Untereinheiten STRIP1/2 und MOB4 wird der Kern des Komplexes aufgebaut. NTD, N-terminale Domäne; CTD, C-terminale Domäne. Verändert nach (Jeong et al., 2021).

Der STRIPAK Komplex ist an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt, wie beispielsweise der Signalübertragung, der Organisation des Zytoskeletts, der Kontrolle des Zellzyklus, Zellmigration, Zellpolarität, Apoptose, Golgi-Assemblierung, Zellmorphologie und Vesikeltransport (Hwang & Pallas, 2014). In *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass der STRIPAK-Komplex durch seine Phosphataseaktivität ein negativer Regulator des zentralen Hippo-Signalwegs ist (Ribeiro et al., 2010). Der STRIPAK Komplex verbindet *upstream* Signale, um die GCKIII MST1/2 Aktivität und Initiierung des Hippo Signalwegs zu aktivieren. Die Deletion von STRIP1/2 resultiert in der Hochregulation von MST1/2, wodurch ausgegangen werden kann, dass STRIPAK MST1/2 reguliert (Bae et al., 2017; Chen et al., 2019). In einem RNA-Interferenz Screening konnte gezeigt werden, dass die STRIP1/2 Orthologen FAM40A und FAM40B die Zellform in *Drosophila* S2-Zellen beeinflussen (Rohn et al., 2011). In einer weiteren Studie mit PC3-Prostatakrebszellen führte ein RNAi-Knockdown von FAM40A zu abgeflachten Zellen mit einem hohen Gehalt an kortikalem filamentösen-Aktin (F-Aktin). RNAi-Knockdown von FAM40B

fürte hingegen zu verlängerten Zellen mit dünnen Zellfortsätzen (Bai et al., 2011). In *Saccharomyces cerevisiae* ist der *factor arrest protein complex* (Far complex) homolog zum STRIPAK Komplex und involviert am Pheromon-induzierten Zellzyklusarrest und der Signalweiterleitung des *target of rapamycin complex 2* (TORC2) (Kemp & Jr., 2003; Pracheil et al., 2012). In *Schizosaccharomyces pombe* ist der *septation initiation network* (SIN) *inhibitory PP2A* (SIP) *complex* homolog zum STRIPAK Komplex und ist negativer Regulator von SIN durch Koordinierung von Mitose und Zytokinese (Simanis, 2015; Singh et al., 2011).

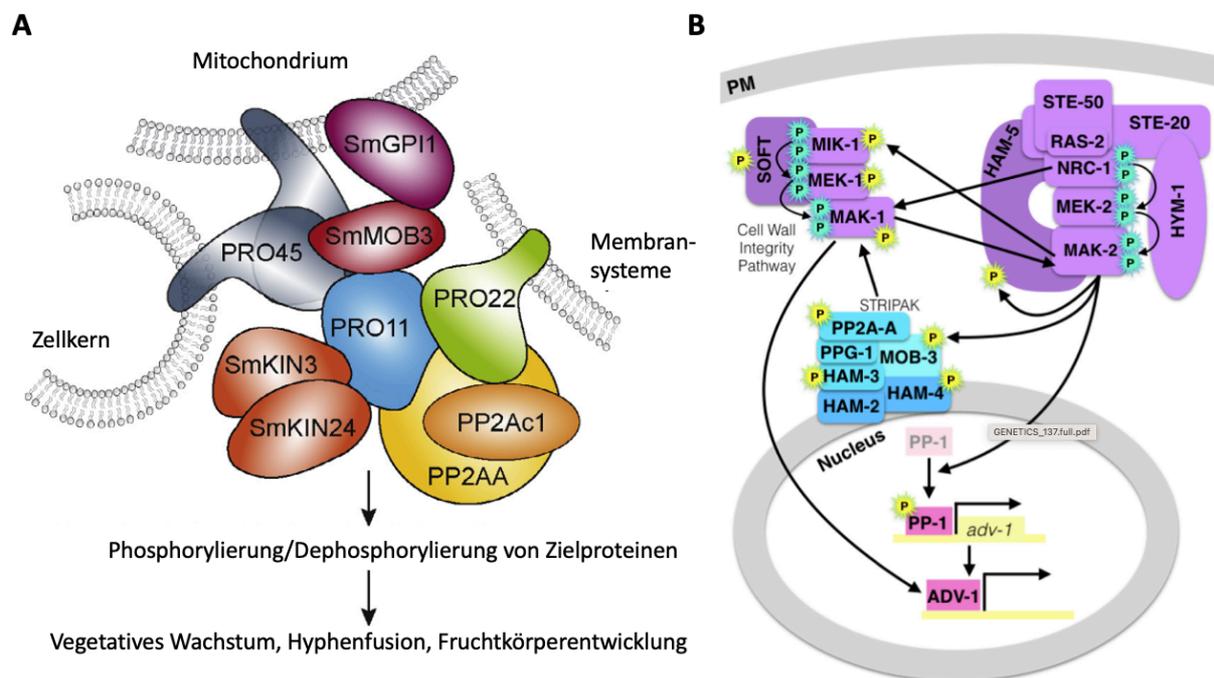


Abbildung 9: Modell des STRIPAK Komplexes in *S. macrospora* und Überschneidung des STRIPAK Signalweges mit der MAK-1 und MAK-2 Signalkaskade in *N. crassa*. (A) PRO45 und PRO22 rekrutieren den STRIPAK Komplex an die Kernmembran, Mitochondrien und weitere Membransysteme. Die Phosphatase PP2A und die assoziierten Kinasen SmKIN3 und SmKIN24 vermitteln Dephosphorylierung und Phosphorylierung von Zielproteinen, wodurch Entwicklungsprozesse reguliert werden. (B) Durch die Vernetzung des STRIPAK Komplexes mit MAPK-Signalkaskaden kommt es zu einem verzweigten Signalnetzwerk. Cyan-P markierte Proteine werden durch MAPK Kaskaden phosphoryliert, gelbe mit P markierte Proteine werden in Abhängigkeit von MAK-2 phosphoryliert. Die Transkriptionsfaktoren PP-1 und ADV-1 werden durch alle drei Signalwege reguliert. Verändert nach (Fischer & Glass, 2019; Kück et al., 2016).

Genanalysen in filamentösen Pilzen haben gezeigt, dass die unterschiedlichen Komponenten des STRIPAK Komplexes für die Zellfusion, sexuelle Entwicklung, Septierung, Produktion von Sekundärmetaboliten, symbiotische Interaktion und Pathogenität erforderlich sind (Elramli et al., 2019; Green et al., 2016; Schmidpeter et al., 2017) (Abb. 9). Durch kürzliche Proteom- und Phosphoproteomanalysen konnte das riesige Signalnetzwerk aufgezeigt werden, das durch den STRIPAK Komplex moduliert wird (Märker et al., 2020; Stein et al., 2020; Stein et al., 2021). Mit Hilfe von *isobaric tags for relative and absolute quantitation* (iTRAQ) wurde das Proteom und

Phosphoproteom potenzieller STRIPAK-Ziele in *S. macrospora* Wildtyp und drei STRIPAK Gendelektionsmutanten analysiert. Insgesamt konnten 4193 Proteine, und 2489 Phosphoproteine identifiziert werden, wobei 781 Phosphoproteine ein verändertes Phosphorylierungsmuster in den drei Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Märker et al., 2020). Ein Zielprotein war beispielsweise GUL1, welches durch die STRIPAK-abhängige differentielle Phosphorylierung die Fruchtkörperentwicklung und Morphogenese reguliert (Stein et al., 2020). Weiterhin wurde die *germinal center kinase* III (GCKIII) SmKIN3 identifiziert (Stein et al., 2021). SmKIN3 ist assoziiert mit dem hoch konservierten *septation initiation network* (SIN) Komplex und an der Septierung von Hyphen beteiligt. Der SIN Komplex ist homolog zum Hippo Signalweg in Säugetieren und wird aus den Proteinen *sterile protein* (STE) Kinase, GCK und einer *nuclear DBF2-related* (NDR) Kinase aufgebaut (Simanis, 2015). Die Funktionen von SIN sind essenziell für die Septierung und Zytokinese (Guertin et al., 2000; Heilig et al., 2013; Radchenko et al., 2018). Die Phosphatase-Aktivität des STRIPAP Komplexes ist abhängig von den einzelnen Untereinheiten. So konnte in *N. crassa* gezeigt werden, dass das Fehlen der PRO11 und PRO22 homologen HAM-2 und HAM-3 das korrekte Assemblieren des Komplexes in der Kernmembran ausblieb (Dettmann et al., 2013). Die Deletion der STRIPAK-Komponente PRO22 (ortholog zu STRIP1/2) führte in *S. macrospora* zu aseptierten Ascogonien und Sterilität (Bloemendal et al., 2010)

Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll die Fallenbildung und das Anwendungspotenzial des Nematodenfangenden Pilzes *D. flagrans* untersucht werden. Es soll überprüft werden, ob ähnliche Mechanismen der Zellfusion bei der Fallenbildung beteiligt sind. Dies soll durch die Lokalisation der Proteine SofT und MakB innerhalb der Zellen, sowie der gezielten Deletion der Gene erfolgen. Weiterhin soll die Fallenkrümmung und Identität untersucht werden. Die frühen Stadien der Fallenkrümmung ähneln der Ascogonienbildung in *S. macrospora*, an der der STRIPAK Komplex maßgeblich beteiligt ist. Deshalb soll der STRIPAK Komplex in *D. flagrans* mit Hilfe der Deletion des STRIP1/2 orthologen Gens untersucht werden. Das Anwendungspotenzial von *D. flagrans* zur biologischen Schädlingsbekämpfung soll am pflanzenpathogenen Nematoden *X. index* untersucht werden. Es sollen eine Zucht des Schädlings an Feigenpflanzen etabliert und Infektionsstudien durchgeführt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines *in vitro* CRISPR-Cas9 Systems zur gerichteten Gendeletion in *D. flagrans*

Das *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) – CRISPR-associated (Cas) Protein 9 (CRISPR-Cas9) System ermöglicht es, DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) effizient und gezielt zu induzieren, um genetische Veränderungen durchzuführen. Bisher wurden Abweichungen des Systems in mehr als 40 verschiedenen filamentösen Pilzen und Oomyceten etabliert (Schuster & Kahmann, 2019). Während homologe Rekombination als klassische Methode zur gezielten Gendeletion in *D. flagrans* verwendet wird, sollte in diesem Teil der Arbeit auch das CRISPR-Cas9 System im Pilz etabliert werden. Die meisten CRISPR-Cas9 Systeme beruhen auf zwei Komponenten. Die Cas9 Endonuklease des Bakteriums *Streptococcus pyogenes* bildet einen Ribonukleoprotein (RNP) Komplex mit einer synthetisch-hergestellten *single guide* RNA (sgRNA) (Shi et al., 2019). Die sgRNA besitzt eine 20 Nukleotide (nt) lange Zielsequenz, die an eine 80 nt lange Gerüstsequenz fusioniert, und für die Cas9-Bindung notwendig ist. Sie sind Teile der ursprünglichen CRISPR RNA (crRNA) und *trans-activating* crRNA (tracrRNA) (Jinek et al., 2012). Wenn eine zur 20 nt langen crRNA homologe DNA-Sequenz von einem *protospacer adjacent motif* (PAM) NGG flankiert wird, erkennt, bindet und schneidet der Cas9-sgRNA RNP Komplex die Zielsequenz.

Alle Genommodifikationen beruhen auf endogenen DNA-Reparaturmechanismen. So kann der durch das CRISPR-Cas9 System induzierte Doppelstrangbruch beispielsweise durch Nicht-homologe Endverknüpfung repariert werden. Das System ist fehleranfällig, sodass es zur Deletion oder Insertion von wenigen Basen an der Schnittstelle kommt und Mutationen im Zielgen entstehen (Leisen et al., 2020). Mit Hilfe eines doppelsträngigen DNA-Fragments, welches die gewünschten Veränderungen und homologe Bereiche um die Schnittstelle enthält, können durch homologe Rekombination Teile der Zielsequenz ersetzt werden.

Vorangegangenen Plasmid-basierte CRISPR-Cas9 Ansätze wie im Pilz *Alternaria alternata* waren bisher in *D. flagrans* erfolglos, sodass in dieser Arbeit mit der gleichzeitigen Transformation von Cas9-Ribonukleoprotein (RNP) und der linearen Hygromycin-B Resistenzkassette *hph* gearbeitet wurde (Foster et al., 2018; Leisen et al., 2020; Wenderoth et al., 2017) (**Abb. 10 A**).

Als *proof of principle* wurde das zu *N. crassa* so orthologe Zellfusionsgen *sofT* deletiert. Die Deletion von *sofT*-orthologen Genen in filamentösen Pilzen führte zum Verlust von Luftmyzelbildung, sodass positive Transformanden nach einem vergleichbaren Phänotyp identifiziert werden können (Charlton et al., 2012; Craven et al., 2008; Francisco et al., 2020). Mit Hilfe der *N. crassa* Proteinsequenz (NCU01789) als Abfragesequenz und dem *basic local alignment search tool* (BLAST, NCBI) wurde das orthologe *SofT* (DFL_007867) in *D. flagrans* identifiziert. Das 1213 Aminosäure (*amino acid*, AA) große Protein, wird durch den 3867 Basenpaar (bp) großen offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) codiert, welcher vier Introns besitzt. Diese wurden durch Gesamt-Transkriptom-Shotgut-Sequenzierung (RNA-Seq) verifiziert. Als Zielerkennungsstelle für die sgRNA wurde die Protospacer Region im ersten Exon des *sofT* Gens ausgewählt. Um *off-target* Ziele zu vermeiden, wurde die Einzigartigkeit der Protospacer-Region und der PAM-Region im *D. flagrans* Genom unter Verwendung von BLASTN (*basic local alignment search tool, nucleotide*) analysiert. *D. flagrans* Wildtyp (WT) Protoplasten wurden mit einem RNP-Komplex bestehend aus einer kommerziell erhältlichen *S. pyogenes* Cas9 Nuclease (New England Biolabs) transformiert. Insgesamt zeigten vier Transformanden eine Resistenz gegenüber 100 µg/ml Hygromycin-B. Der Bereich um die Protospacer-Region wurde sequenziert und die Insertion der linearen Resistenzkassette an der Schnittstelle im ersten Exon des *sofT* Gens in drei Transformanden bestätigt. Zusätzlich wurden kleine Deletionen von ein oder zwei Nukleotiden in den $\Delta sofT$ Mutanten nachgewiesen (**Abb. 10 B**). Southern Blot Analysen zeigten eine einzelne Integration der *hph*-Resistenzkassette im Transformant T3, sodass dieser für weitere Experimente verwendet wurde (**Abb. 10 C**). Die Luftmyzelbildung war in der $\Delta sofT$ Mutante stark beeinträchtigt (**Abb. 10 D, E**). Zur Komplementation des Phänotyps wurde in die Mutante das *sofT*-Gen in voller Länge einschließlich der regulatorischen Regionen (Promoter und Terminator) transformiert, wodurch die Luftmyzelbildung wie im Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt werden konnte. Für weitere Zellbiologische Studien wurde der offene Leserahmen von *sofT* weiterhin an die für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) codierende DNA-Sequenz fusioniert (*sofT::hph; GFP::sofT*).

In einem nächsten Schritt wurde das rekombinante *S. pyogenes* Cas9 Protein im *E. coli* Stamm BL21 heterolog exprimiert und durch einen Polyhistidin-Tag (6xHis-tag) und Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Martin-Martin et al., 2018; Vonk et al., 2019; Zuris et al., 2015) (**Abb. 11 A**).

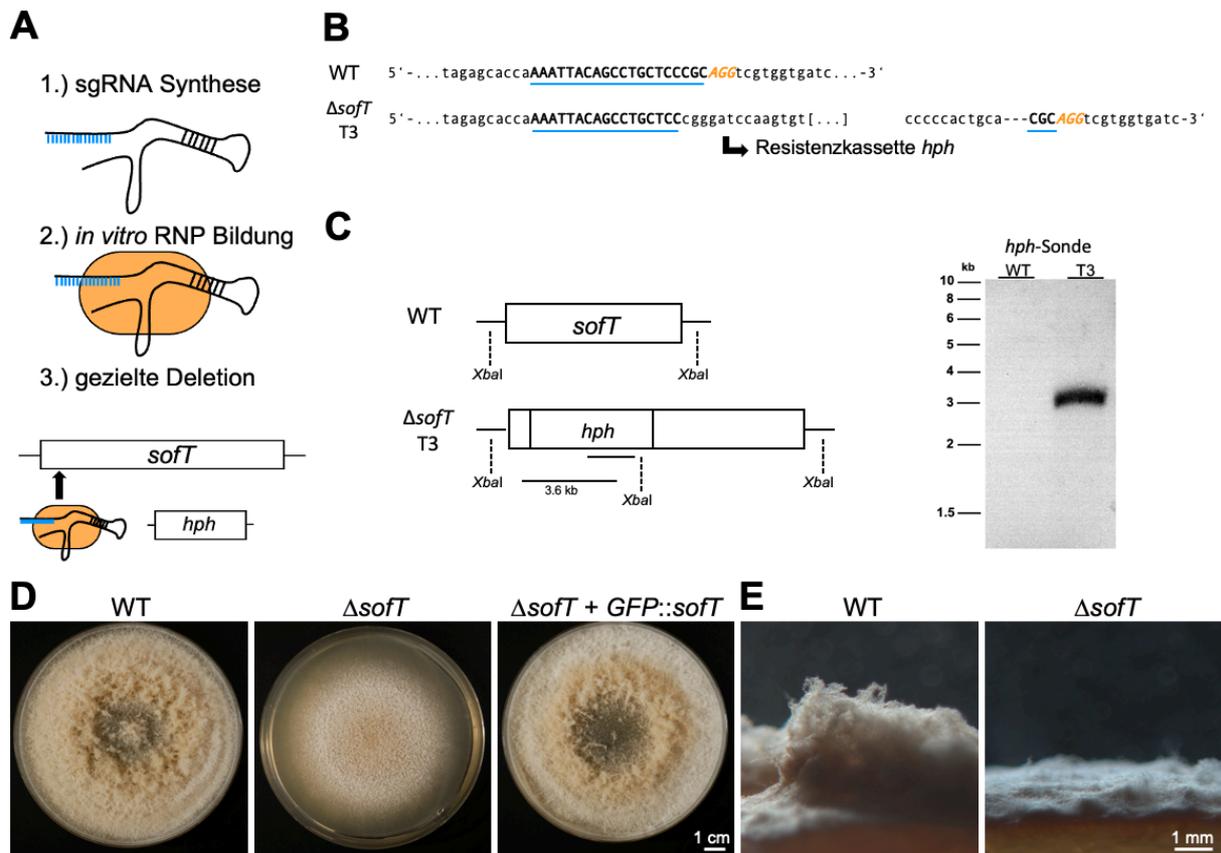


Abbildung 10: Gezielte Deletion des *D. flagrans soft* Gens mit Hilfe des CRISPR-Cas9 Systems. (A) Schematische Darstellung der gezielten Deletion von *soft*. Die durch das EnGen sgRNA Synthesis Kit (NEB) hergestellte sgRNA wird *in vitro* mit Cas9 assembliert. Der RNP Komplex wird mit einer linearen Hygromycin-B Resistenzkassette *hph* in *D. flagrans* Protoplasten transformiert und der *soft* Locus gezielt modifiziert. (B) Deletion des *soft* Gens in Transformant T3 mit Hilfe des Cas9 RNP Transformationssystems. Die 20 bp Zielsequenz ist in blau unterstrichen und befindet sich im ersten Exon des Gens. Die PAM Sequenz (AGG) ist orange markiert. Transformant T3 zeigt eine Insertion der Hygromycin-B Resistenzkassette 3 nt upstream der PAM-Sequenz. (C) Die Integration der *hph*-Resistenzkassette in Transformant T3 wurde mit Hilfe von Southern-Blot-Analyse verifiziert. Genomische DNA des WT und T3 wurden über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Xba*I verdaut, wodurch ein 3,6 kb großes Fragment mit einer *hph* DNA-Sonde hybridisiert. (D) Wachstum von *D. flagrans* WT, Δ *soft* Mutante, und *soft* Komplementation auf Kartoffeldextrose-Agar (potato dextrose agar, PDA) nach 7 Tagen Inkubation. (E) Seitenansicht des *D. flagrans* WT und der Δ *soft* Mutante.

Für die Expression wurde ein kommerziell erhältliches Plasmid (Addgene #62934) verwendet. Insgesamt wurden circa 6 mg aufgereinigtes Protein pro Liter Kultur erzielt. Das Protein zeigte nach einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) die entsprechende Größe des zu erwartenden Molekulargewichts von 163 kDa (Abb. 11 A).

Um die *in vivo* Funktionalität des Proteins zu überprüfen, wurde als *proof of principle* das Gen *hexA* (DFL_006881) deletiert, dessen codiertes Protein ortholog zu HEX-1 (NCU08332) aus *N. crassa* und Hauptbestandteil des Woronin Körpers ist (Jedd, 2011). Woronin Körper lokalisieren in filamentösen Pilzen an den Septen und verschließen deren Poren bei Verletzungen der Hyphe, um benachbarte Kompartimente zu schützen. Mit Hilfe von RNA-Seq Daten wurde die Expression und Introns des Gens bestätigt und die Gen-Annotation angepasst. Woronin Körper sind

peroxisomalen Ursprungs und es wurde gezeigt, dass der C-Terminus von HexA essenziell für die korrekte Lokalisation des Organells ist (Jedd & Chua, 2000). Daher wurde als Zielerkennungsstelle für die sgRNA die Protospacer Region im letzten Exon des *hexA* Gens ausgewählt (**Abb. 11 B**). Primer zur Amplifizierung der *hph*-Resistenzkassette besaßen zusätzlich 60 nt kurze Überhänge, die homolog zum Bereich der PAM-Sequenz waren. Dadurch sollte mit Hilfe von homologer Rekombination die Resistenzkassette im Bereich der Schnittstelle integriert werden. Insgesamt zeigten 9 Transformanten eine Resistenz gegenüber 100 µg/ml Hygromycin-B. Der Bereich des letzten Exons wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und sequenziert (**Abb. 11 C**).

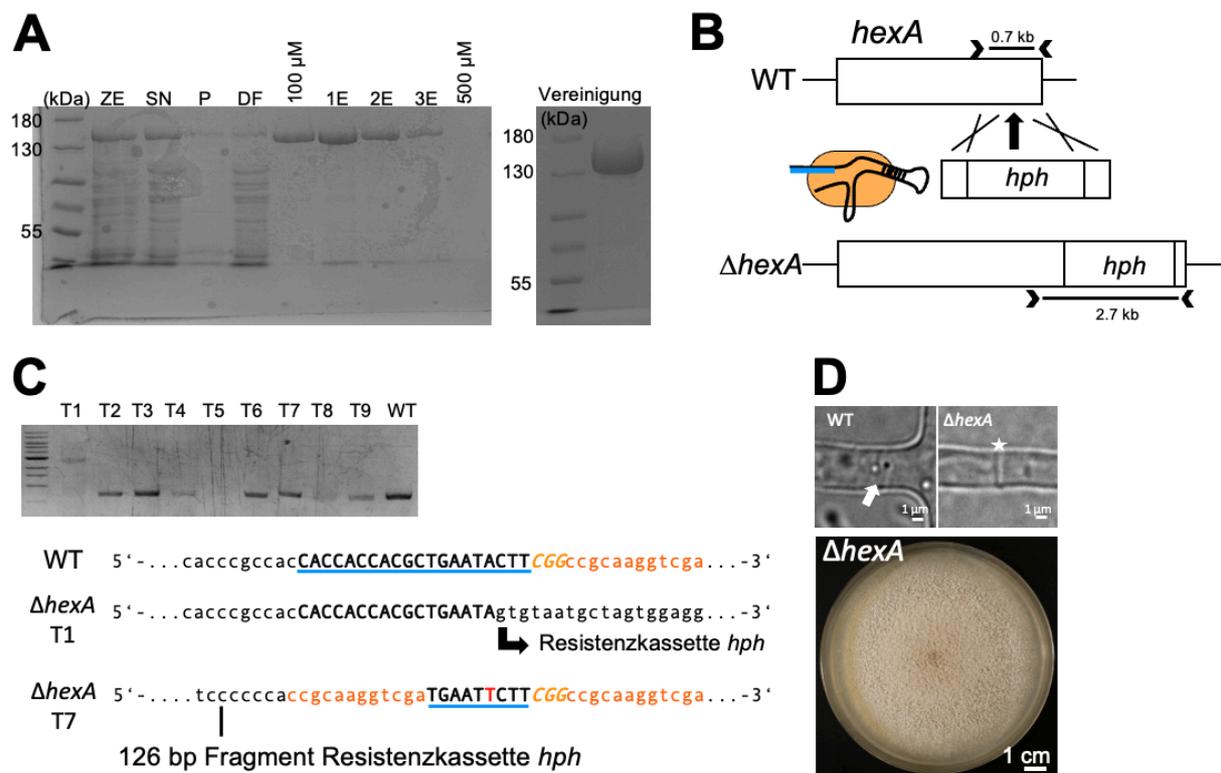


Abbildung 11: Aufreinigung des rekombinanten Cas9 Proteins und gezielte Deletion von *hexA*. (A) Cas9 exprimierende *E. coli* BL21 Zellen wurden mit French Press aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Das rekombinante Protein wurde durch Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt und Extrakte der einzelnen Schritte in einer Coomassie-markierten SDS-PAGE überprüft. Zellextrakt (ZE), Überstand nach Ultrazentrifugation (Ü), Pellet nach Ultrazentrifugation (P), Durchfluss nach Anwendung der Nickel-Affinitätschromatographie (DF) und Eluate der einzelnen Waschschrte mit Imidazol (100 – 500 µM). Die Fraktionen wurden vereint und erneut in einer Coomassie-markierten SDS-PAGE überprüft. (B) Schematische Darstellung der gezielten Deletion von *hexA*. Durch den induzierten Doppelstrangbruch kann die lineare *hph*-Resistenzkassette mit 60 bp großen homologen Flanken im letzten Exon des Gens integriert werden. Pfeile zeigen Primer-Bindestellen und zu erwartende Größen der PCR-Produkte an. (C) PCR-Amplifikation des letzten Exons in 9 generierten Transformanten. In Transformant T1 wurde die *hph*-Resistenzkassette integriert. In Transformant T7 kam es zur Integration von 126 bp an der Schnittstelle. Die 20 bp Zielsequenz ist in blau unterstrichen und befindet sich im letzten Exon des Gens. Die PAM Sequenz (CGG) ist orange markiert. Es wurde weiterhin mit Transformant T1 gearbeitet. (D) Die Deletion von *hexA* führt zum Verlust von Woronin Körpern am Septum und zu einer stark verminderten Luftmyzelbildung. Der Pfeil zeigt zwei Woronin Körper am Septum einer WT Hyphe. Der Stern markiert ein Septum des $\Delta hexA$ Mutante T1 ohne Woronin Körper. Wachstum der $\Delta hexA$ Mutante auf PDA nach 7 Tagen Inkubation.

Transformant T1 zeigte eine Insertion der *hph*-Resistenzkassette an der Schnittstelle. Bei Transformant T5 konnte der angrenzende Bereich nicht amplifiziert werden, was auf eine größere Deletion des umliegenden Bereichs hindeutet. Transformant T7 zeigte eine Insertion von 126 bp der Resistenzkassette an der Schnittstelle. Die Transformanden T1, T5, und T7 zeigten den gleichen Wachstumsphänotyp. Im Vergleich zum WT wurden an Septen keine Woronin Körper in den Transformanden identifiziert (**Abb. 11 D**). Weiterhin war die Luftmyzelbildung stark eingeschränkt.

3.2 Der Zelldialog vegetativer Hyphen und Fallen in *D. flagrans*

Die Proteine Soft und MakB werden für die vollständige Fallenbildung in *D. flagrans* benötigt

Ein faszinierender Aspekt von *D. flagrans* ist die Fähigkeit, dreidimensionale Fallennetzwerke auszubilden, die aus vielen Hyphenringen bestehen. Zellbiologisch ist dies eine komplexe Aufgabe, da ein Netzwerk das Ergebnis mehrerer Zellfusionen (Anastomosen) ist. Eine Ringfalle entwickelt sich durch die Abzweigung einer vegetativen Hyphe. Während die Fallenhyphe wächst, krümmt sie sich, um mit der ursprünglichen basalen Hyphe zu fusionieren. Dabei kann häufig beobachtet werden, dass schon vor physischem Kontakt eine kleine Hyphe der basalen Hyphe in Richtung der Ringhyphe wächst, was auf eine interzelluläre Kommunikation hinweist.

Der letzte Schritt der Fallen-Differenzierung schließt mit der Fusion einer Fallenhyphe mit einem Kompartiment einer basalen Hyphe, um eine ringartige Fallenstruktur zu bilden. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Zelldialog Modell aus *N. crassa* in filamentösen Pilzen wie *D. flagrans* konserviert und für die Fallenbildung notwendig ist. Dort wurde gezeigt, dass die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade um MAK-2 (das orthologe Protein zum Pheromon-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae*) und das Soft Protein eine zentrale Rolle in dieser Kommunikation spielen (Fleissner et al., 2009) (**Abb. 12**).

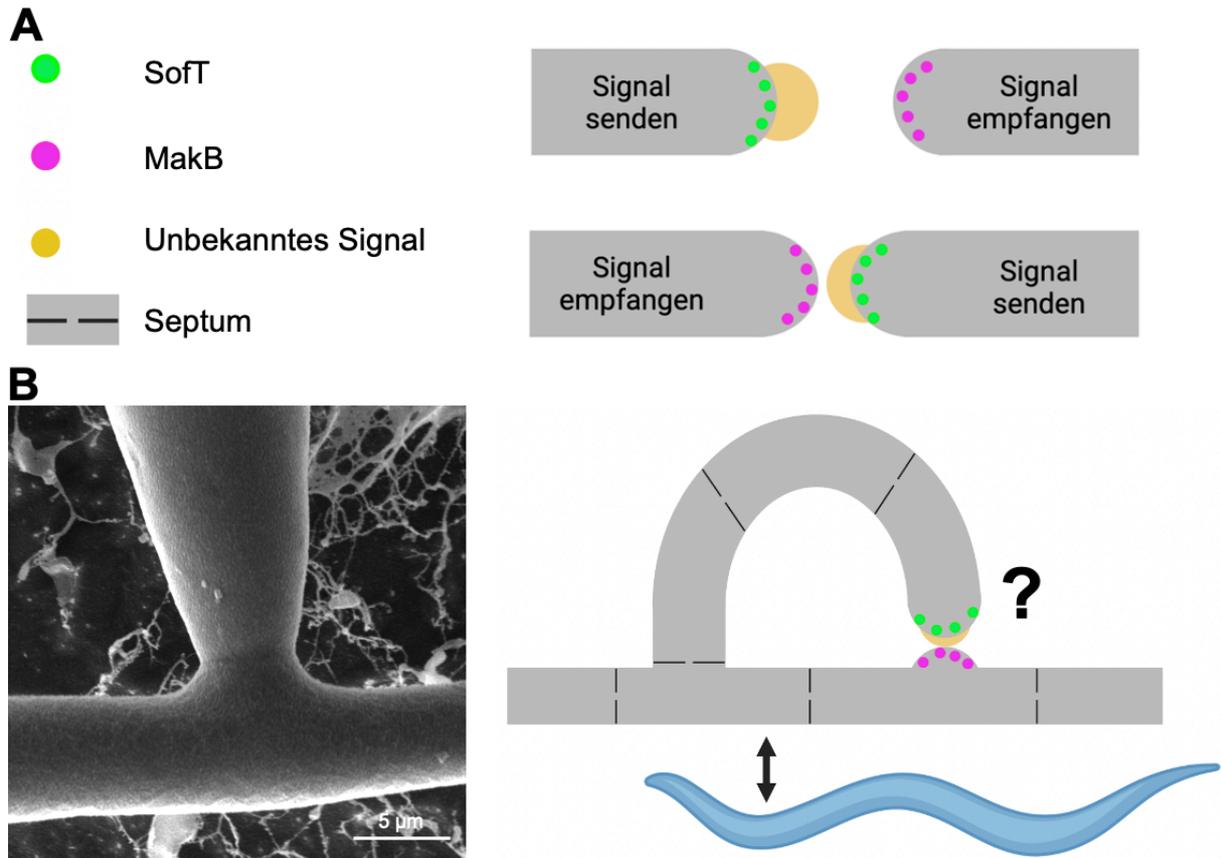


Abbildung 12: Übertragung des Zelldialog-Modells aus *N. crassa* auf die vegetative Hyphenfusion und die Fallenbildung in *D. flagrans*. (A) Im Zelldialog Modell wird das SO Protein mit der Signal-sendenden Funktion und MAK-2 mit der Signal-empfangenden Funktion in Verbindung gebracht. Die Kommunikation erfolgt durch ein bisher unbekanntes Signal. Die Zellen wachsen aufeinander zu und wechseln dabei die Zustände. (B) Bei der Fallenfusion in *D. flagrans* wächst häufig eine kleine Hyphenspitze der ausbildenden Fallenhyphe entgegen. Die Fallenbildung wird durch Nematoden induziert. Verändert nach (Read et al., 2012).

Um die Funktion von *D. flagrans* SoFT während der Fallenbildung zu untersuchen, wurden circa 1000 Konidien der im ersten Abschnitt generierte $\Delta soFT$ Mutante auf nährstoffarmen Agar (*low nutrient agar*, LNA) angeimpft und für 16 Stunden mit circa 200 *C. elegans* Larven bei 28 °C inkubiert. Im Vergleich zu Wildtyp (WT) und Komplementation, war die Fallenbildung der $\Delta soFT$ Mutante im Fusionsschritt gestört, sodass spiralförmige Hyphen entstanden (Abb. 13 A). Im Vergleich zu Wildtyp und Komplementation wurden in der $\Delta soFT$ Mutante keine vegetative Hyphenfusionen beobachtet (Abb. 13 B).

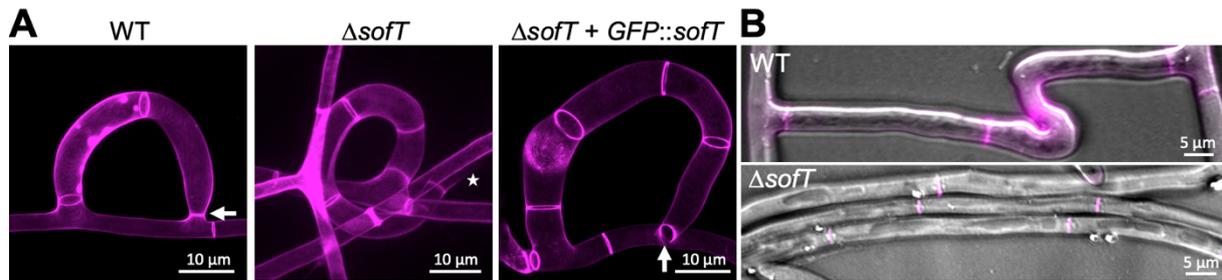


Abbildung 13: Die Deletion von *soft* führt zum Verlust der korrekten Fallenbildung und vegetativen Hyphenfusion. (A) Während in WT und Komplementation der Ringschluss (mit Pfeilen markiert) bei der Fallenbildung erfolgreich ist, blieb die Fusion der Fallen der $\Delta soft$ Mutante aus. Der Stern markiert die Hyphenspitze. (B) Im Vergleich zum WT blieb die vegetative Hyphenfusion in der $\Delta soft$ aus, sodass sich häufig nicht-fusionierte Hyphenstränge bildeten. Die Zellwände der Hyphen wurden durch den Farbstoff Calcofluor-White (CFW) fluoreszent markiert und in Magenta dargestellt.

Als nächstes wurde die Rolle des zu MAK-2 orthologen Proteins in *D. flagrans* untersucht. Mit Hilfe der Ähnlichkeitssuche BLAST und der *N. crassa* MAK-2 (NCU_02393) Proteinsequenz als Abfragesequenz wurde das homologe Protein und dazugehörige Gen (DFL_000344) identifiziert. Im Folgenden wird das Protein MakB genannt. MakB besteht aus 350 AA und wird durch einen 1320 bp offenen Leserahmen codiert, der vier Introns besitzt. Um die Rolle von MakB bei der Fusion von vegetativen Hyphen und Fallenhypen zu untersuchen, wurde eine Gendeletionsmutante mit Hilfe von homologer Rekombination erstellt (**Abb. 14 A**). Dazu wurde eine Knockout-Kassette mit der Hygromycinresistenzkassette (*hph*) und zwei 1 kb großen, zu *makB* homologen, flankierenden Bereichen durch Gibson-Assembly in den Vektor pJET1.2 kloniert. Die Knockout-Kassette wurde mittels PCR amplifiziert und in *D. flagrans* Protoplasten transformiert. Insgesamt zeigten 45 Transformanten eine Resistenz gegenüber 100 µg/ml Hygromycin-B auf PDA. Die Deletion von *makB* wurde über Southern Hybridisierung bestätigt. Um sicherzustellen, dass potentiell beobachtete Mängel durch den Verlust von *makB* verursacht wurden, wurde eine vollständige Genvariante mit zusätzlicher mCherry Sequenz (*makB::hph; makB::mCherry*) in die $\Delta makB$ Mutante transformiert. Im Vergleich zu WT und Komplementation war die Luftmyzelbildung der $\Delta makB$ Mutante stark beeinträchtigt (**Abb. 14 B, C**). Für die mikroskopische Analysen wurden jeweils circa 1000 Konidien des WTs, $\Delta makB$ Mutante und der Komplementation auf *low nutrient agar* (LNA) angeimpft und für 16 Stunden mit circa 200 *C. elegans* Larven bei 28 °C co-inkubiert. Während im WT und im komplementierten Stamm häufige vegetative Hyphenfusionen beobachtet wurden, konnten in der $\Delta makB$ Mutante keinerlei Hyphenfusionen beobachtet werden (**Abb. 14 D**). Auch während der Fallenbildung wurden in der $\Delta makB$ Mutante keine Zellfusion beobachtet, sodass der Ringschluss ausblieb und häufig spiralförmige

Fallen entstanden (**Abb. 14 E**). Trotz dieser Einschränkung waren die Fallen noch klebrig und die $\Delta makB$ Mutante in der Lage, Nematoden zu fangen und zu verdauen. Dies zeigt, dass SofT und MakB für die Hyphenfusion und den Ringschluss der Falle in *D. flagrans* essenziell sind, ähnlich der Rolle der homologen Proteine in *N. crassa* und anderen filamentösen Pilzen.

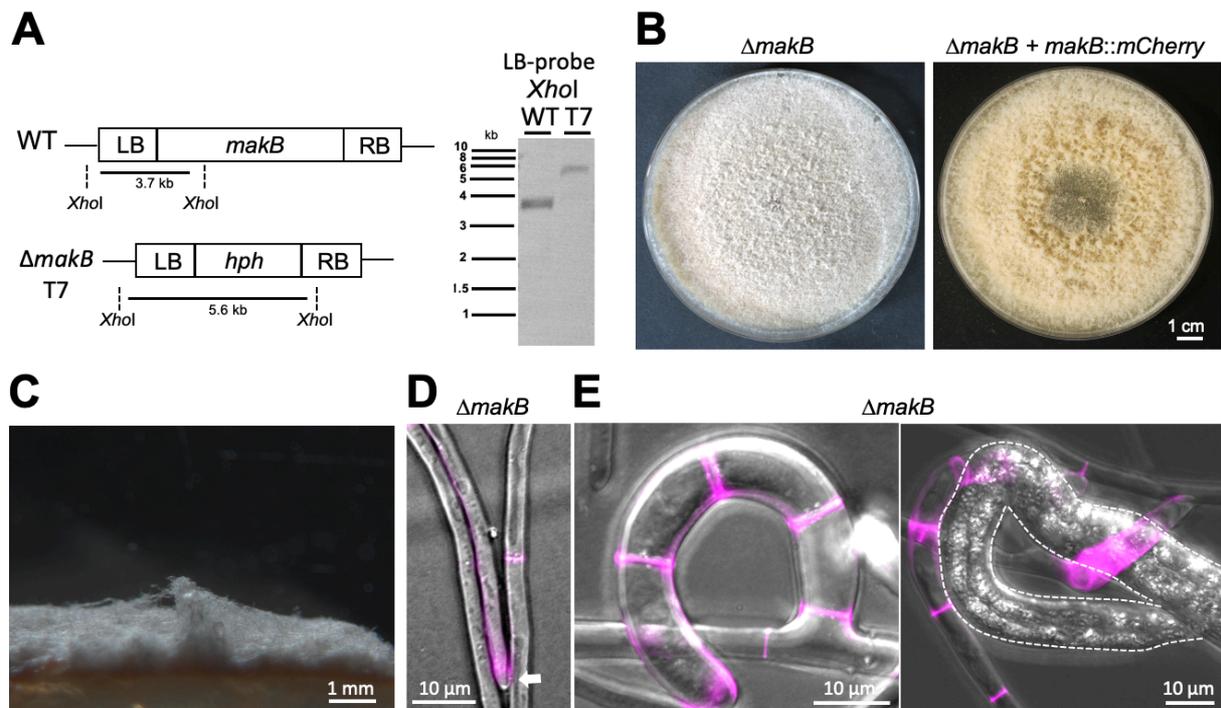


Abbildung 14: MakB wird für die vegetative Hyphenfusion und die korrekte Fallenbildung benötigt. (A) Gezielten Deletion von *makB* mit Hilfe homologer Rekombination. Links zeigt eine schematische Darstellung der Deletionsstrategie. Der *makB* ORF wird durch die *hph*-Resistenzkassette bei erfolgreicher Integration ersetzt. Rechts zeigt die Southern Blot Analyse. Genomische DNA von WT und Transformant 7 (T7) wurde über Nacht mit dem Restriktionsenzym *XhoI* verdaut. Für die Hybridisierung wurde eine DNA-Sonde komplementär zur linken Flanke (left border, LB) verwendet, die in der WT Probe mit einem 3,7 kb und in dem Transformant T7 mit einem 5,6 kb großen Fragment hybridisierte. (B) Wachstum der $\Delta makB$ Mutante und des Komplementationstammes auf PDA nach 7 Tagen Inkubation. (C) Seitenansicht des Wachstums der $\Delta makB$ Mutante. (D) Die Deletion von *makB* führt zum Verlust der vegetativen Hyphenfusion. (E) Die Deletion von *makB* verhindert den Ringschluss der Falle. Die Fallen der $\Delta makB$ Mutante konnten weiterhin *C. elegans* Larven fangen und verdauen. Die Zellwand des Pilzes wurde in D + E mit CFW angefärbt und in Magenta dargestellt. Gestrichelte Linien markieren den Umriss der gefangenen *C. elegans* Larve.

Das Zelldialog Modell ist in *D. flagrans* konserviert

Der letzte Schritt der Fallen-Differenzierung schließt mit der Fusion einer Fallenhyphe mit einem Kompartiment einer basalen Hyphe, um eine ringartige Fallenstruktur zu bilden. Diese Interaktion ähnelt stark der hoch koordinierten Keimlingsfusion in *N. crassa*, die durch die stark koordinierte und abwechselnde Rekrutierung der Proteine MAK-2 und SO an die Plasmamembran der wachsenden Spitzen gekennzeichnet ist. Um die subzelluläre Dynamik der beiden Proteine während der vegetativen Hyphenfusion und der Fallenbildung von *D. flagrans* zu untersuchen, wurde ein Stamm mit exprimierenden GFP-SofT und MakB-mCherry erstellt. Beide Fusionskonstrukte wurden unter der Kontrolle des jeweiligen nativen Promotors

exprimiert (*sofT(p)::GFP::sofT*, beziehungsweise *makB(p)::makB::mCherry*). In nicht interagierenden Zellen lagen beide Proteine hauptsächlich im Zytoplasma vor. In interagierenden Hyphen wurde jedoch eine Akkumulation von GFP-SoFT an der Hyphenspitze, Kontaktstelle und in der Plasmamembran beider Zellen beobachtet (**Abb. 15, Film 1**).

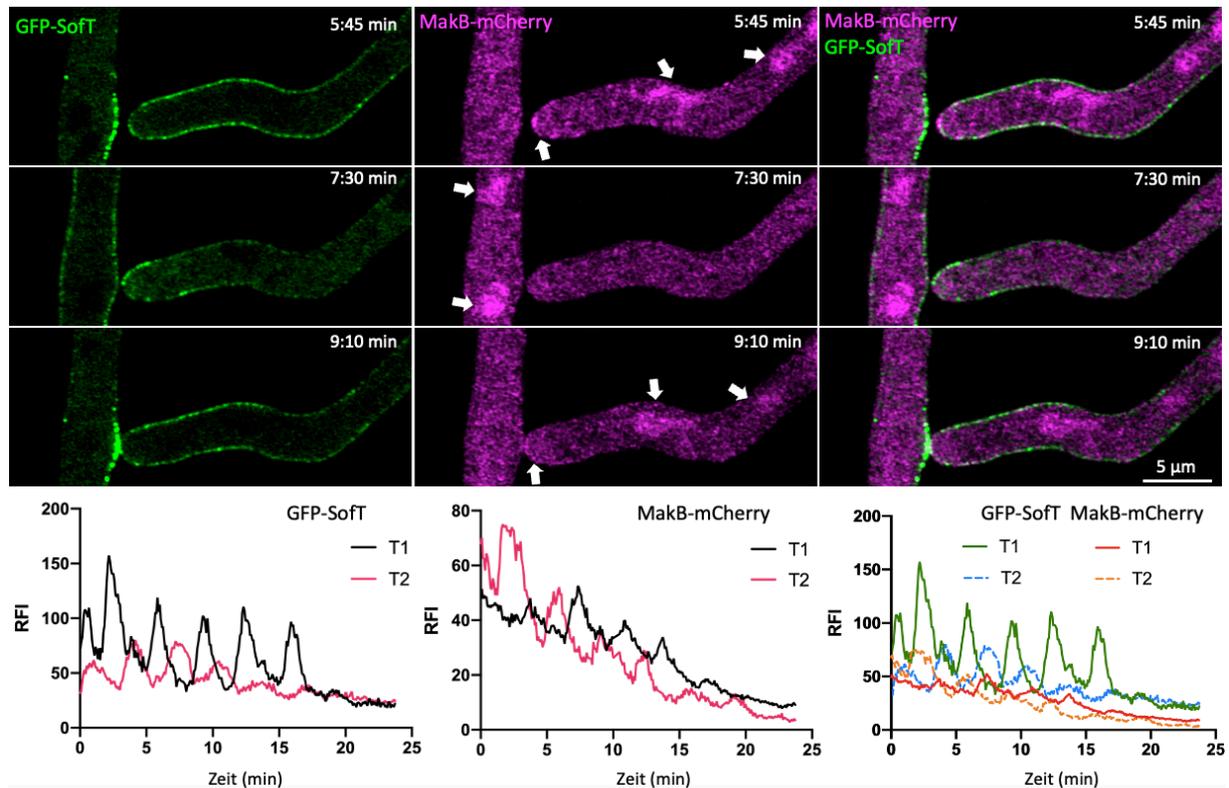


Abbildung 15: GFP-SoFT und MakB-mCherry zeigen eine oszillierende Lokalisation während der vegetativen Hyphenfusion in *D. flagrans*. Zeitrafferaufnahme der GFP-SoFT (in Grün dargestellt) und MakB-mCherry (in Magenta dargestellt) Lokalisation während der Zellfusion zweier vegetativen Hyphen. T1 = linke Hyphe, T2 = rechte Hyphe. Die Graphen zeigen die gemessene relative Fluoreszenzintensität (RFI, y-Achse) in der Interaktionszone über die Zeit (x-Achse, in Minuten). GFP-SoFT lokalisiert in der Plasmamembran. Pfeile zeigen die Lokalisation von MakB-mCherry in Zellkernen, oder an der Hyphenspitze der interagierenden Zellen. Siehe auch Film 1.

Zeitraffermikroskopische Aufnahmen zeigten, dass diese Akkumulationen an der Hyphenspitze und der Kontaktstelle dynamisch waren und in einer Phase von circa drei bis vier Minuten oszillierten. Interessanterweise wurde die gleiche Dynamik in der Partnerhyphe beobachtet, jedoch genau gegenphasig, sodass die höchste Signalintensität in der ersten Hyphe mit der niedrigsten Intensität der Partnerhyphe korrelierte. Sobald physischer Kontakt zwischen beiden Zellen hergestellt wurde, kam es nach einigen weiteren Oszillationen zu einer stetigen Akkumulation an der Kontaktzone, bis die Hyphenfusion vollständig abgeschlossen war. Die subzelluläre Dynamik von MakB-mCherry zeigte ähnliche oszillierende Eigenschaften, wobei die natürliche Expressionsstärke ziemlich schwach war (**Abb. 15**). Das Signal akkumulierte hauptsächlich in den Zellkernen der interagierenden Kompartimente und

wurde in manchen Zellen ähnlich wie GFP-SoFT an den Hyphenspitzen beobachtet. Die Rekrutierung in den Zellkern oszillierte ebenfalls in einer Phase von circa drei bis vier Minuten. In beiden interagierenden Zellen oszillierte die Rekrutierung von GFP-SoFT an der Plasmamembran und die Rekrutierung von MakB-mCherry in den Zellkernen in gegenseitigen Phasen.

Die subzelluläre Lokalisation von GFP-SoFT während der Fallenbildung zeigte eine robuste oszillierende Rekrutierung des Proteins an der Plasmamembran der Fallenhypfenspitze, beziehungsweise der Fusionsstelle der basalen Hyphe (**Abb. 16, Film 2**). Die Rekrutierung erfolgte dabei in kürzeren Abständen (zwei bis drei Minuten) im Vergleich zur vegetativen Hyphenfusion. Auch bei der Fallenbildung zeigte MakB-mCherry hauptsächlich eine oszillierende Rekrutierung im Zellkern, die in Gegenphase zur GFP-SoFT Rekrutierung stand. Dies zeigt, dass auch bei der Ringschließung der Fallenbildung die interagierenden Kompartimente sich miteinander koordinieren.

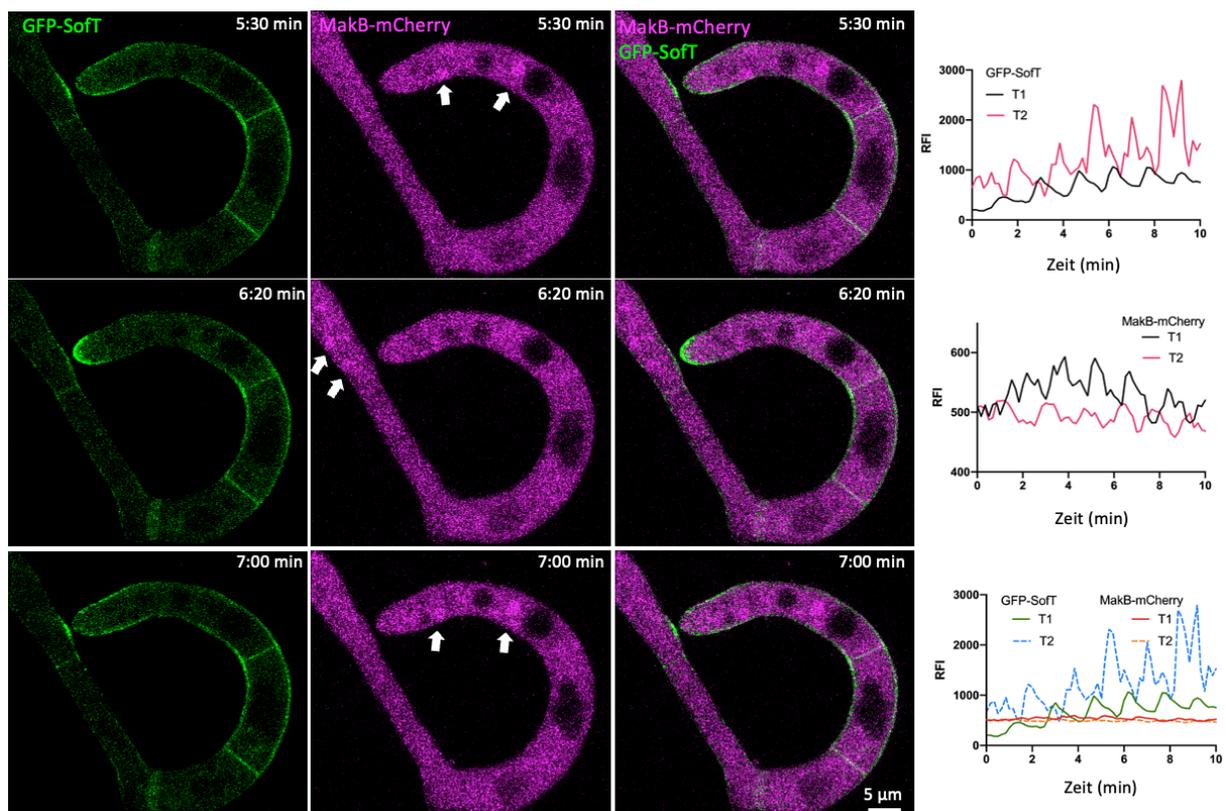


Abbildung 16: GFP-SoFT und MakB-mCherry zeigen oszillierende Lokalisation während der Fallenbildung in *D. flagrans*. Zeitrafferaufnahme der GFP-SoFT (dargestellt in Grün) und MakB-mCherry (dargestellt in Magenta) Lokalisation während der Fallenbildung. T1 = basale Hyphe, T2 = Fallenkompartment. Die Graphen zeigen die RFI (y-Achse) innerhalb der Interaktionszone über die Zeit (x-Achse). GFP-SoFT wird an die Plasmamembran rekrutiert. Pfeile markieren die Rekrutierung von MakB-mCherry in die Zellkerne der interagierenden Zellen. Siehe auch Film 2.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die *D. flagrans* Hyphen während ihrer Interaktion koordiniert zwischen zwei unterschiedlichen Stadien wechseln, was darauf hindeutet, dass das Zelldialog Modell aus *N. crassa* in filamentösen Pilzen konserviert ist.

Die Fallenbildung unterscheidet sich von der Interaktion von Keimlingen oder der vegetativen Hyphenfusion darin, dass die beiden interagierenden Kompartimente von der gleichen basalen Hyphe abstammen und lediglich drei bis vier Kompartimente intrazellulär voneinander getrennt sind. Während den Zeitrafferaufnahmen wurde beobachtet, dass GFP-SoFT auch am Septum der interagierenden Kompartimente lokalisierte (**Abb. 17**). Bei den meisten Ascomyceten sind die septalen Poren von aktiv wachsenden Hyphen geöffnet, wodurch ein schneller zytoplasmatischer Fluss und Nährstoffaustausch ermöglicht wird. Um eine intrazelluläre Selbststimulation durch die gleichzeitige Generierung und Wahrnehmung chemotroper Signale zu verhindern, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die septalen Poren während der Fusion der Falle geschlossen werden müssen. Bei Beschädigung einer Hyphe der Ascomyceten verschließen die Woronin Körper die septale Pore, um Austritt des Zytoplasmas der angrenzenden Hyphen zu verhindern (Jedd & Pieuchot, 2012).

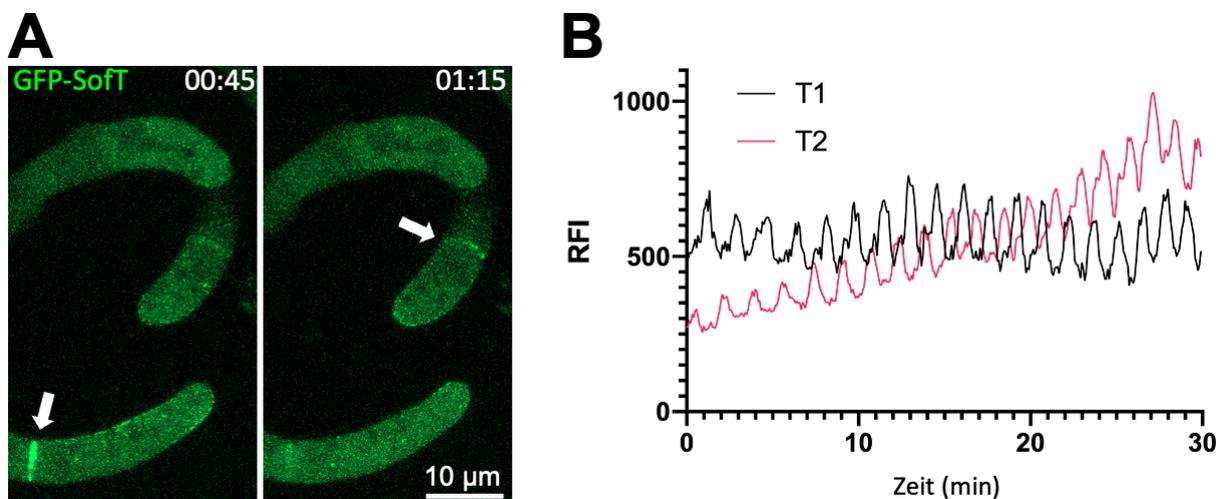


Abbildung 17: Lokalisation von GFP-SoFT an Septen interagierender Fallenkompartimente. (A) Ausschnitte einer Zeitrafferaufnahme von GFP-SoFT in interagierenden Fallenkompartimenten. Pfeile markieren die Lokalisation am Septum (B) Der Graph zeigt die RFI (y-Achse) innerhalb der Interaktionszone über die Zeit (x-Achse) von 30 Minuten. T1 = untere Zelle, T2 = obere Zelle.

Hauptbestandteil der Woronin Körper ist das Protein HexA. Daher wurden die Woronin Körper in *D. flagrans* mit Hilfe des Fusionsproteins GFP-HexA lokalisiert (**Abb. 18 A**). Während bei septalen Poren von vegetativen Hyphen jeweils von einem Woronin Körper an jeder Seite identifiziert wurde, lokalisierten an den septalen Poren von Fallenzellen mindestens zwei bis drei Woronin Körper auf jeder Seite. Um die

funktionelle Rolle des Organells zu testen, wurde eine weitere $\Delta hexA$ Mutante mittels homologer Rekombination erstellt, um den in Kapitel 1 beobachteten Phänotyp der CRISPR-Cas9 erstellten Mutante zu bestätigen. (**Abb. 18 B**). Interessanterweise zeigte diese Mutante eine mit der $\Delta sofT$, $\Delta makB$ und der durch CRISPR-Cas9 erstellten $\Delta hexA$ Mutante vergleichbare Defizite, sodass keine Hyphenfusion auftrat und die Ringe nicht geschlossen waren (**Abb. 18 C - E**). Es ist bekannt, dass das orthologe Soft Protein AoSO in *A. oryzae* bei abiotischem Stress an der septalen Pore akkumuliert (Maruyama et al., 2010). Deshalb wurde in einem nächsten Schritt überprüft, wie die Zelldialogproteine MakB und SofT in der $\Delta hexA$ Mutante lokalisieren (**Abb. 19 A**). Während MakB-mCherry trotz fehlender Hyphenfusion weiterhin eine oszillierende Rekrutierung in den Zellkernen zeigte, konnte keinerlei Akkumulation von GFP-SofT in der $\Delta hexA$ Mutante beobachtet werden.

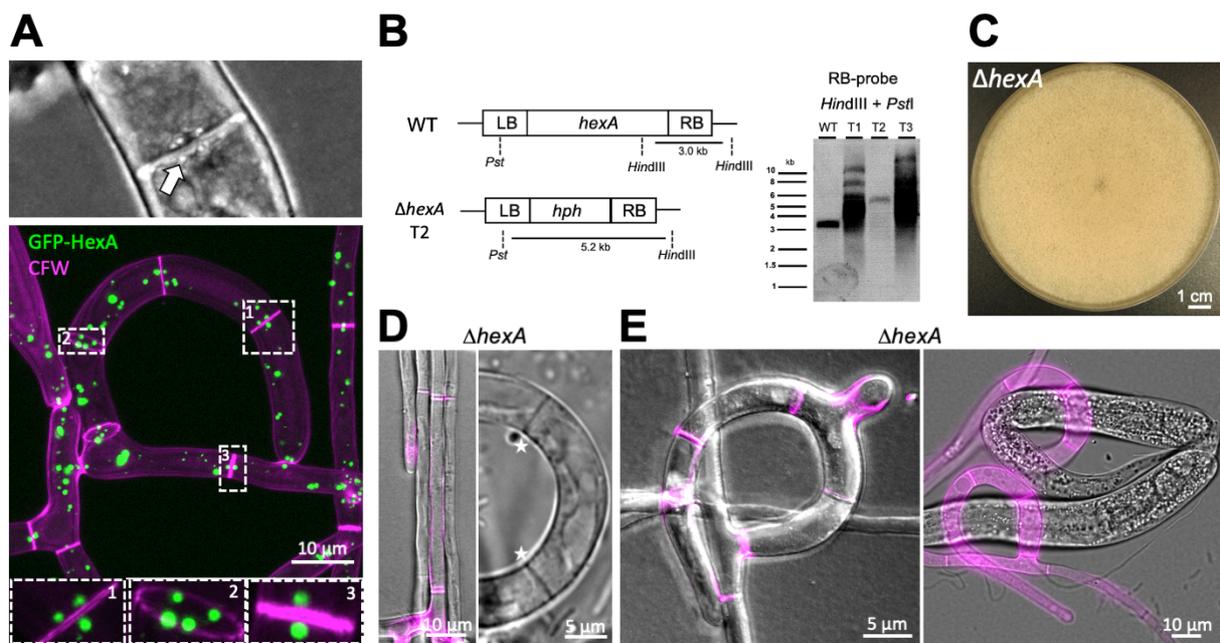


Abbildung 18: HexA lokalisiert in Woronin Körpern und wird für deren Lokalisation an der Septumspore, sowie für die vegetative und Fallenfusion benötigt. (A) Lokalisation von Woronin Körpern an der Septumspore. Die obere Aufnahme zeigt die Septumspore einer Falle. Der Pfeil zeigt die Lokalisation von fünf Woronin Körpern. Die untere Aufnahme zeigt die Lokalisation von GFP-HexA (in Grün markiert) in einer Falle. Jedes Septum besitzt mehrere Woronin Körper. **(B)** Schematische Darstellung der Deletion von $hexA$. Der $hexA$ ORF wurde durch die hph -Resistenzkassette mit Hilfe von homologer Rekombination ersetzt. Rechts zeigt die Southern Blot Analyse von WT und der Transformanten T1 – T3. Genomische DNA wurde über Nacht mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *HindIII* verdaut. Eine DNA-Sonde komplementär zur rechten Flanke (*right border*, RB) hybridisierte im WT mit einem 3,6 kb großen Fragment und im Transformant T2 mit einem 5,2 kb großen Fragment. **(C)** Wachstum der $\Delta hexA$ Mutante auf PDA nach 7 Tagen Inkubation. **(D)** Die Deletion von $hexA$ führt zum Verlust der vegetativen Hyphenfusion und Lokalisation der Woronin Körper am Septum. **(E)** Die Deletion von $hexA$ verhindert den Ringschluss der Fallen. Diese konnten weiterhin *C. elegans* Larven fangen und verdauen. Die Zellwand des Pilzes in A, D + E ist mit CFW gefärbt und in Magenta dargestellt.

Die genaue Funktion von SofT bei der Zell-Zell-Kommunikation ist noch nicht bekannt. Die Rekrutierung von GFP-SofT an die Plasmamembran deutet jedoch daraufhin, dass es sich um ein sekretiertes Protein handeln könnte. Extrazelluläre Vesikel (EV) sind mit einer Phospholipid-Doppelmembran umgeben und werden von Zellen als Mediatoren von Zell-Zell-Interaktionen sekretiert (Cai et al., 2019a). Daher wurde der EV-Marker BroA (DFL_002479) durch die Fusion mit GFP in den Zellen lokalisiert. Interessanterweise akkumulierte BroA-GFP in *D. flagrans* hauptsächlich an der Plasmamembran kommunizierender Hyphen (**Abb. 19 B, Film 3**). Diese Lokalisation ist mit der Lokalisation von GFP-SofT vergleichbar und deutet darauf hin, dass Signalmoleküle für den Zelldialog mit Hilfe von Exosomen sekretiert werden und möglicherweise nicht Art-spezifisch, sondern hoch konserviert sind.

Die für den Zelldialog erhaltenen Ergebnisse sind in zwei Publikationen eingeflossen (Youssar et al., 2019; Serrano et al., 2021; Manuskript eingereicht).

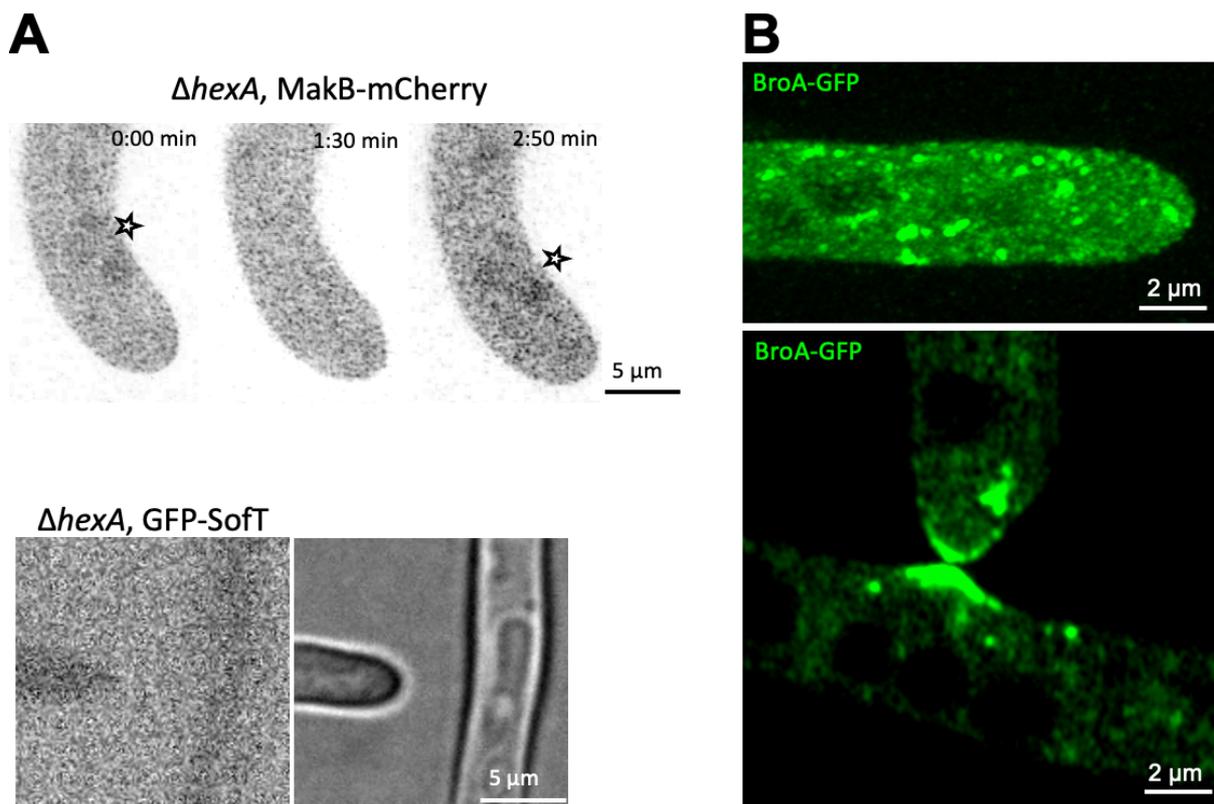


Abbildung 19: Fehlende Rekrutierung von GFP-SofT in der $\Delta hexA$ Mutante. Der Exosomen Marker BroA-GFP lokalisiert an der Hyphenspitze interagierender Zellen. Siehe auch Film 3.

3.3 Bakterien-induzierte Fallenbildung in *D. flagrans*

Bakterien der Gattung *Delftia* induzieren die Fallenbildung der Δsoft Mutante

Die Bildung von Fallen ist ein sehr energieaufwendiger Prozess. Die meisten der NFP bilden daher ihre Fallen erst in Präsenz von Nematoden und bei Nährstoffmangel (vor allem Stickstoffmangel) aus (Ulzurrun & Hsueh, 2018).

Bei Analysen der vorangegangenen Experimente wurde beobachtet, dass die Δsoft Mutante nach drei Tagen Inkubation auf LNA ohne das Vorhandensein von Nematoden Fallen ausbildete. Im Folgenden wurde deshalb nach möglichen induzierenden Stoffen und involvierten Signalwegen gesucht. Dabei wurde eine Bakterienkontamination in den Proben identifiziert. Es gibt bereits Hinweise, dass Bakterien in der Lage sind, die Fallenbildung in NFP zu induzieren (Li et al., 2011; Su et al., 2016; Wang et al., 2014). Daher wurden die Bakterien durch die Kultivierung auf LB Medium gezielt angereichert und durch Sequenzierung des ribosomalen 16S-rDNA Bereichs der Gattung *Delftia* zugeordnet. Die gezielte Zugabe der Bakterien induzierte die Fallenbildung in der Δsoft Mutante, jedoch nicht in *D. flagrans* WT (**Abb. 20 A**). *Delftia* sind Gram-negative, begeißelte Bakterien und wurden zum ersten Mal aus Erde in Delft in den Niederlanden isoliert. Die Bakterien zeigten aktive Fortbewegung entlang der Pilzhyphen der Δsoft Mutante, was darauf hindeutete, dass ein enger physischer Kontakt für die Falleninduktion notwendig ist (**Abb. 20 B, Film 4, 5, 6**). Die Zugabe des zellfreien Kulturüberstands, sowie abgetötete Bakterien induzierten in der Tat nicht die Fallenbildung der Δsoft Mutante. Um zu überprüfen, ob eine räumliche Nähe für die Interaktion notwendig ist, wurden Sporen der Δsoft Mutante räumlich getrennt von den Bakterien auf Wasseragar inokuliert. Die räumliche Trennung verhinderte die Falleninduktion, was weiterhin auf die Notwendigkeit des physischen Kontakts hindeutet. Extrem saurer (pH 4) oder alkalischer (pH 12) pH des Agars induzierte nicht die Fallenbildung der Δsoft Mutante.

In *A. oligospora* wurde gezeigt, dass von Bakterien sekretierter Harnstoff die Fallenbildung induziert (Wang et al., 2014). Daher wurden Sporen der Δsoft Mutante auf Wasseragar mit unterschiedliche Mengen Harnstoff (10, 100 und 1000 mg/l) inokuliert und das Myzel für 96 Stunden auf Fallenbildung überprüft. Es wurde jedoch keine Fallenbildung beobachtet.

Es wurde gezeigt, dass viele Mikroorganismen auxotroph sind und in komplexen Gemeinschaften über den Austausch von Aminosäuren und Vitaminen kommunizieren

können (Zengler & Zaramela, 2018). Viele NFP sind auxotroph für Thiamin und Biotin (Satchuthanathavale & Cooke, 1967). Daher wurde getestet, ob die Zugabe von Thiamin (0,75 μM Endkonzentration), Biotin (0,34 μM Endkonzentration), oder die Zugabe von jeweils 19 Aminosäuren (Gly, Leu, Ile, His, Glu, Cys, Asp, Asn, Arg, Ala, Val, Tyr, Trp, Thr, Ser, Phe, Pro, Met, Lys; Endkonzentration jeweils 0,1 mg/ml) die Fallenbildung der Δsoft Mutante oder des WT induzieren. Sporen der Pilzstämme wurden auf Wasseragar mit Biotin, Thiamin, beziehungsweise einer Aminosäure inokuliert und für 96 Stunden auf Fallenbildung überprüft. Es wurde unter keiner dieser getesteten Bedingungen Fallenbildung beobachtet, was auf eine Interaktion der Bakterien mit dem Pilz durch ein bisher unbekanntes Signal hindeutet.

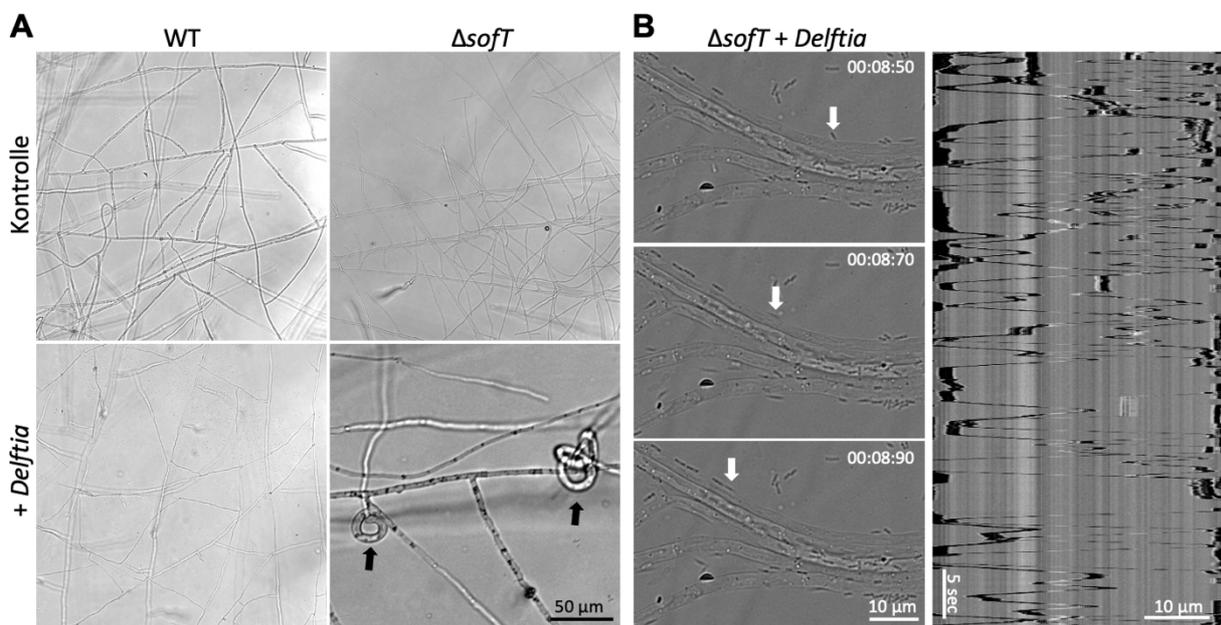


Abbildung 20: Bakterien der Gattung *Delftia* induzieren die Fallenbildung in der Δsoft Mutante. (A) Bakterien wurden nach 24 Stunden Inkubation der Pilzproben bei 28 °C zugegeben und nach weiteren 24 Stunden Co-Inkubation analysiert. Als Kontrolle wurde dH_2O auf die Proben pipettiert. Die Pfeile markieren gebildete Fallen. (B) Fortbewegung der Bakterien entlang der Pilzhyphen. Zeitrafferaufnahme zeigt die Bewegung von *Delftia* entlang der *D. flagrans* Δsoft Hyphen. Der Pfeil zeigt die Bewegung eines Bakteriums aus Film 4. Die Kymograph Analyse zeigt die Bewegung der Bakterien entlang des gezeigten Hyphenabschnitts über den Zeitraum von einer Minute an.

Die Bakterien-induzierte Fallenbildung ist in NFP geläufig, jedoch nicht konserviert.

Um zu testen, ob Bakterien der Gattung *Delftia* in anderen NFP die Fallenbildung induzieren, wurden weitere Arten getestet. *A. conoides*, *A. oligospora* und *A. musiformis* bilden dreidimensionale klebrige Fallennetzwerke aus, während *D. stenobrocha* kontraktile Ringe und *D. haptotyla* klebrige Fangknoten bilden. Von den fünf getesteten Arten wurde in *A. conoides* und *A. oligospora* die Fallenbildung durch *Delftia* induziert (**Abb. 21**).

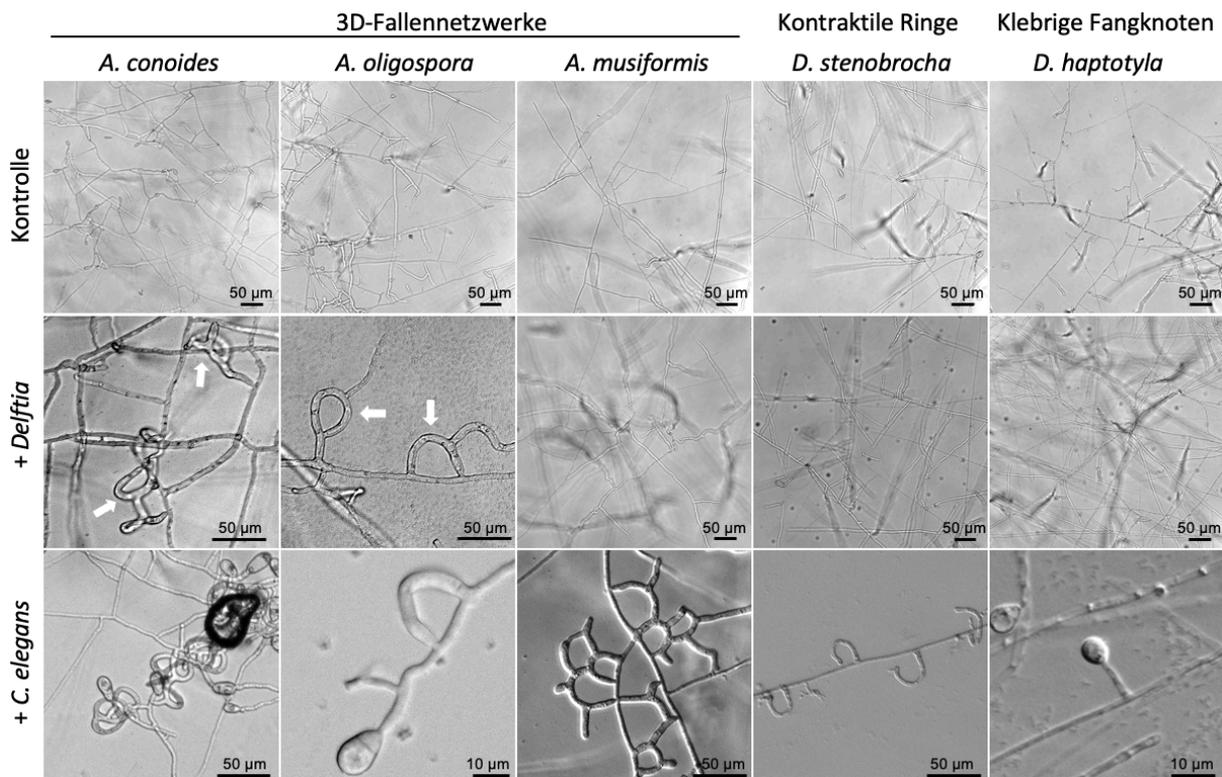


Abbildung 21: Die Induktion der Fallenbildung durch *Delftia* in verschiedenen NFP. Pilzmyzel der jeweiligen Arten wurde für 24 Stunden auf Wasseragar bei 28 °C inkubiert und anschließend für weitere 72 Stunden mit den Bakterien co-Inkubiert. Als Kontrolle wurde die Fallenbildung durch *C. elegans* Larven induziert. Getestet wurden Arten, die dreidimensionale Fallennetzwerke, kontraktile Ringe oder klebrige Fangknoten ausbilden. Die durch *Delftia* induzierten Fallen in *A. conoides* und *A. oligospora* sind mit weißen Pfeilen markiert.

In einem nächsten Schritt wurden die aus der Stammsammlung verfügbaren Bakterienarten zur Induktion der Fallenbildung in *D. flagrans* WT, $\Delta sofT$ Mutante, *A. oligospora*, *A. conoides*, *A. musiformis* und *D. stenobrocha* getestet (**Tabelle 1**). Von den getesteten Bakterien induzierten *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas strutzeri*, *Enterobacter cloacae* und *Serratia marcescent* die Fallenbildung in der $\Delta sofT$ Mutante, *A. oligospora* und *A. conoides*, jedoch nicht in *D. flagrans* WT, *A. musiformis* und *D. stenobrocha*. *Proteus mirabilis* und *Micrococcus luteus* induzierten in keiner Art die Fallenbildung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es spezifische Interaktionen zwischen Bakterien und NFP gibt und dass die Wahrnehmung der Bakterien zwar in anderen Arten vorkommt, jedoch nicht innerhalb der NFP konserviert ist.

Tabelle 1: Die Induktion der Fallenbildung durch unterschiedliche Bakterien in NFP.

	<i>D. flagrans</i> WT	<i>D. flagrans</i> ΔsofT	<i>A. conoides</i>	<i>A. musiformis</i>	<i>A. oligospora</i>	<i>D. stenobrocha</i>
<i>B. subtilis</i>	-	+	+	-	+	-
<i>P. strutzeri</i>	-	+	+	-	+	-
<i>E. cloacae</i>	-	+	+	-	+	-
<i>S. marcescent</i>	-	+	+	-	+	-
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	-

Die Bakterien-induzierte Fallenbildung ist in *D. flagrans* spezifisch für die ΔsofT , ΔhexA und ΔmakB Mutanten.

Um zu überprüfen, ob der verwendete *D. flagrans* Laborstamm die Fähigkeit zur Bakterien-induzierten Fallenbildung durch die Kultivierung im Labor verloren hat, wurden weitere *D. flagrans* Wildisolate und die Zellfusionsmutanten ΔmakB und ΔhexA mit *Delftia* und den Bakterien aus Tabelle 1 co-inkubiert. Auf Wasseragar wurde in den *D. flagrans* Wildisolaten CBS143.89 und CBS343.94 die Fallenbildung durch keines der getesteten Bakterien induziert (**Abb. 22**). Allerdings induzierten die Bakterien die Fallenbildung in den Mutanten ΔmakB und ΔhexA . Als nächstes wurde daher überprüft, ob es sich bei der Bakterien-induzierten Fallenbildung in *D. flagrans* um ein generelles Phänomen der Zellfusionsmutanten handelt. Dabei wurde beobachtet, dass ein weiteres Wildisolat, CBS565.50, eine Zellfusionsmutante ist, die jedoch nicht zur Fallenbildung durch die Bakterien induziert wird (**Abb. 23**). Das Isolat zeigte die typische verminderte Luftmyzelbildung, sowie den unvollständigen Ringschluss bei der Fallenbildung und das Fehlen vegetativer Hyphenfusionen. Dies deutet darauf hin, dass die Induktion daher spezifisch für die Signalwege von MakB, HexA oder SofT ist.

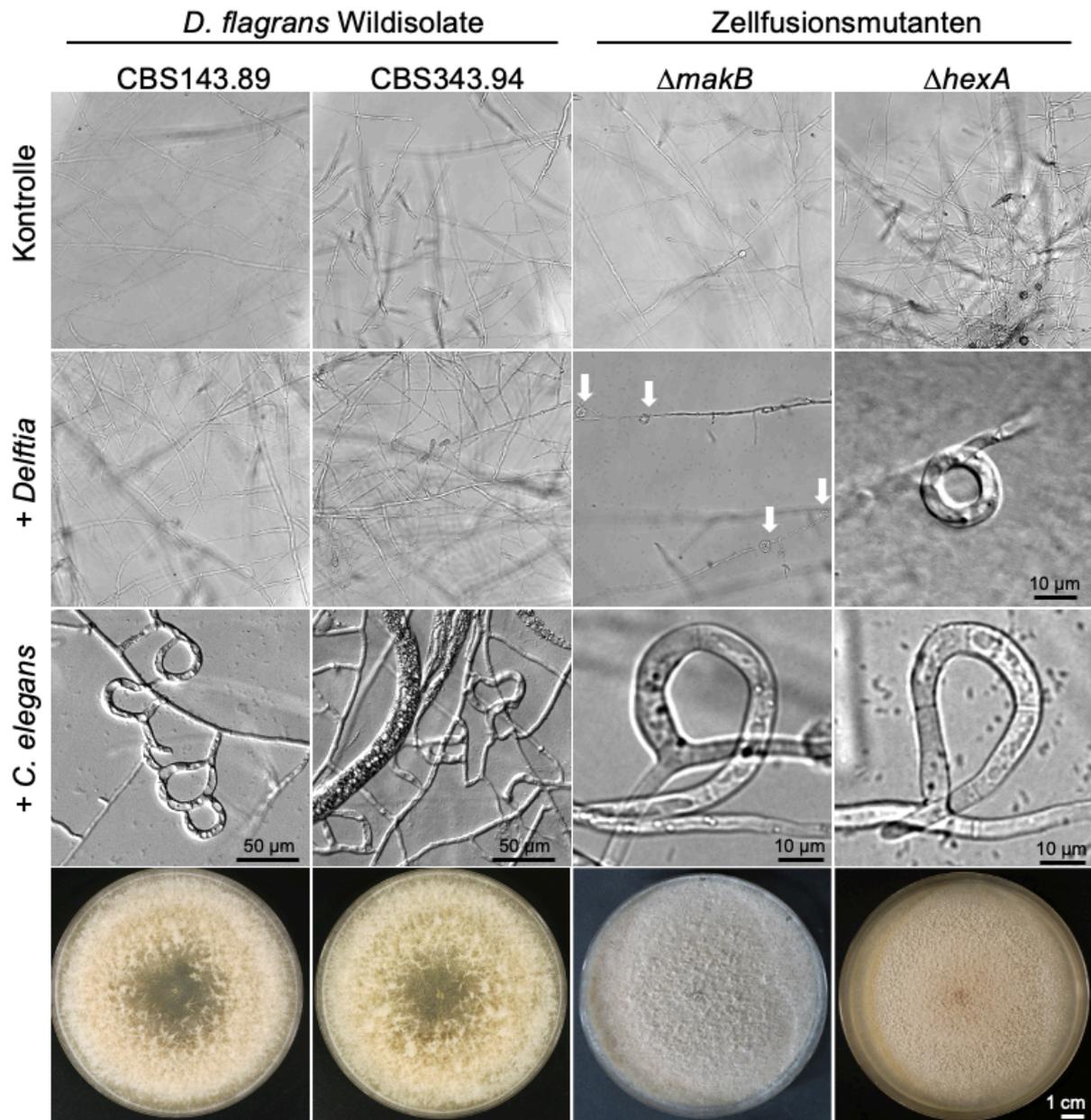


Abbildung 22: Die Induktion der Fallenbildung in unterschiedlichen *D. flagrans* Wildisolaten und den Zellfusionsmutanten $\Delta makB$ und $\Delta hexA$. Exemplarisch ist die Falleninduktion durch *Delftia* Bakterien dargestellt. Es wurden außerdem die Bakterien aus Tabelle 1 getestet. Auf Wasseragar induzierten die *Delftia* Bakterien in keinem getesteten Wildisolat die Fallenbildung, jedoch in den Mutanten $\Delta makB$ und $\Delta hexA$ (weiße Pfeile). Als Positivkontrolle wurde die Fallenbildung durch *C. elegans* Larven induziert. Als Negativkontrolle wurde dH₂O auf das jeweilige Pilzmyzel pipetiert. Die unterste Reihe zeigt das Wachstum der verwendeten Stämme nach 7 Tagen auf PDA.

Bisher sind über 70 Proteine bekannt, die bei der vegetativen Hyphenfusion in *N. crassa* notwendig sind (Fischer & Glass, 2019). Viele davon sind bekannte Ziele für Phosphorylierung für das MakB-orthologe MAK-2 oder die MAP-Kinase MAK-1 (Zellwandintegrität). HAM-10 ist ein weiteres, notwendiges Protein für die vegetative Hyphenfusion, besitzt jedoch keine bekannten Phosphorylierungsstellen für MAK-1 oder MAK-2 (Jonkers et al., 2014; Jonkers et al., 2016). Daher wurde das zu *ham-10*

orthologe Gen *hamA* in *D. flagrans* deletiert und die Gendeletionsmutante auf die Bakterien-induzierte Fallenbildung überprüft.

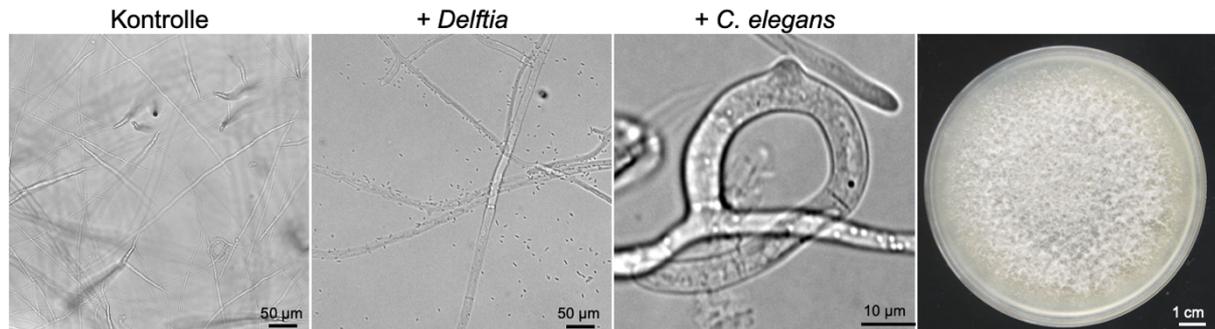


Abbildung 23: Das Wildisolat CBS565.50 ist eine Zellfusionsmutante und wird nicht durch *Delftia* zur Fallenbildung induziert. Pilzmyzel wurde für 24 Stunden auf Wasseragar bei 28 °C inkubiert und anschließend für weitere 72 Stunden mit den Bakterien co-Inkubiert. Als Kontrolle wurde die Fallenbildung durch *C. elegans* Larven induziert. Wachstum des Isolats nach 7 Tagen Inkubation auf PDA.

Mit Hilfe der Ähnlichkeitssuche BLAST und der *N. crassa* HAM-10 (NCU02833) Proteinsequenz als Abfragesequenz wurde das homologe Protein und dazugehörige Gen (DFL_005009) identifiziert. Mit Hilfe von homologer Rekombination wurde eine $\Delta hamA$ Gendeletionsmutante erstellt (**Abb. 24 A**). Insgesamt zeigten 5 Transformanten eine Resistenz gegenüber 100 µg/m Hygromycin-B auf PDA. Die Deletion von *hamA* wurde in einem Stamm über Southern Hybridisierung bestätigt. Die Gendeletionsmutante zeigte eine verminderte Luftmyzelbildung, vergleichbar zu den $\Delta sofT$, $\Delta makB$ und $\Delta hexA$ Mutanten, das Wachstum war jedoch etwas langsamer (**Abb. 24 B**). Es wurde keine vegetative Hyphenfusion mikroskopisch beobachtet und die Fallenbildung war wie bei den bisher beschriebenen Zellfusionsmutanten beim Ringschluss eingeschränkt (**Abb. 24 C - E**). Um zu überprüfen, ob in der $\Delta hamA$ Mutante Fallenbildung durch die Bakterien induziert wird, wurde Pilzmyzel auf Wasseragar mit den unterschiedlichen Bakterienarten für insgesamt vier Tage co-inkubiert. Dabei wurde keine Fallenbildung beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass in *D. flagrans* nicht alle essenziellen Proteine für die Zellfusion auch bei der Regulation der Bakterien-induzierten Fallenbildung eine Rolle spielen und spezifisch für die Signalkaskaden um MakB, SofT und HexA sind.

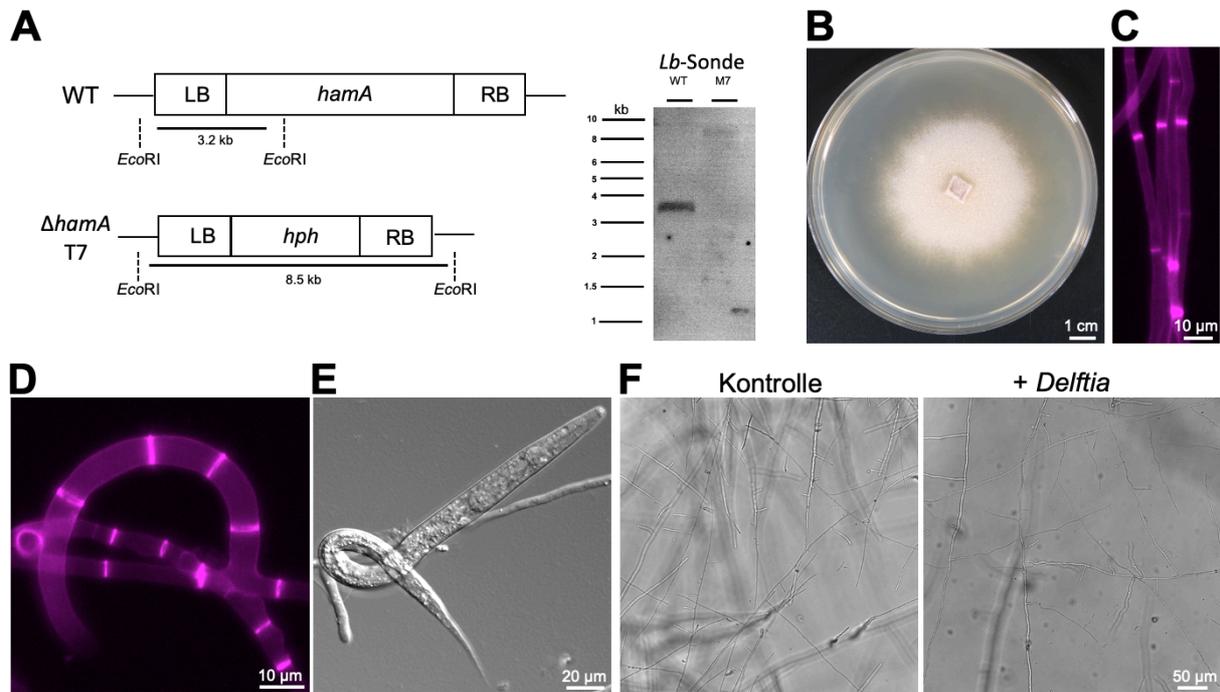


Abbildung 24: Deletion des Zellfusionsgens *hamA* führt zum Verlust der Hyphenfusion, jedoch zu keiner Bakterien-vermittelten Induktion der Fallenbildung. (A) Schematische Darstellung der zielgerichteten Deletion von *hamA* mit Hilfe von homologer Rekombination. Der *hamA* ORF wurde durch die *hph*-Resistenzkassette ersetzt. Rechts zeigt die Southern Blot Analyse von WT und Transformant T7. Genomische DNA wurde über Nacht mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut. Eine DNA-Sonde komplementär zur linken Flanke (Lb) hybridisierte im WT mit einem 3,2 kb großen Fragment und in Transformant T7 mit einem 8,5 kb großen Fragment. (B) Wachstum der $\Delta hamA$ Mutante auf PDA nach 7 Tagen Inkubation. (C) Die Deletion von *hamA* führte zum Verlust der vegetativen Hyphenfusion. (D) Die Deletion von *hamA* führte zum Verlust des Ringschlusses während der Fallenbildung. (E) Fallen der $\Delta hamA$ Mutante konnten weiterhin *C. elegans* Larven fangen und verdauen. (F) *Delftia* Bakterien induzierte keine Fallenbildung in der $\Delta hamA$ Mutante. Als Kontrolle wurde dH₂O auf das Pilzmyzel pipettiert. Die Zellwand des Myzels in C + D wurde mit CFW angefärbt.

Um Abhängigkeiten von SofT, HexA und MakB zu identifizieren, wurden die Proteine in den jeweiligen Gendelektionshintergründen lokalisiert (Abb. 25). Mikroskopische Analysen zeigten, dass MakB-mCherry unabhängig der anderen Proteine in Zellkernen lokalisierte. Weiterhin war die Lokalisation der Woronin Körper an septalen Poren durch die Deletion von *soft* oder *makB* nicht gestört. Lediglich die Lokalisation von GFP-SofT war durch die Deletion von *makB* oder *hexA* stark gestört, sodass keine Rekrutierung an die Plasmamembran, oder zytoplasmatische Akkumulation beobachtet wurden. Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass das Vorhandensein von SofT zu einer Repression der Bakterien-induzierten Fallenbildung führt.

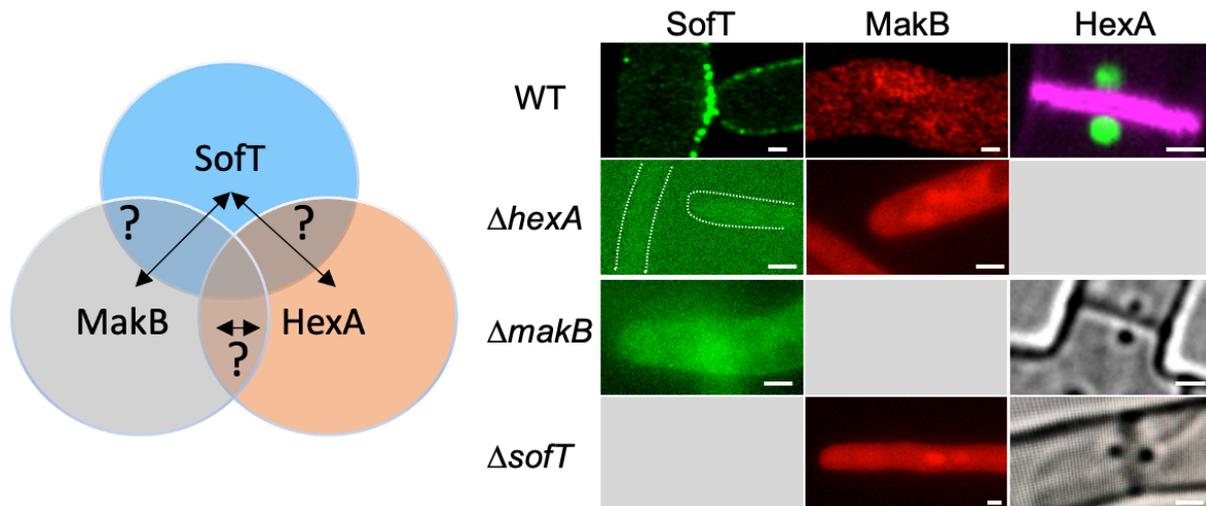


Abbildung 25: Abhängigkeiten der Lokalisation von SofT, MakB und HexA. Lokalisation von GFP-SofT, GFP-HexA, oder MakB-mCherry im angegebenen Stamm. Die Lokalisation der Woronin Körper wurde in der $\Delta makB$ und $\Delta sofT$ Mutante mit Hilfe des Differenzialinterferenzkontrast (DIC) Verfahrens am Septum lokalisiert. Maßstabsbalken zeigen 1 μ m an. Gestrichelte Linien zeigen Hyphenumrisse an.

SofT ist mit 1213 AA ein relativ großes Protein und besitzt eine konservierte WW-Domäne, deren Namen sich aus zwei konservierten Tryptophanresten (W) ableitet und Protein-Protein Interaktionen vermittelt (Engh et al., 2007). Weiterhin befindet sich eine putative Phosphatasedomäne am C-Terminus. In *A. oryzae* wurde gezeigt, dass unterschiedliche Teile des orthologen AoSO für bestimmte zelluläre Funktionen notwendig sind (Tsukasaki et al., 2016). Um für die Repression verantwortlichen Bereiche von SofT zu identifizieren, wurde die *D. flagrans* $\Delta sofT$ Mutante mit gekürzten Versionen des Proteins komplementiert, und mit *Delftia* Bakterien co-inkubiert. Drei gekürzte Genvarianten von *sofT* unter dem *sofT*-eigenen Promoter wurden in Protoplasten der $\Delta sofT$ Mutante transformiert (**Abb. 26 A**). Das erste Fragment codiert für den N-terminalen Bereich des Proteins (1 – 504 AA) ohne die konservierte WW-Domäne. Das zweite Fragment codiert für den N-terminalen Bereich des Proteins (1 – 540 AA) mit der konservierten WW-Domäne. Das dritte Fragment codiert für den C-terminalen Bereich des Proteins (534 – 1213) mit der putativen Phosphatase Domäne. Interessanterweise wurde die Fähigkeit zur Luftmyzelbildung, vegetativen Hyphenfusion und Repression der Bakterien-induzierten Fallenbildung lediglich durch das zweite Fragment des N-terminalen Bereichs mit WW-Domäne wiederhergestellt (**Abb. 26 B, C**). Durch die Komplementation mit dem dritten Fragment des C-terminalen Bereichs, oder des ersten Fragments des N-terminalen Bereichs ohne WW-Domäne wurden weiterhin Fallen nach Induktion durch *Delftia* ausgebildet. Dies deutet darauf hin, dass mögliche Interaktionspartner von SofT notwendig für die Repression der Bakterien-induzierten Fallenbildung sind.

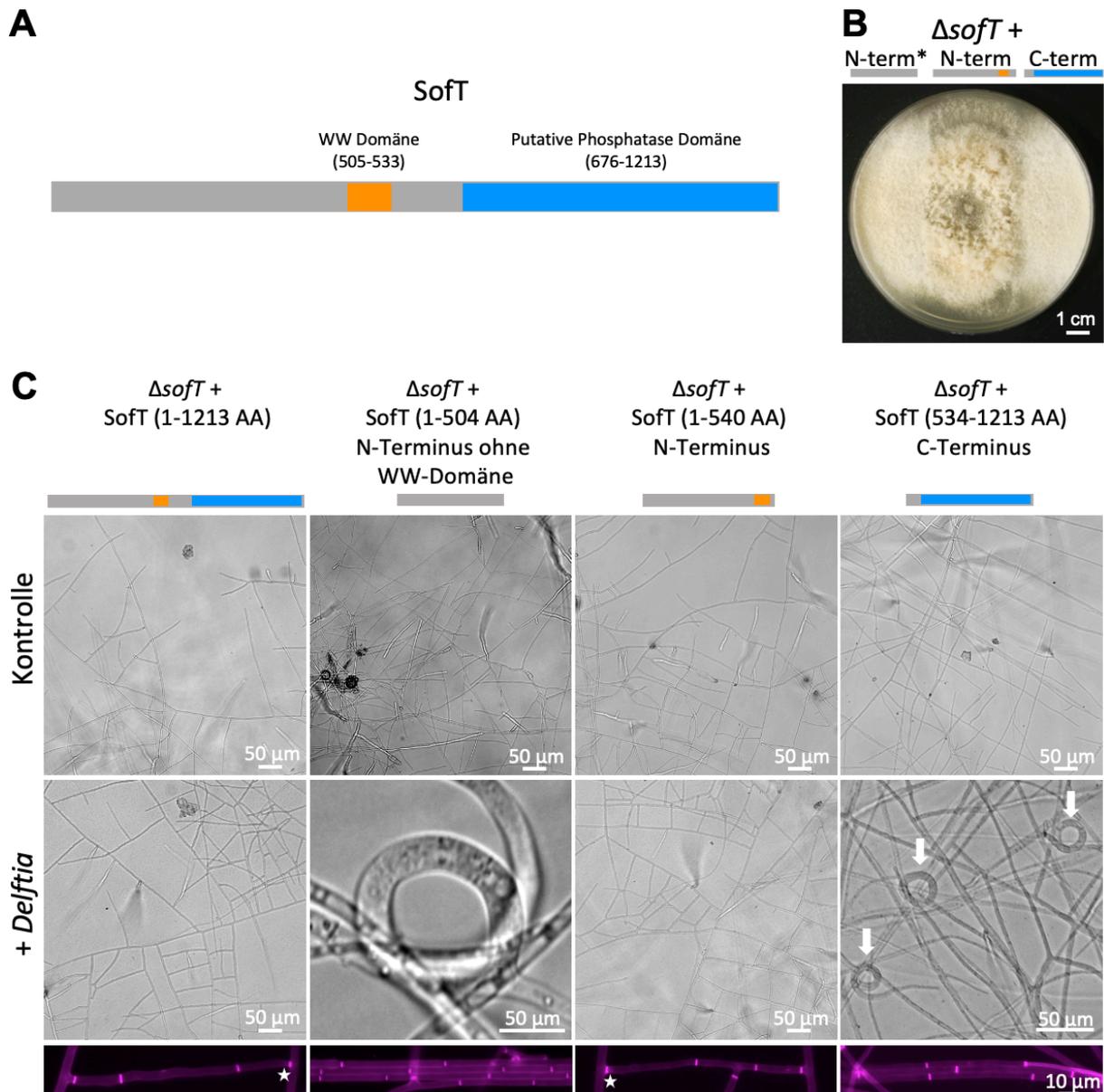


Abbildung 26: Die Expression des N-terminalen Teils von Soft inhibiert die *Delftia*-induzierte Fallenbildung der $\Delta soft$ Mutante. (A) Schematische Darstellung des Soft Proteins. (B) Auswirkungen auf das Wachstum auf PDA durch die Expression gekürzter soft Varianten in der $\Delta soft$ Mutante. (C) Auswirkungen auf das vegetative Hyphenwachstum und die *Delftia*-induzierte Fallenbildung durch die Expression gekürzter soft Varianten in der $\Delta soft$ Mutante. Pfeile markieren durch *Delftia*-induzierte Fallen. Sterne markieren Zellfusionen. Die Zellwand des Myzels wurde mit CFW gefärbt und ist in Magenta dargestellt.

Im Pilz *S. macrospora* wurde gezeigt, dass das Soft-orthologe PRO40 Gerüstprotein für den Zellwandintegritäts-regulierenden MAP-Kinase-Signalweg von MAK1 ist (Teichert et al., 2014). In *A. oligospora* wurde weiterhin gezeigt werden, dass das zu MAK1 orthologe SLT2 essenziell für die Fallenbildung ist (Zhen et al., 2018). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Signalweiterleitung des MAP-Kinase-Signalwegs in Abwesenheit von Soft in *D. flagrans* differentiell reguliert wird und es dadurch zur Bakterien-induzierten Fallenbildung kommt. Mit Hilfe von BLASTP und der

A. oligospora SLT2 als Abfragesequenz wurde das homologe Protein und dazugehörige Gen (DFL_005546) *makA* identifiziert. Um die Funktion der MAP-Kinase zu untersuchen, wurde das Gen mit Hilfe von homologer Rekombination deletiert (**Abb. 27 A**).

Insgesamt zeigten drei Transformanden eine Resistenz gegenüber 100 µg/ml Hygromycin-B auf PDA. Die Deletion von *makA* wurde in allen Stämmen über Southern Hybridisierung bestätigt. Alle drei Mutanten zeigten makroskopisch ein stark vermindertes Wachstum auf PDA, sodass für weitere Analysen Mutante T3 verwendet wurde (**Abb. 27 B**). Während in der Literatur die orthologen Proteine bei filamentösen Pilzen als essenziell für die Zellfusion beschrieben werden, wurde bei der *D. flagrans* Δ *makA* Mutante weiterhin vegetative Hyphenfusionen beobachtet (**Abb. 27 C**). Als nächstes wurde die Fähigkeit zur Fallenbildung der Mutante untersucht. Die Mutante zeigten ein stark vermindertes Wachstum auf LNA, die Fallenbildung wurde jedoch nach 7-tägiger Co-Inkubation mit *C. elegans* beobachtet, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die MAPK MakA in *D. flagrans* nicht essenziell für die Fallenbildung ist (**Abb. 27 D**). Bakterien induzierten jedoch nicht die Fallenbildung der Δ *makA* Mutante, was daraufhin hindeutet, dass weitere *upstream* liegende Signalwege notwendig für diese Art der Induktion sind.

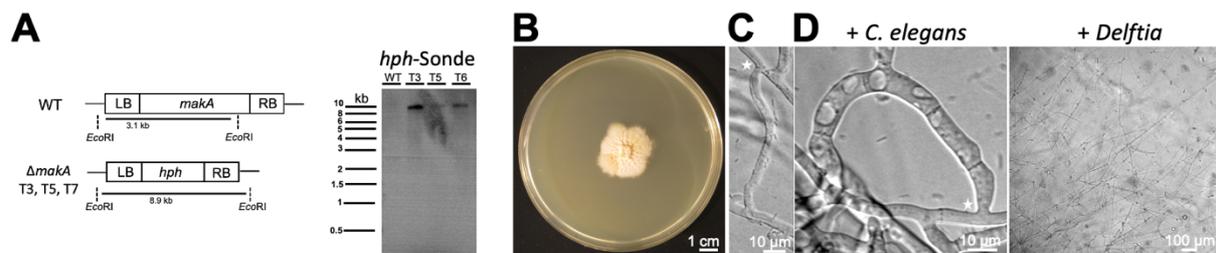


Abbildung 27: Deletion der MAP-Kinase MakA führt zu keiner *Delftia*-vermittelten Induktion der Fallenbildung. (A) Schematische Darstellung der gezielten Deletion von *makA* durch homologe Rekombination. Der *makA* ORF wurde durch die *hph*-Resistenzkassette ersetzt. Rechts zeigt die Southern Blot Analyse von WT und den Transformanden T3, T5, und T6. Genomische DNA wurde über Nacht mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut. Eine DNA-Sonde komplementär zur *hph*-Resistenzkassette hybridisierte in den Transformanden T3, T5 und T6 mit einem 8,9 kb großen Fragment. Für weitere Analysen wurde Transformant T3 verwendet. (B) Wachstum der Δ *makA* Mutante auf PDA nach 7 Tagen Inkubation. (C) Vegetative Hyphenfusion in der Δ *makA* Mutante ist durch einen Stern markiert. (D) Nach 7 Tagen co-Inkubation mit *C. elegans* wurden Fallen in der Δ *makA* Mutante beobachtet. Nach 7 Tagen co-Inkubation mit *Delftia* wurden keine Fallen in der Δ *makA* Mutante beobachtet.

In *S. macrospora* wurde gezeigt, dass das SofT-orthologe PRO40 den MAK1 Signalweg mit dem *upstream* Aktivator Proteinkinase C (Pkc) verbindet (Teichert et al., 2014). Des Weiteren war das orthologe Pkc-Gen im NFP *D. stenobrocha* bei Kontakt mit Nematoden stark exprimiert (Liu et al., 2014). Deshalb wurde die Hypothese

entwickelt, dass die Pkc Signalweiterleitung in *D. flagrans* eine Rolle bei der Fallenbildung spielt. Pkc-Isoformen können in allen Eukaryoten identifiziert werden, und besitzen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion, Zellwachstum und Entwicklung (Newton, 2018). In Pilzen besteht das Protein aus einer regulatorischen N-terminalen und einer katalytischen C-terminalen Domäne (Heinisch & Rodicio, 2017). Mit Hilfe der Ähnlichkeitssuche BLAST und der *S. macrospora* PKC1 (SMAC_04666) als Abfragesequenz wurden zwei homologe Proteine und die dazugehörigen Gene (DFL_006217 und DFL_006218) identifiziert. Die Analyse der konservierten Proteindomänen zeigte dabei, dass es sich bei DFL_006217 um den regulatorischen N-terminalen Bereich der Pkc handelt, während DFL_006218 aus der Sequenz der C-terminalen Kinase-Domäne besteht. Ähnlichkeitssuchen zur *A. oligospora* orthologen Pkc (EYR41_003685) zeigten, dass dort das orthologe Protein die konservierten Domänen beider *D. flagrans* Varianten besitzt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um einen Annotationsfehler handelt und beide ORFs für die vollständige Version der Pkc notwendig sind. Im Folgenden wird die Pkc in *D. flagrans* als PkcA betitelt.

Um die Rolle von PkcA während der Fallenbildung zu untersuchen, wurde diese mit Hilfe von mCherry und dem natürlichen Promoter in der $\Delta soft$ Mutante lokalisiert. PkcA-mCherry lokalisierte an sich bildenden Septen und an Hyphenspitzen (**Abb. 28**). In sich bildenden Fallen wurde zwar eine stärkere Fluoreszenz an der Hyphenspitze beobachtet, deren Lokalisation sich jedoch nicht von vegetativen Hyphen unterschied.

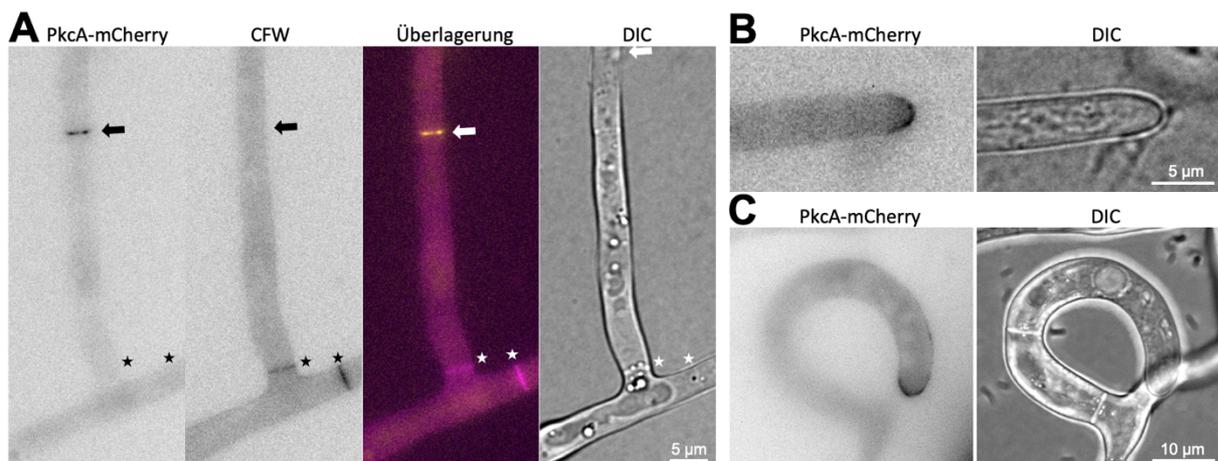


Abbildung 28: Lokalisation von PkcA-mCherry während der Septierung und Hyphenspitze der $\Delta soft$ Mutante. (A) PkcA-mCherry lokalisierte während der Septierung (durch Pfeil markiert). An reifen Septen (durch Sterne und CFW-Färbung markiert) kann keine Fluoreszenz detektiert werden. (B + C) An der Spitze vegetativer und Fallenhypen lokalisiert PkcA-mCherry kuppelartig.

Die meisten Pilze besitzen eine essenzielle Kopie im Genom, deren Deletion letal ist (Jackson-Hayes et al., 2019). Um die Funktion von PkcA in *D. flagrans* weiterhin zu

untersuchen, wurde dem Pilzmyzel der bekannte Pkc-Inhibitor Chelerythrinchlorid zugegeben. Der chemische Inhibitor konkurriert um das konservierte katalytische Zentrum (Penn et al., 2015). Es ist bekannt, dass die Keimung von Sporen durch die Inhibierung von Pkc verhindert wird. Deshalb wurde eine inhibierende Konzentration für *D. flagrans* bei der Keimung der Konidien getestet. Bei einer Konzentration von 12,5 µM Chelerythrinchlorid blieb die Keimung der Sporen aus. Um die Rolle von PkcA bei der Fallenbildung zu untersuchen, wurden 1000 Wildtyp-Konidien auf LNA für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden circa 200 synchronisierte L3 Larven bei unterschiedlichen Konzentrationen Chelerythrinchlorid zugegeben und für weitere 24 Stunden inkubiert. Ab einer Konzentration von 50 µM Chelerythrinchlorid wurde die Fallenbildung im Vergleich zur Lösemittelkontrolle vollständig inhibiert (**Abb. 29 A**). Vegetative Hyphen wuchsen trotz Zugabe des Inhibitors weiter.

Um die Bakterien-induzierte Fallenbildung der $\Delta soft$ Mutante zu testen, wurden 1000 Sporen auf LNA für 24 Stunden inkubiert und anschließend Bakterien der Gattung *Delftia* bei einer Chelerythrinchlorid Konzentration von 50 µM zugegeben. Auch hier wurde interessanterweise die Fallenbildung durch die Zugabe des Inhibitors vollständig reprimiert (**Abb. 29 B**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PkcA eine wichtige Rolle bei der Fallenbildung besitzt, die jedoch unabhängig von Nematoden- oder Bakteriensignal ist.

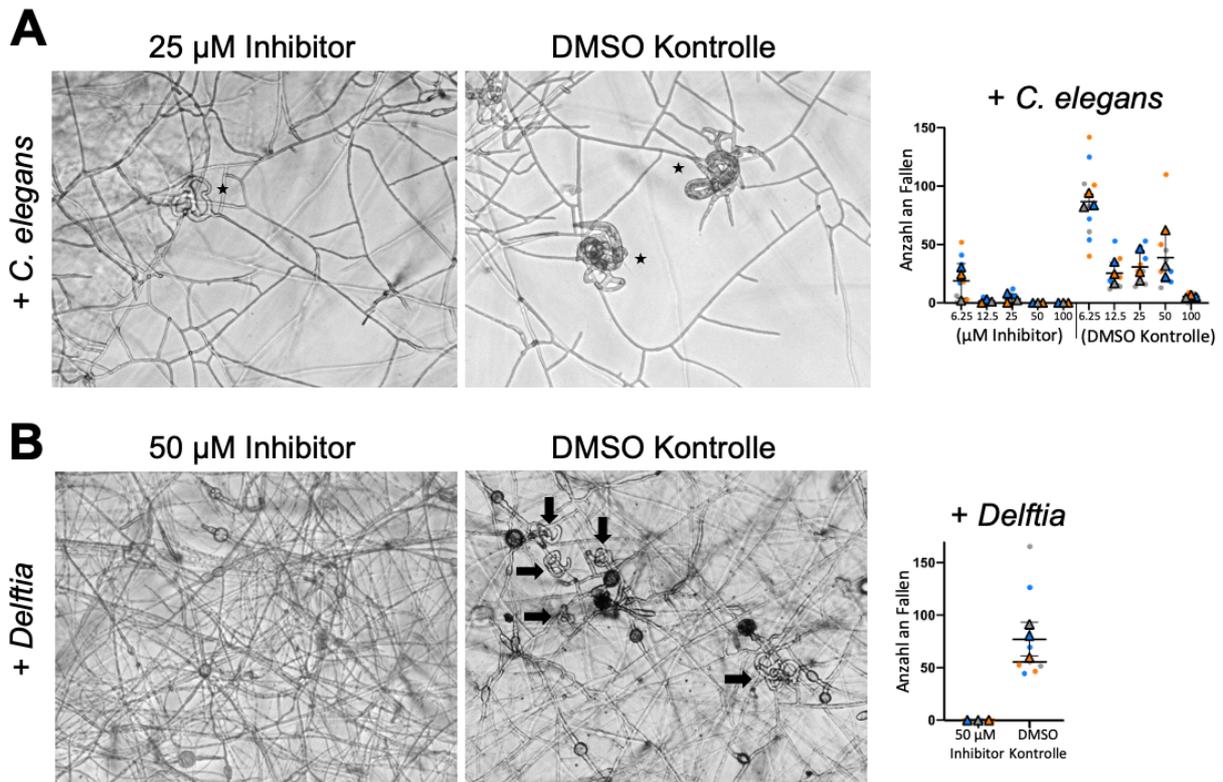


Abbildung 29: Chemische Inhibierung von PkcA führt zum Verlust der Fallenbildung. (A) Das Diagramm zeigt die Anzahl der durch *C. elegans* Larven induzierten Fallen in *D. flagrans* WT bei Vorhandensein des PkcA Inhibitors Chelerythrinchlorid bei unterschiedlicher Konzentration. Der Inhibitor wurde nach 24 Stunden Inkubation des Myzels in unterschiedlichen Konzentrationen und circa 200 synchronisierten *C. elegans* L3 Larven auf das Myzel gegeben und für 24h co-inkubiert. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) in der jeweiligen Konzentration zugegeben. Mikroskopische Aufnahmen zeigen die Fallenbildung (durch Sterne markiert). (B) Die Anzahl der durch *Delftia*-induzierten Fallen in *D. flagrans* Δsoft bei Vorhandensein des PkcA Inhibitors Chelerythrinchlorid. Der Inhibitor (50 μM) wurde nach 24h Inkubation des Myzels mit den Bakterien auf das Myzel gegeben und für 24h co-inkubiert. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO zugegeben. Mikroskopische Aufnahmen zeigen die Fallenbildung (durch Pfeile markiert).

3.4 Der STRIPAK Komplex in *D. flagrans*

Die Krümmung und schlussendliche Ringbildung der Falle ist ein faszinierendes Phänomen, welches bisher kaum verstanden ist. Sie ist jedoch vergleichbar mit dem spiralförmigen Wachstum von Ascogonien oder der Crozier-Bildung. In *S. macrospora* wurde gezeigt, dass der STRIPAK Komplex für die Ascogonienbildung benötigt wird (Bloemendal et al., 2010).

Deshalb wurde in diesem Teil der Arbeit die Rolle des STRIPAK Komplexes während der Fallenbildung untersucht.

***D. flagrans* besitzt orthologe Proteine des STRIPAK Komplexes**

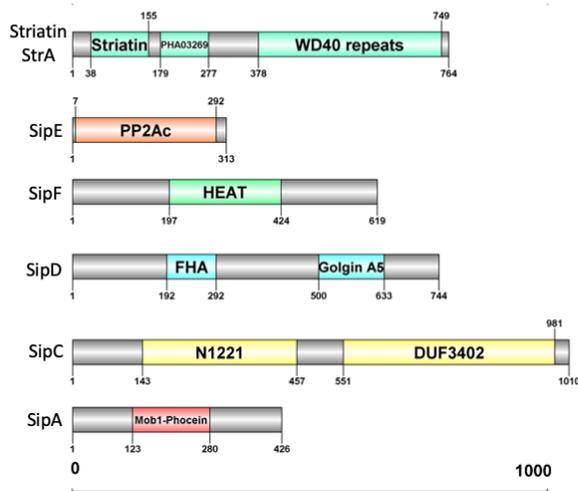
Mit Hilfe von Protein-BLAST wurden orthologe Proteine zu den *S. macrospora* STRIPAK Komponenten PRO11, PP2AA, PP2Ac1, PRO22, SmMOB3, PRO45, SmKIN3 und SmKIN24 identifiziert (**Abb. 30 A**). Diese besitzen die charakteristischen konservierten Domänen, was darauf hinweist, dass *D. flagrans* einen funktionellen STRIPAK Komplex besitzt. Gemäß der Nomenklatur in *A. nidulans* wurden die identifizierten STRIPAK homologen Striatin StrA und Stra interagierende Proteine (SipA-F) genannt. Das Striatin StrA (DFL_002622; 764 AA) besitzt die konservierte Striatin Domäne bestehend aus einer Caveolin-Bindedomäne und einer Calmodulin-Bindedomäne. Zusätzlich befinden sich WD40 Repeats am C-Terminus. SipA (DFL_000993; 426 AA) ist das orthologe zu Mob3 (Phocein) mit der konservierten Mob1-Phocein Domäne. Das orthologe von STRIP1/2 ist SipC (DFL_007682; 1010 AA) und enthält eine putative Domäne der N1221-Familie und eine Domäne mit unbekannter Funktion (DUF3402). Das SLMAP-Protein SipD (DFL_001177; 744 AA) besitzt eine *forkhead-associated* (FHA) Domäne. Das orthologe Proteine der katalytischen Untereinheit der Phosphatase PP2Ac SipE (DFL_003255; 313 AA) enthält die katalytische Domäne der Proteinphosphatase 2A. Das Ortholog der Phosphatase-regulatorischen Untereinheit PP2AA SipF (DFL_008478; 619 AA) besitzt HEAT Repeats (*Huntingtin*, *elongation factor 3*, *protein phosphatase 2A*, and the yeast kinase *TOR1*). Zwei mutmaßliche *germinal center* Kinasen DFL_002427 und DFL_007266 wurden identifiziert. Es wurde kein Ortholog für SipB (SCI1) identifiziert.

STRIPAK *sipC* (STRIP1/2) Expression

Als ersten Schritt der Charakterisierung des STRIPAK Komplexes in *D. flagrans* wurde *sipC* (STRIP1/2; PRO22) analysiert. Der 3528 nt lange ORF ist durch neun Introns unterbrochen, die durch RNAseq-Daten überprüft wurden. Um zu testen, ob sich die Expression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien unterscheidet, wurde ein mikroskopischer Reporterassay verwendet. Dazu wurde die Sequenz des *sipC*-Promoters mit der codierenden Sequenz für *mCherry* fusioniert, welches weiterhin mit dem ORF codierend für das Histon 2B (H2B) verknüpft war. Falls der Promoter aktiv ist, können dadurch rot-fluoreszierende Zellkerne beobachtet werden. Als interne Kontrolle wurde das fluoreszierende Reportergen *H2B::GFP* unter dem *H2B*-Promoter exprimiert. Die Expression von *sipC* war sehr schwach. Es wurde keine Fluoreszenz in Hyphen vier Stunden nach dem Auskeimen der Konidien, oder in den ersten

10 – 30 µm der Hyphenspitzen beobachtet (**Abb. 30 B**). Eine schwache Fluoreszenz war zu erkennen, sobald erste Septen oder Hyphenverzweigungen auftraten. Stärkere Expression wurde in älteren Teilen des Myzels beobachtet (16 Stunden Inkubation). Während der Fallenbildung kam es zu keiner Veränderung der Expression, sodass diese vergleichbar mit der Expressionsstärke in älterem Myzel war. Diese Daten deuten darauf hin, dass SipC während der Septierung und Hyphendifferenzierung eine Rolle spielt.

A



B

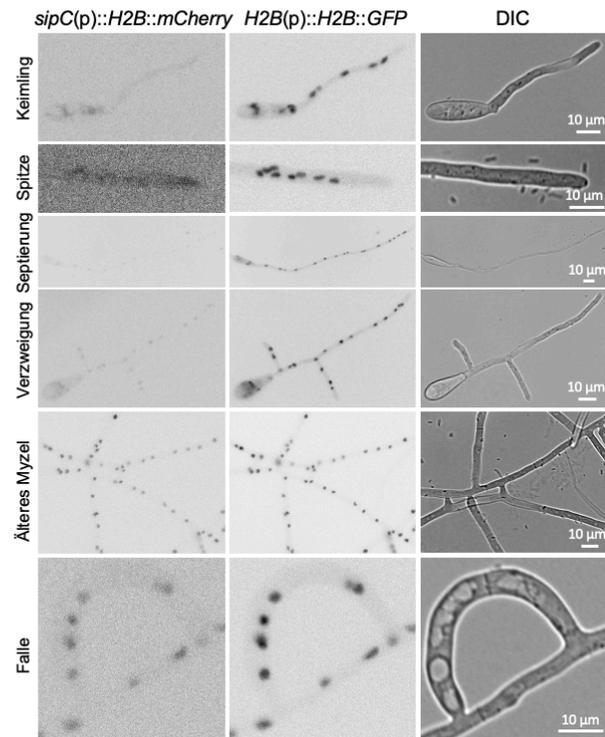


Abbildung 30: Schematische Darstellung der *D. flagrans* STRIPAK orthologen Proteine und die Expression von *sipC* in Hyphen und Fallen. (A) Schematische Darstellung der Domänen der einzelnen *D. flagrans* STRIPAK Komponenten. Die Anzahl der Aminosäuren und Domännennamen sind angegeben. Abkürzungen; WD40, *WD or beta-transducin repeat sequence*; FHA, *forkhead-associated*; HEAT, *Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, and the yeast kinase TOR1*; Mob1, *monopolar spindle one-binder protein*; N1221, *acidic domain with possible transmembrane domains*; DUF3402, *domain of unknown function 3202*; PHAO03269, *envelope and glycoprotein C*. (B) Visualisierung der *sipC* Expression mit Hilfe eines H2B-mCherry Reporterkonstrukt. Die Expression von H2B::GFP unter dem H2B Promoter diente als interne Kontrolle. Belichtungszeit: mCherry 300ms, GFP 200ms

***sipC* wird für das vegetative Wachstum und Septierung benötigt**

Aufgrund der *sipC* Expression während der Septierung, wurde als nächstes eine *sipC*-Gendelektionsmutante mit Hilfe von homologer Rekombination erstellt. 29 Hygromycin-B resistente Transformanten wurden mittels PCR und Southern Analyse überprüft. Eine Transformante zeigte die erwartete Integration des Deletionskonstrukts und wurde für die weiteren Analysen verwendet (**Abb. 31 A**).

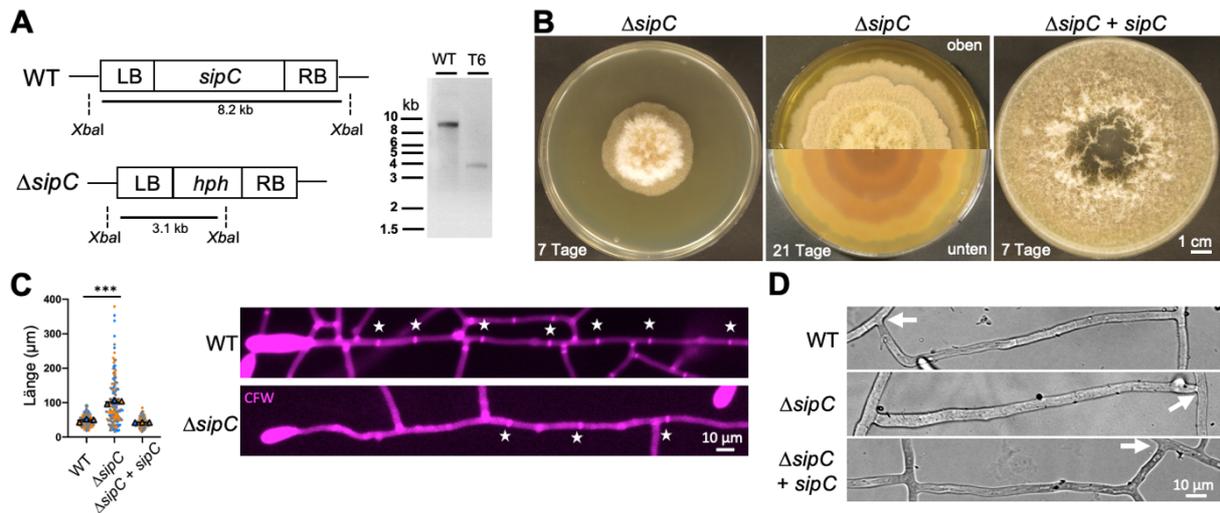


Abbildung 31: Die Deletion von *sipC* beeinträchtigt das vegetative Wachstum und die Septierung. (A) Gezielte Deletion des *sipC* Gens mit Hilfe von homologer Rekombination. Der *sipC* ORF wurde durch die *hph*-Resistenzkassette ersetzt. Rechts zeigt die Southern Blot Analyse von WT und dem Transformant T6. Genomische DNA wurde über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Xba*I verdaut. Eine DNA-Sonde komplementär zur linken Flanke (LB) hybridisierte mit einem 3,1 kb großen Fragment im WT und mit einem 8,2 kb großen Fragment im Transformant T6. (B) Wachstum der $\Delta sipC$ Mutante und Komplementation auf PDA nach 7 Tagen. Zusätzlich ist eine Darstellung von oben und unten nach 21 Tagen Wachstum der $\Delta sipC$ Mutante auf PDA gezeigt. (C) Septierung des vegetativen Myzels des WT, der $\Delta sipC$ Mutante und der Komplementation. Die Zellwand wurde durch CFW markiert und in Magenta dargestellt. Quantifizierung der Kompartiment-Länge in den unterschiedlichen Stämmen. Jedes biologische Replikat ist farblich markiert (orange, blau, grau). Einzelne Datenpunkte sind als Punkte markiert, der Durchschnitt als Dreiecke. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (D) Vegetative Hyphenfusion in WT, $\Delta sipC$ Mutante und Komplementation sind mit Pfeilen markiert. *** $P < 0,0001$, ungepaarter t-Test.

Die Deletion von *sipC* führte zu einer starken Beeinträchtigung des vegetativen Wachstums der Kolonie. Während beim WT eine 9 cm Petrischale mit PDA nach 7 Tagen vollständig bewachsen war, benötigte die $\Delta sipC$ Mutante etwa 21 Tage (Abb. 31 B). Ein charakteristisches Merkmal von *D. flagrans* ist die Bildung von Luftmyzel auf PDA. Dies war bei der $\Delta sipC$ Mutante lediglich auf die ersten 1-2 cm der Inokulationsstelle beschränkt. Zusätzlich zeigte die $\Delta sipC$ Mutante ein 1 cm großes ringartiges Wachstumsmuster auf PDA. Die beobachteten Merkmale wurden durch die Transformation des vollständigen *sipC* Gens einschließlich der 5'- und 3'- regulatorischen Elemente komplementiert.

Da eine höhere Expression von *sipC* während der Septierung beobachtet werden konnte, wurde die Septierung der $\Delta sipC$ Mutante nach 24-stündiger Inkubation auf LNA untersucht (Abb. 31 C). Im Allgemeinen war das Wachstum der $\Delta sipC$ Mutante langsamer im Vergleich zum WT und dem Komplementationsstamm. Während Kompartimente im WT und im *sipC*-Komplementationsstamm eine Länge von $48,5 \pm 5 \mu\text{m}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung (SD)), beziehungsweise $42,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ besaßen, waren Kompartimente der $\Delta sipC$ mit einer Länge von $102 \pm 5 \mu\text{m}$ etwa verdoppelt ($n = 150$). Die Abstände waren auch nach 24 weiteren Stunden Inkubation

noch vorhanden, sodass eine stark verminderte Anzahl an Septen in der $\Delta sipC$ Mutante vorhanden waren. Die häufigsten Septen wurden an Verzweigungen beobachtet. Interessanterweise wurde in der $\Delta sipC$ Mutante weiterhin vegetative Hyphenfusion beobachtet, wohingegen die $\Delta pro22$ Mutante in *S. macrospora* und $\Delta ham-2$ Mutante in *N. crassa* dazu nicht mehr in der Lage waren (**Abb. 31 D**; Bloemendal et al., 2010; Xiang et al., 2002). Die Häufigkeit der vegetativen Hyphenfusion war jedoch aufgrund des schlechten Wachstums nicht mit dem WT zu vergleichen.

SipC wird für die asexuelle Entwicklung und Chlamydosporen Morphologie benötigt

Die Deletion von *sipC* beeinflusste die Anzahl an asexuellen Konidien stark, was zu einer Verringerung von 80 % der Konidien bei 7-Tage alten Kulturen führte (**Abb. 32A**). Weiterhin war die auf LNA produzierte Chlamydosporenmenge nach drei Tagen Inkubation um 88 % reduziert. Bemerkenswerterweise war die Morphologie der Chlamydosporen drastisch verändert, was zu 71 % stark verlängerten und vergrößerten Sporen in der Mutante führte (N = 3) (**Abb. 32 B, C**). Während im Wildtyp Chlamydosporen eine runde Form mit einem Durchmesser von $22,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$ besitzen, hatten die Chlamydosporen der $\Delta sipC$ Mutante eine Länge von $33,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$. Trotzdem waren die Sporen noch keimungsfähig. Chlamydosporen werden im älteren Myzel gebildet, indem das Zytoplasma in einem Kompartiment zu einer dickwandigen Spore kondensiert. Diese Bildung ist in der $\Delta sipC$ Mutante gestört, da der Abstand zwei benachbarter Septen stark vergrößert ist.

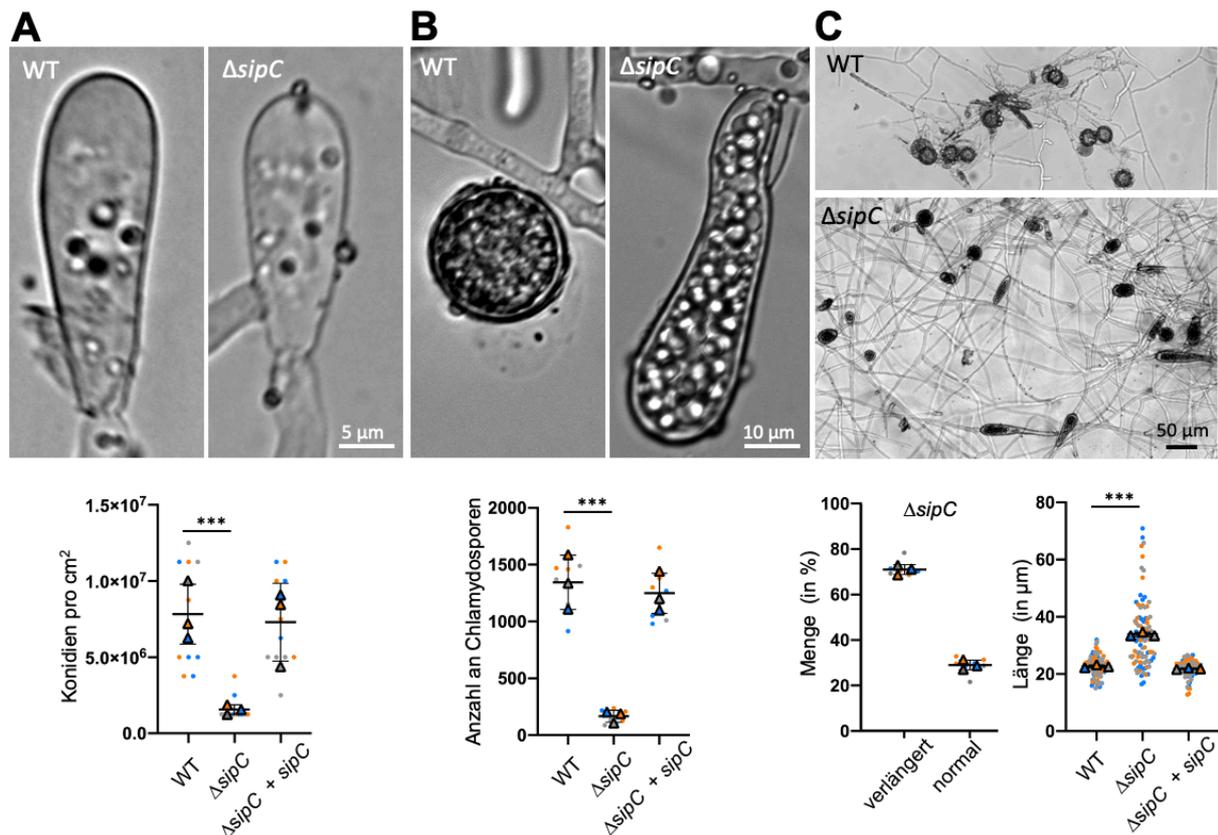


Abbildung 32: SipC wird für die asexuelle Entwicklung und Chlamydosporenmorphogenese benötigt. (A) Mikroskopische Aufnahmen von Konidien des WT und der $\Delta sipC$ Mutante. Quantifizierung der Konidienanzahl in WT, $\Delta sipC$ Mutante und Komplementation. (B) Mikroskopische Aufnahmen der Chlamydosporen des WT und der $\Delta sipC$ Mutante. Quantifizierung der Chlamydosporenanzahl in WT, $\Delta sipC$ und Komplementation. (C) Übersicht der Chlamydosporen von WT und $\Delta sipC$ Mutante. Quantifizierung der Chlamydosporenmorphologie der $\Delta sipC$ Mutante und Vergleich der Chlamydosporenlänge in WT, $\Delta sipC$ Mutante und Komplementation. Jedes biologische Replikat ist farblich markiert (orange, blau, grau). Einzelne Datenpunkte sind als Punkte markiert, der Durchschnitt als Dreiecke. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. *** $P < 0,0001$, ungepaarter t-Test.

SipC beeinflusst die korrekte Fallenbildung

Um die Fallenbildung des $\Delta sipC$ Stammes zu untersuchen, wurden Sporen auf LNA mit *C. elegans* für mindestens 24 Stunden co-inkubiert. Während im WT und der Komplementation hauptsächlich ringförmige, dreizellige Fallen beobachtet wurden, war die Fallenbildung in der $\Delta sipC$ Mutante stark gestört (Abb. 33 A, B). Die Ringkrümmung war häufig unvollständig, was zur Bildung von säulenartigen Fallen führte. Die Anzahl an Zellkernen in den Fallen von WT und $\Delta sipC$ Mutante zeigte keinen offensichtlichen Unterschied (Abb. 33 C).

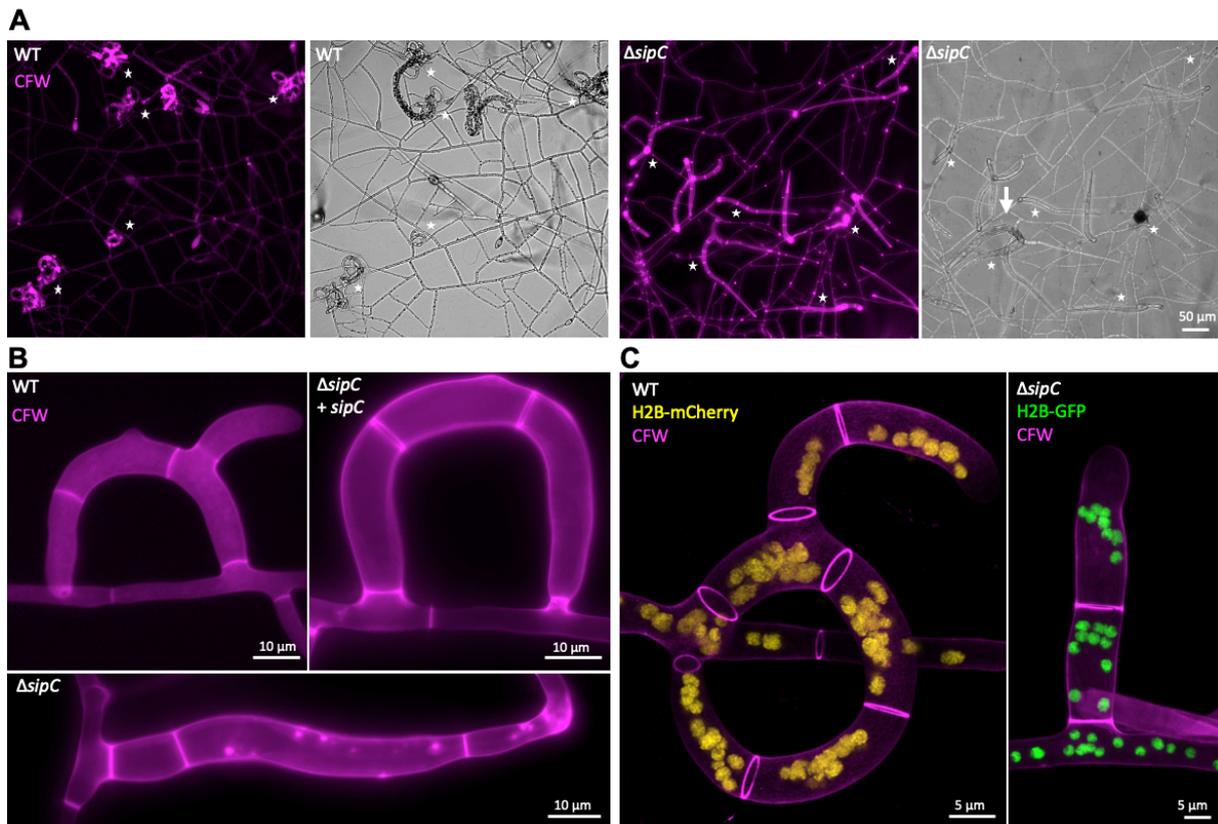


Abbildung 33: SipC wird für die korrekte Fallenbildung benötigt. (A, B) Vergleich der Fallenbildung in WT, $\Delta sipC$ Mutante und Komplementation. Sterne markieren Fallen. Eine gefangene *C. elegans* Larve wird durch einen Pfeil markiert. (C) Lokalisation der Zellkerne von Fallen in WT und der $\Delta sipC$ Mutante. Die Zellkerne im WT wurden durch die Expression von H2B-mCherry markiert (Dargestellt in Gelb). Die Zellkerne in der $\Delta sipC$ Mutante wurden durch die Expression von H2B-GFP markiert (Dargestellt in Grün). Die Zellwand wurde durch CFW markiert und ist in Magenta dargestellt.

Die Fallen der $\Delta sipC$ Mutante wurden in vier Gruppen nach ihrer Morphologie unterteilt (**Abb. 34 A**). Von den quantifizierten Fallen zeigten $77 \pm 2 \%$ eine Säulen-ähnliche (I) Morphologie, $13 \pm 3 \%$ eine Ring-ähnliche Morphologie ohne Zellfusion (II), $8 \pm 1 \%$ eine 90 Grad Kurve (III), und $1 \pm 1 \%$ einen mit Ring mit Zellfusion (IV) (drei biologische Replikate mit $n = 224$, $n = 156$ und $n = 276$, **Abb. 34 B**). Im Gegensatz dazu wurden hauptsächlich Fallen der Gruppe II und IV in WT und Komplementation identifiziert. Normalerweise besteht eine Ringfalle aus drei bis vier Kompartimenten, bevor sie mit der benachbarten Basalhyphe verschmilzt. Viele Fallenkompartimente der $\Delta sipC$ Mutante waren jedoch stark verlängert wie im vegetativen Myzel. Interessanterweise wechselten die verlängerten Fallenzellen oft zu einem vegetativen Wachstum nach einem oder maximal drei Fallenkompartimenten. Dies wurde durch den Übergang zu einem dünneren Hyphendurchmesser angezeigt. Der Wechsel der Fallenidentität wurde weiterhin durch die Expression der mit mCherry markierten, Fallen-spezifischen Serinprotease P12 (DFL_008096) in WT und der $\Delta sipC$ Mutante bestätigt (**Abb. 34 C**). Serinproteasen wurden als wichtige Virulenzfaktoren in NFP identifiziert und die

Expression der orthologen Gene in *A. oligospora* nach Kontakt mit *C. elegans* stark hochreguliert (Yang et al., 2011; Zhen et al., 2018). P12-mCherry lokalisierte in dynamischen Punkten in den Fallen von WT und der $\Delta sipC$ Mutante. Der Verlust der Fallenidentität in Fallen der $\Delta sipC$ Mutante wurde durch das Fehlen der Fluoreszenz angedeutet. Trotz der morphologischen Unterschiede waren die Fallen der $\Delta sipC$ weiterhin in der Lage, Nematoden zu fangen und zu verdauen (**Abb. 34D**).

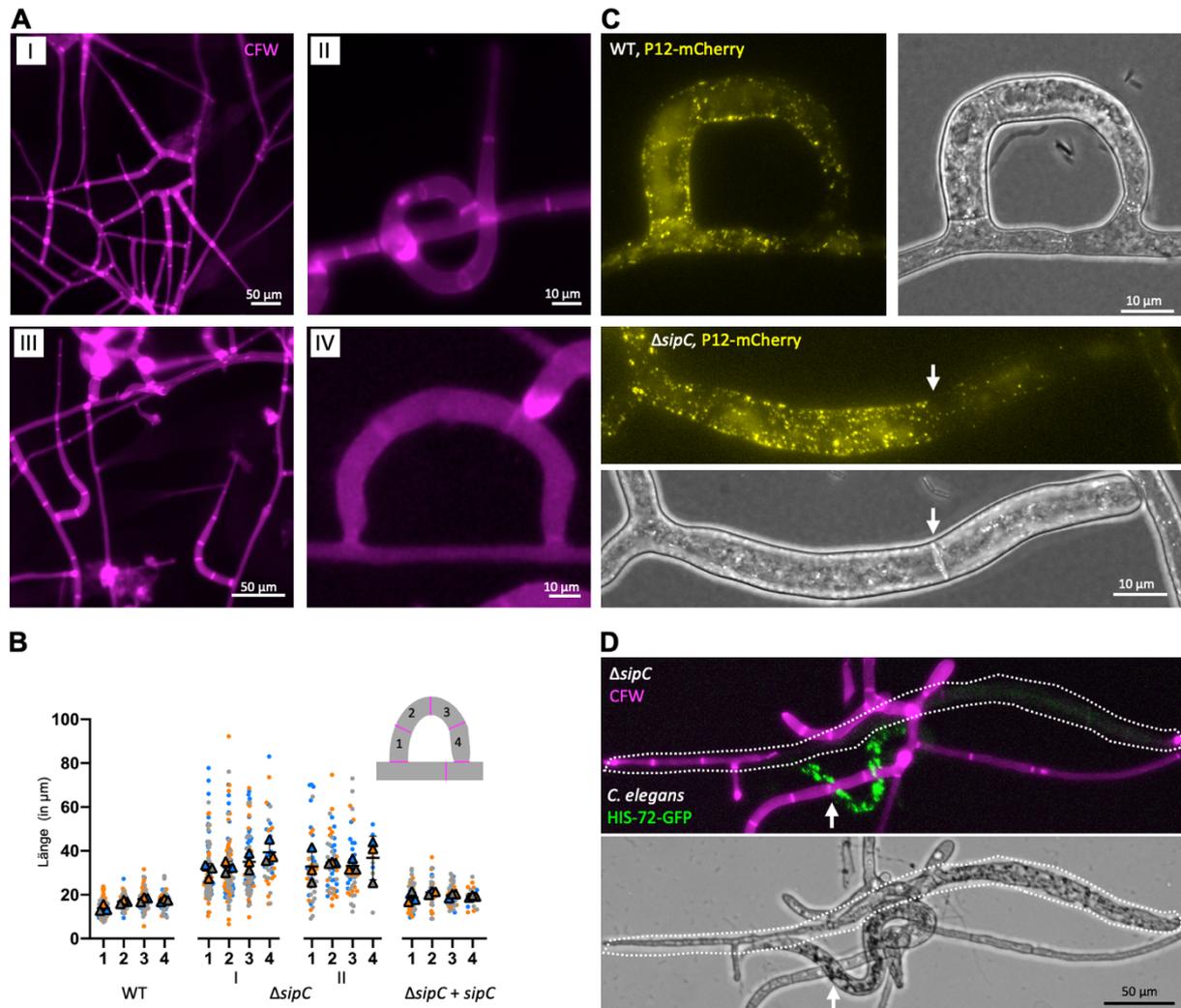


Abbildung 34: SipC bestimmt die Fallenmorphologie und Identität. (A) Fallen der $\Delta sipC$ Mutante wurden in vier Gruppen nach ihrer Morphologie eingeteilt. I, Säulen-ähnliche Fallen; II, Ring-ähnliche Fallen; 90 Grad Kurven; IV, Ringe mit Zellfusion. (B) Quantifizierung der Kompartimentslänge von Fallen in WT, $\Delta sipC$ Mutante und Komplementation. Die Länge von vier Kompartimenten wurde gemessen. In der $\Delta sipC$ Mutante wurde die Quantifizierung der am häufigsten vorkommenden Gruppen I und II durchgeführt. Jedes biologische Replikat ist farblich markiert (orange, blau, grau). Einzelne Datenpunkte sind als Punkte markiert, der Durchschnitt als Dreiecke. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (C) C-terminale mCherry Markierung der Serinprotease P12 (markiert in Gelb) in WT und der $\Delta sipC$ Mutante. Der Pfeil markiert ein Septum und zeigt den Wechsel von Fallen zu vegetativem Wachstum. (D) Fallen der $\Delta sipC$ Mutante konnten *C. elegans* Larven fangen und verdauen. Es wurde ein *C. elegans* Stamm verwendet, der durch die Expression von HIS-72-GFP grün-fluoreszierende Zellkerne besitzt, um zwischen verdauten (umgeben von einer gestrichelten Linie) und gefangenen (mit Pfeil markiert) Larven zu unterscheiden.

Da die Morphologie der Fallen drastisch verändert war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Deletion von *sipC* die Dynamik des Zytoskeletts beeinflusst. Das Zytoskelett wurde zuvor noch nie in lebenden Fallen der NFP visualisiert. Daher wurden Mikrotubuli und Aktinfilamente (F-Aktin) mit Hilfe des mCherry-markierten alpha-Tubulins TubA und des GFP-markierten Aktin-bindende Peptid LifeAct visualisiert. In filamentösen Pilzen lokalisiert das Minus-Ende der Mikrotubuli an Spindelpolkörpern (SPB), welche als Mikrotubuli-organisierende Zentren (MTOC) dienen. Weiterhin können Bereiche nahe dem Septum als septale MTOCs dienen (Gao et al., 2019; Zekert et al., 2010). In Hyphenspitzen wurden dynamische Mikrotubuli beobachtet (**Abb. 35 A**). In Fallen waren lange Mikrotubuli ausgehend der sMTOCs am stärksten vertreten (**Abb. 35 A**). Interessanterweise wurde die stärkste Krümmung der Falle erst beobachtet, nachdem das erste Septum am Ausgangspunkt der Falle gebildet wurde (**Abb. 35 B, C**). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, ob von sMTOC ausgehenden Mikrotubuli für die Krümmung notwendig sind. Dies wurde durch die Deletion der sMTOC Komponenten *apsB*, *spa10* und *spa18* überprüft. Diese sind notwendig für das Korrekte Assemblieren und Lokalisation der MTOCs am Septum in *A. nidulans*. mCherry-ApsB notwendig in *D. flagrans* wie in *A. nidulans* an der Pore des Septums (Daten nicht gezeigt). Die Gene wurden mit Hilfe von homologer Rekombination deletiert und die Deletion durch Southern Hybridisierung überprüft. In den *D. flagrans* Δ *apsB* (DFL_006306), Δ *spa10* (DFL_009494) und Δ *spa18* (DFL_000162) konnte jedoch keine offensichtliche Veränderung der Fallenkrümmung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

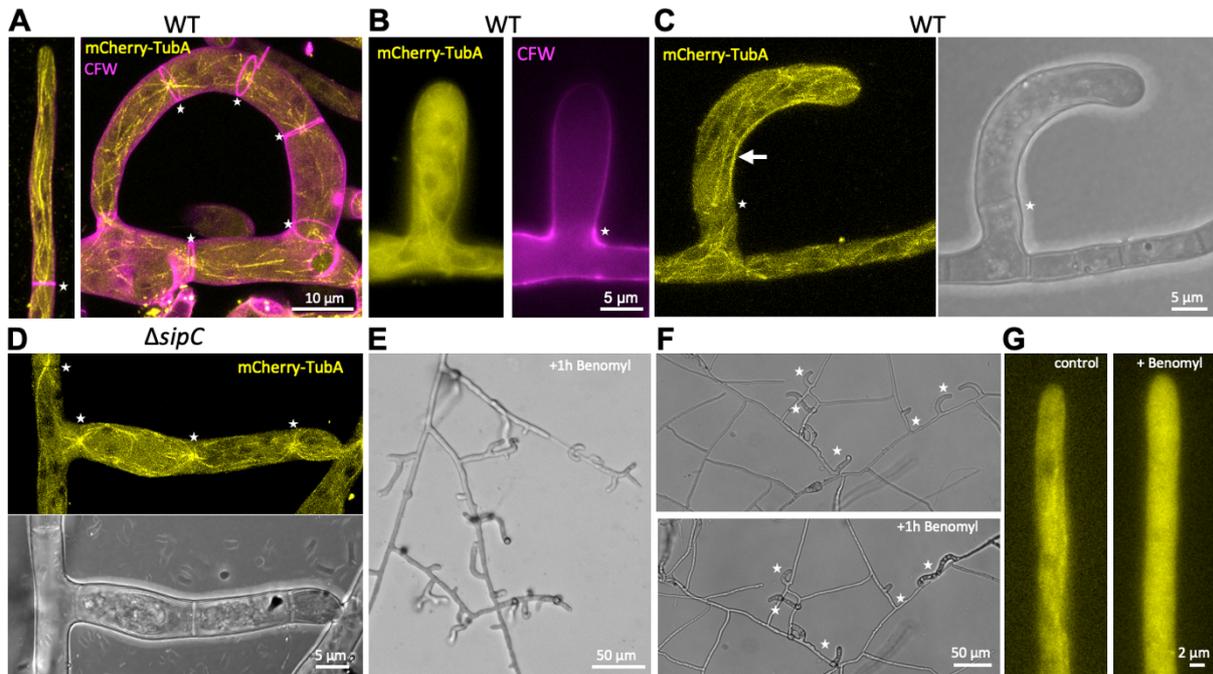


Abbildung 35: Charakterisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts in *D. flagrans* WT und $\Delta sipC$ Mutante. (A) Visualisierung der Mikrotubuli durch die N-terminalen Fusion des alpha-Tubulins TubA mit mCherry in einer vegetativen Hyphe und Falle von *D. flagrans* WT (Dargestellt in Gelb). Sterne markieren die Lokalisation septaler MTOCs. (B) Mikrotubuli einer sich bildenden Falle ohne basales Septum (mit Stern markiert). (C) Mikrotubuli in einer krümmenden Falle. Der Stern markiert das sMTOC am Septum. Der Pfeil markiert krümmende Mikrotubuli an der Innenseite der Falle. (D) Lokalisation von mCherry-TubA in einer Falle der $\Delta sipC$ Mutante. Sterne markieren septale MTOCs. (E) Extreme Verzweigungen vegetativer Hyphen nach 1h Inkubation mit der Mikrotubuli-depolymerisierenden Chemikalie Benomyl (5 $\mu\text{g/ml}$). (F) Die Zugabe von Benomyl (5 $\mu\text{g/ml}$) inhibierte die Fallenbildung in *D. flagrans* WT. Sich bildende Fallen sind durch Sterne markiert. (G) Depolymerisation der Mikrotubuli fünf Minuten nach der Zugabe von Benomyl (5 $\mu\text{g/ml}$). Die Zellwand in A + B wurde durch CFW gefärbt und in Magenta dargestellt.

Obwohl die Mikrotubuli dynamisch waren, wurden lange Mikrotubuli an der Innenseite der Falle beobachtet, die vom Septum bis zur Hyphenspitze reichten. In der $\Delta sipC$ Mutante war die Lokalisation der Mikrotubuli vergleichbar zum WT (Abb. 35 D). Um die Rolle der Mikrotubuli während der Fallenbildung zu untersuchen, wurde die Mikrotubuli-depolymerisierende Chemikalie Benomyl zu sich entwickelnden Fallen gegeben. Das Vorhandensein von Benomyl (5 $\mu\text{g/ml}$) führte zu extrem starken Verzweigungen der Hyphen (Abb. 35 E). Das Wachstum der Fallenzellen stoppte jedoch durch die Zugabe von Benomyl (Abb. 35 F). Die Depolymerisation der Mikrotubuli wurde durch die Lokalisation von mCherry-TubA nach der Zugabe von Benomyl bestätigt (Abb. 35 G).

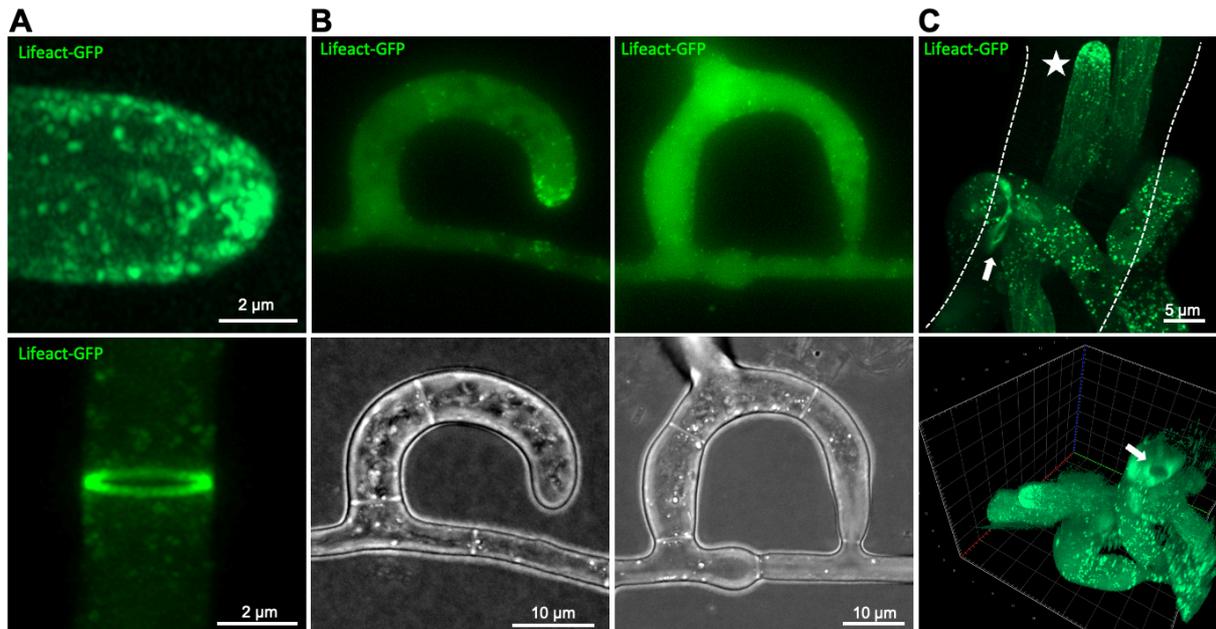


Abbildung 36: Charakterisierung des Aktin-Zytoskeletts in *D. flagrans*. (A) Aktin Patches an der Hyphenspitze und Aktinringbildung während der Septierung wurden durch Fusion des Aktin-bindenden Proteins LifeAct mit GFP visualisiert (Dargestellt in Grün). (B) Lokalisation von Aktin Patches während der Fallenbildung und in einer ausgebildeten Falle. (C) Ringförmige Akkumulation von Lifeact-GFP (durch Pfeil markiert) an der Penetrationsstelle einer *C. elegans* Larve (Umriss durch gestrichelte Linie markiert). In Ernährungshyphen können einzelne Aktinfilamente visualisiert werden (durch Stern markiert).

Als nächstes wurden F-Aktin durch das Aktin-bindende Peptid Lifeact-GFP visualisiert (Riedl et al., 2008). Am häufigsten wurden Aktinpatches an wachsenden Hyphenspitzen und subapikalen Bereichen, sowie Aktinringe während der Septierung visualisiert (**Abb. 36 A, B**). Während der Infektion von *C. elegans* wurde eine ringförmige Akkumulation des Signals an der Penetrationsstelle beobachtet (**Abb. 36C**). In seltenen Fällen und stark wachsenden Hyphen wie den Ernährungshyphen innerhalb der Nematoden wurden Aktinfilamente beobachtet. Die Expression von Lifeact-GFP in der $\Delta sipC$ Mutante zeigte, dass die Septierung während der Fallenbildung verspätet war, sodass verlängerte Zellen mit abnehmenden Hyphendurchmesser entstanden (**Abb. 37 A, B**).

Um die Rolle von Aktin während der Fallenbildung zu untersuchen, wurde die Aktin-destabilisierende Chemikalie Cytochalasin A (5 µg/ml) während der Entwicklung zugegeben. Die Zugabe der Chemikalie führte zum Anschwellen der Hyphenspitzen des vegetativen Myzels (**Abb. 37 C**). Dieser Effekt war schwächer in wachsenden Fallen. Diese wuchsen jedoch als vegetative Hyphe am Ende der Reaktion weiter (**Abb. 37 D, Film 7**). Diese Ergebnisse deuten auf eine mutmaßliche Funktion von SipC bei der Regulierung der Zytoskelettdynamik hin.

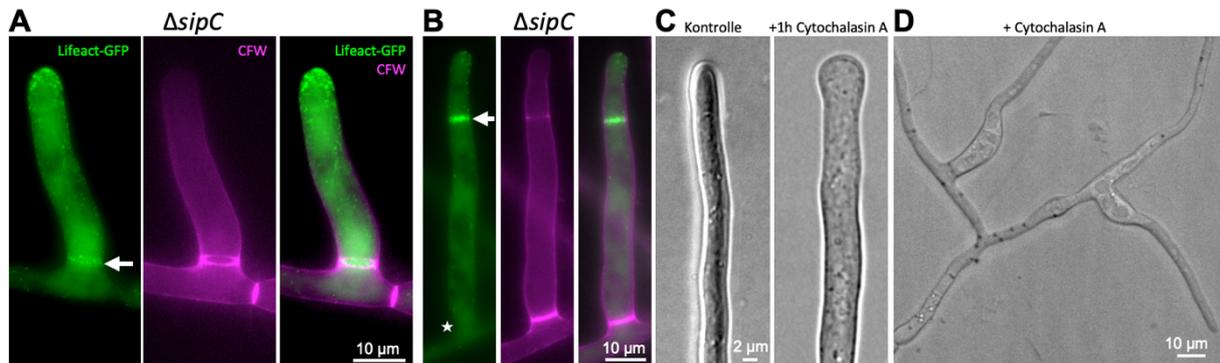


Abbildung 37: Charakterisierung des Aktin-Zytoskeletts der $\Delta sipC$ Mutante. (A, B) Lokalisation von LifeAct-GFP während der Fallenbildung der $\Delta sipC$ Mutante. Der Pfeil markiert sich entwickelnde Septen. Der Stern markiert ein reifes Septum ohne GFP Signal. Die Zellwand in A + B wurde mit CFW gefärbt und in Magenta dargestellt. (C) Die Zugabe der Aktin-depolymerisierenden Chemikalie Cytochalasin A (5 µg/ml) führt zu angeschwollenen Hyphenspitzen in *D. flagrans* WT. Als Lösemittelkontrolle wurden Hyphen mit 0,5% DMSO behandelt. (D) Der Verlust der Fallenidentität nach Zugabe von Cytochalasin A (5 µg/ml) in WT Fallen. Siehe auch Film 7.

3.5 Anwendung von *D. flagrans* zur biologischen Schädlingsbekämpfung von *Xiphinema index*

NFP haben ein großes Potenzial, um als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel in der Landwirtschaft eingesetzt zu werden. Die resistenten Chlamydosporen von *D. flagrans* wurden schon zur Bekämpfung unterschiedlicher Nematoden eingesetzt (Grønvold et al., 1993; Mello et al., 2014; Vilela et al., 2012). Deshalb wurde in diesem Teil der Arbeit das Potenzial von *D. flagrans* zur biologischen Schädlingsbekämpfung des ektoparasitär lebenden pflanzenparasitären Nematoden *Xiphinema index* untersucht. Als Überträger der Reisigkrankheit der Weinrebe, gehört er zu einer der bedrohlichsten Nematoden im Weinbau weltweit.

Erddproben des Staatsweinguts Durlach sind reich an NFP

Um zu untersuchen, ob NFP in Weinberg-Erde zu finden sind, und durch die biologische Schädlingsbekämpfung kein stark fremder Organismus in die Erde eingebracht wird, wurden Erdproben aus 20-50 cm Tiefe der Wurzelzone an fünf unterschiedlichen Standorten des Staatsweinguts Durlach/Grötzingen entnommen (Abb. 38 A). In allen Proben wurden NFP angereichert und Reinkulturen der Isolate etabliert (Abb. 38 B - D). Durch die Sequenzierung der *internal transcribed spacer* (ITS) Region wurden alle Isolate der Gattung *Arthrobotrys* zugeordnet, die klebrige dreidimensionale Fallennetzwerke ausbilden. Insgesamt wurden 7 Isolate angereichert. In allen Erdproben wurde *A. conoides* identifiziert. In Probe 1 und 3 wurden zusätzlich die Arten *A. musiformis* und *A. superba* isoliert.

Um zu überprüfen, ob *D. flagrans* in Weinberg-Erde keimt und sich etabliert, wurden *D. flagrans* Sporen in Natriumalginatpellets eingearbeitet und in einer Petrischale mit Erde der Probe 1 bei Raumtemperatur für 14 Tage inkubiert (**Abb. 38 E**). Circa 3 cm entfernt vom Pellet wurde Erde entnommen, DNA isoliert und über ITS1 PCR, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und Sequenzierung *D. flagrans* nachgewiesen (**Abb. 38 F**). Diese Ergebnisse deutet darauf hin, dass NFP in Weinbergerde vorkommen, sich etablieren können und zur möglichen Schädlingsbekämpfung infrage kommen.

D. flagrans* vermindert die Anzahl an *X. index* Weibchen *in vitro

Um die Fähigkeit von *D. flagrans* zu testen, *X. index* zu fangen und zu verdauen, wurde die Interaktion *in vitro* auf Wasseragar getestet. Zehn *X. index* Adulte wurden mit etwa 1000 *D. flagrans* Sporen für insgesamt 72h co-inkubiert. Nach 12 h Inkubation wurden die ersten Fallen beobachtet. Nach 24 h wurden die ersten gefangenen Würmer beobachtet und spätestens nach 72 h waren diese vollständig verdaut (**Abb. 39 A**). Dieses Ergebnis zeigt, dass *D. flagrans* auch den pflanzenpathogenen Nematoden *X. index* fangen und verdauen kann und zur biologischen Schädlingsbekämpfung in Frage kommt.

Etablierung eines *X. index* Infektionssystems an *Ficus carica*

Um das Anwendungspotenzial von *D. flagrans* weiter zu testen, wurde eine Zucht von *X. index* an *F. carica* etabliert und eine Infektionsstudie an Feigenkeimlingen durchgeführt (**Abb. 39 B, C**). Die Nematoden stammen aus der Kultur des Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum in Neustadt und wurden freundlicherweise von Dr. Ulrike Ipach zur Verfügung gestellt. Die Feige ist kein Wirt für das *Grapevine Fanleaf Virus*, sodass sichergestellt werden kann, dass die Kultur virenfrei bleibt (Staudt & Kassenmeyer, n.d.). Des Weiteren zeigte *X. index* eine erhöhte Reproduktionsrate an der Feige im Vergleich zur Weinrebe (U. Ipach, persönliche Kommunikation).

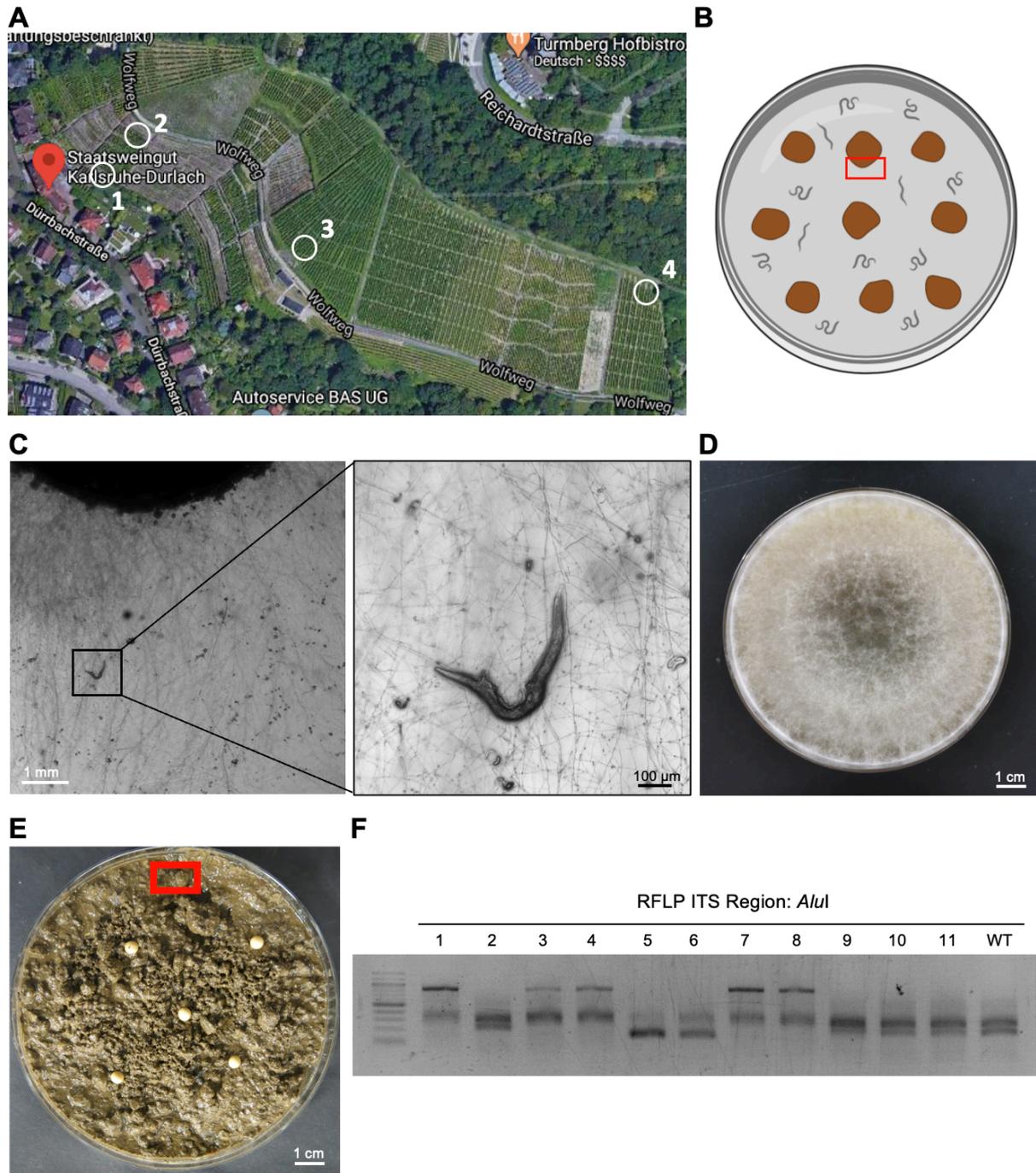


Abbildung 38: Anreicherung von NFP aus Erde eines Weinguts und Überprüfung der Keimfähigkeit von *D. flagrans* in Natriumalginat Pellets. (A) Markierung der vier Probeentnahmestellen im Staatsweingut Durlach. Die fünfte Entnahmestelle stammt aus der Weinschule in Grötzingen. (B) Anreicherungsstrategie für NFP. Isolierte Erde wurde auf Wasseragar mit circa 2000 *C. elegans* Larven bei Raumtemperatur inkubiert. (C) Gefangener Nematode nach 5 Tagen Inkubation. (D) Wachstum eines der am häufigsten vorkommenden Isolate der Art *A. conoides*. (E, F) Überprüfung der Keimfähigkeit von *D. flagrans* in Erde des Rebstocks. Sporen wurden mit Hilfe von Natriumalginat Pellets in der Erde verteilt. Nach 14 Tagen Inkubation wurde DNA aus einem Abschnitt (markiert in Rot) isoliert und das Vorhandensein von *D. flagrans* durch RFLP und Sequenzierung bestätigt. DNA der ITS-Sequenzen wurde mit dem Restriktionsenzym *AluI* verdaut. Als Kontrolle wurde eine von *D. flagrans* WT amplifizierte ITS-Sequenz verwendet. Proben 2, 9, 10 und 11 zeigen das gleiche Schnittmuster der Kontrolle. Die ITS-Region von Probe 11 wurde sequenziert und *D. flagrans* als Art bestätigt.

Für die Kultur wurden Feigenpflanzen aus Holzstecklingen gezogen und nach erfolgreicher Bewurzelung in Perlite-Substrat und 16 Stunden Licht bei Raumtemperatur kultiviert. Für die Nematodenzucht wurden die Pflanzen in 500 g Quarzsand überführt und mit *X. index* Weibchen infiziert. Adulte Nematoden wurden aus mindestens sechs Monaten alten Zuchttöpfen für Infektionsstudien an Feigenkeimlingen in Quarzsand isoliert. Für Infektionsstudien wurden Feigensamen jeweils in 80 g Sand angezogen und nach 40 Tagen für die Studien verwendet.

Zur Überprüfung der Keimfähigkeit von *D. flagrans* in Sand wurden Feigenkeimlinge mit etwa 10^5 Pilzsporen beimpft und das Wachstum nach 40 Tagen Inkubation überprüft. Mit Hilfe einer WGA-FITC Färbung wurde das Wachstum des Pilzmyzels um die Wurzeln fluoreszenzmikroskopisch bestätigt (**Abb. 39 D**).

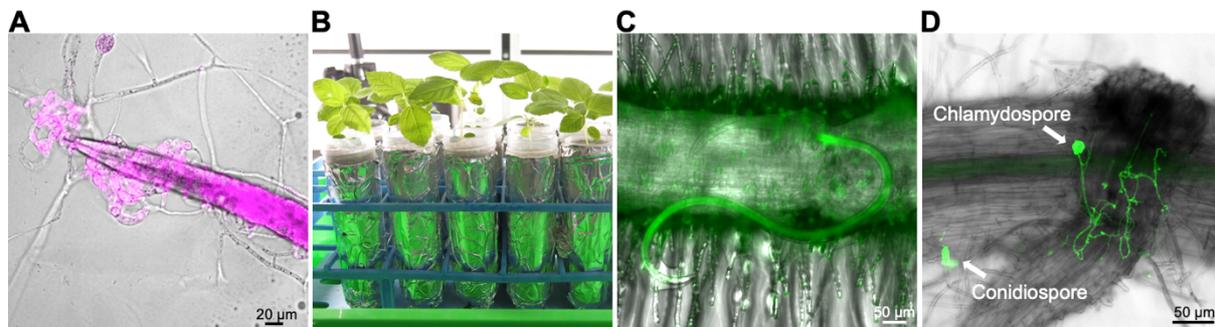


Abbildung 39: Etablierung von *X. index* Infektionsstudien an *F. carica* Keimlingen in Sand. (A) *X. index* wird durch *D. flagrans* WT auf Wasseragar gefangen und verdaut. Die Zellwand des Pilzes ist durch CFW markiert und in Magenta dargestellt. (B) *F. carica* Keimlinge wurden in Sand für 40 Tage angezogen. (C) Eine mit *X. index* infizierte Wurzel eines Feigenkeimlings auf Wasseragar. (D) *D. flagrans* Wachstum um Wurzeln eines Feigenkeimlings. Feigenwurzeln wurden nach 40 Tagen co-Inkubation mit *D. flagrans* geklärt und das Myzel mit dem Farbstoff WGA-FITC fluoreszent markiert (in Grün dargestellt).

Die Infektionsstudien wurden nach dem Substrattest von Schaaf durchgeführt, sodass die Anzahl an Nematodenlarven nach 40 Tagen Co-Inkubation bestimmt wurden. Jede Pflanze wurde mit insgesamt 25 handverlesenen *X. index* Weibchen infiziert. Nach einem Tag wurden insgesamt 4×10^4 *D. flagrans* Sporen/g Sand jeder Pflanze zugegeben. Nach 40 Tagen Co-Inkubation zeigten mit *X. index* infizierte Pflanzen Gallenbildungen und Läsionen an den Wurzeln (**Abb. 40 A, B**). Die Zugabe von *D. flagrans* verminderte die Anzahl an *X. index* Larven um 42 ± 20 % im Vergleich zur Kontrollinfektion (**Abb. 40 C**). Es wurden keine Veränderungen in Wurzelgewicht und -länge, beziehungsweise Sprossgewicht und -länge durch die Zugabe von *D. flagrans*, beziehungsweise *X. index* festgestellt (**Abb. 40 D**). Diese Ergebnisse deuten auf das Potenzial von *D. flagrans* zur biologischen Schädlingsbekämpfung hin.

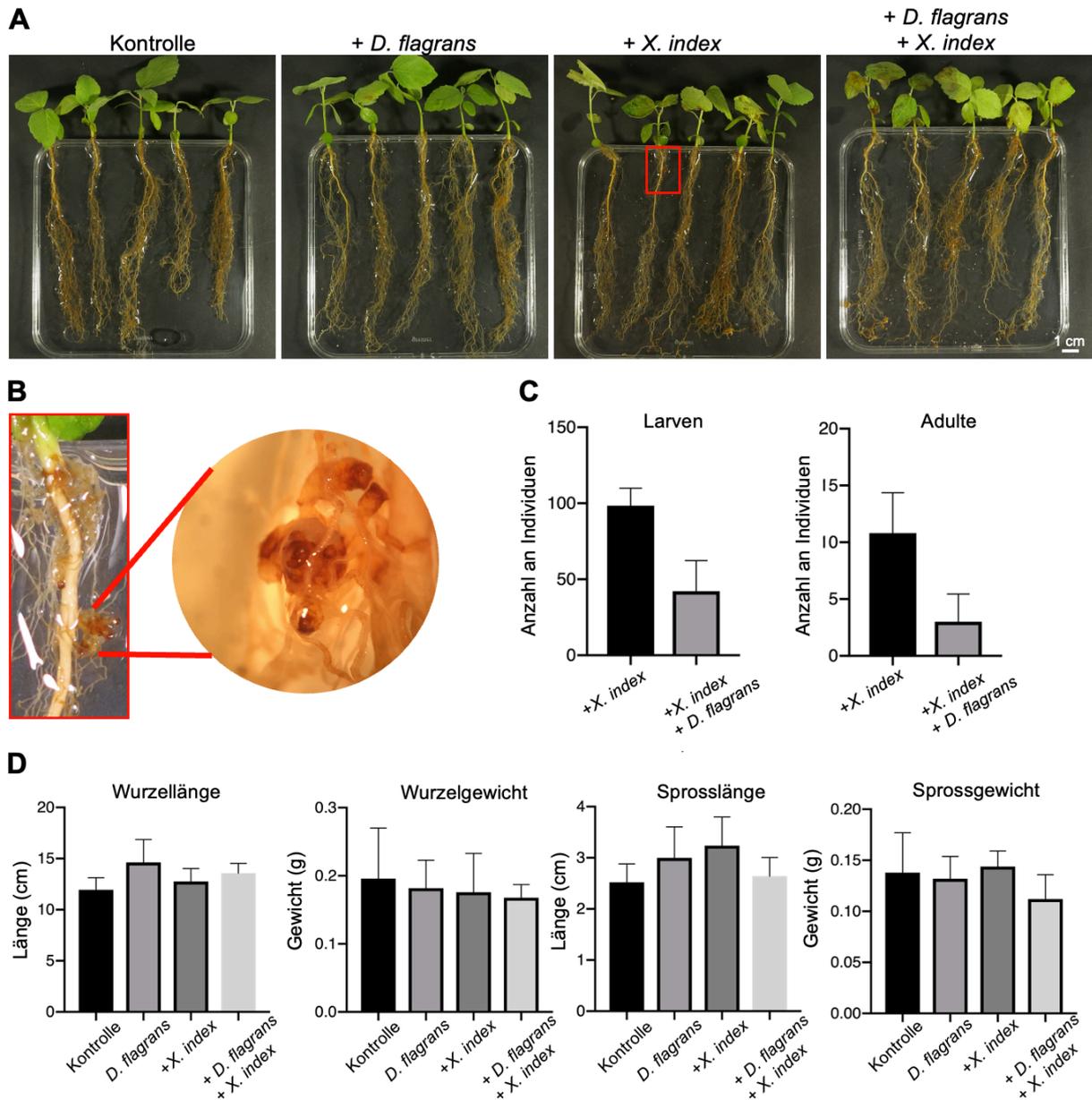


Abbildung 40 Verminderung der *X. index* Larvenanzahl durch die Zugabe von *D. flagrans*. (A) Aufnahmen der *F. carica* Pflanzen nach Abschluss des Infektionsexperiments. Der rot-markierte Bereich ist in (B) vergrößert dargestellt. (B) Verursachte Schäden an den Wurzeln durch die Infektion mit *X. index*. (C) Quantifizierung der Anzahl an *X. index* Larven und Adulten nach 40 Tagen Inkubation. (D) Wurzellänge- und Gewicht, Sprosslänge und Gewicht nach 40 Tagen Inkubation bei unterschiedlichen Konditionen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von fünf Replikaten an.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Komponenten des Zelldialog-Modells während der Fallenbildung von *D. flagrans* charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass das Zelldialogmodell aus *N. crassa* in *D. flagrans* konserviert ist und die Proteine MakB, SofT, HexA, und HamA essenziell für die Hyphenfusion und den Ringschluss der Falle sind. Die Lokalisation von SofT war dabei von MakB und HexA abhängig. Durch die fehlende Lokalisation von SofT konnte die Fallenbildung durch Bakterien der Gattung *Delftia* in Abwesenheit von Nematoden induziert werden. Die reprimierende Funktion wurde durch den N-terminus des Proteins vermittelt, wobei eine WW-Interaktionsdomäne essenziell war. Für die Signalweiterleitung der Nematoden-, sowie Bakterien-vermittelte Falleninduktion war die Funktionalität der Proteinkinase C notwendig. Die bakteriellen Signalmoleküle und Prozesse der Signalweiterleitung sind bisher unbekannt, wurden jedoch nicht über die MAPK-Signalkaskade der Zellwandintegrität reguliert.

4.1 Das Zelldialog-Modell ist in filamentösen Pilzen konserviert

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Funktion der Proteine SofT und der MAP-Kinase MakB in filamentösen Pilzen konserviert ist, und das Zelldialog Modell aus *N. crassa* in *D. flagrans* für die korrekte Fallenbildung essenziell ist. Bisherige Studien in filamentösen Pilzen zeigen, dass die beiden Proteine Bestandteil großer Signalkaskaden sind, die neben zwei konservierten MAP-Kinase Modulen auch aus zwei NADPH Oxidase Komplexen und dem STRIPAK Komplex bestehen (Fischer & Glass, 2019; Schmidt et al., 2020). Neben der Kommunikation und Zell-Zell-Fusion werden diese Signalnetzwerke für eine Vielzahl von Entscheidungen benötigt, wie zum Beispiel der Fruchtkörperentwicklung, Pathogenität, Produktion von Sekundärmetaboliten und der Reaktion auf Umweltfaktoren (Charlton et al., 2012; Craven et al., 2008; Elramli et al., 2019; Schmidpeter et al., 2017). Interessanterweise ist die koordinierte subzelluläre Dynamik von SofT und MakB während der vegetativen Zellfusion und der Fallenbildung in *D. flagrans* vergleichbar zu den Dynamiken der Keimlingsfusionen in *N. crassa* (Fleissner et al., 2009; Serrano et al., 2018). Während frühe Keimlingsfusionen von *N. crassa* die typische Strategie des Pilzes zur Verzweigung des Myzels sind, können diese in *D. flagrans* nicht beobachtet werden. Dort führen Zell-Zell-Fusionen erst zu einem späteren Zeitpunkt im vegetativen Myzel zu Verzweigungen. Bemerkenswert ist die neue Verwendung des Zelldialogs bei der

Fallenbildung, bei der die wachsende Fallenzelle mit einem basalen vegetativen, oder einem weiteren Fallenkompartment fusioniert. In diesem Fall sind die Fusionspartner jedoch lediglich vier bis fünf Hyphenkompartimente voneinander entfernt. Mit Hilfe von mathematischen Modellen wurde berechnet, dass für den erfolgreichen Zelldialog eine spezifische räumliche und zeitliche Dynamik von zytoplasmatischen Proteinen erforderlich ist, um die nötigen positiven und negativen Rückkopplungsschleifen zu generieren (Goryachev et al., 2012). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass während der Fallenbildung keine zytoplasmatische Verbindung der beteiligten Zellkompartimente bestehen kann. In filamentösen Pilzen werden zwei benachbarte Kompartimente durch ein Septum voneinander getrennt, wobei durch eine geöffnete Septumspore ein Austausch stattfinden kann. Woronin Körper können die Septumsporen regulieren, indem sie diese nach einer Verletzung der Hyphe verschließen (Jedd & Chua, 2000; Jedd & Pieuchot, 2012; Lai et al., 2012). Hauptprotein des Woronin Körpers ist HexA. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass an Septen von Fallenkompartmenten zwei bis drei Woronin Körper an jeder Seite lokalisieren, und möglicherweise die Septumspore der fusionierenden Fallenzelle bei der Zellfusion verschließen. In der $\Delta hexA$ Mutante wurden wie in der $\Delta soft$ und $\Delta makB$ Mutante keine Zellfusionen beobachtet. Durch die Deletion kommt es zu einem kontinuierlichen Zytoplasmastrom, wodurch die nötigen Rückkopplungsschleifen möglicherweise nicht aufrechterhalten werden können.

Erstaunlicherweise bildete die zu *makB* orthologe $\Delta fus3$ Gendeletionsmutante in *A. oligospora* keine Fallen aus (Chen et al., 2020). Man würde vermuten, dass solch konservierte Signalwege vergleichbare Aufgaben in so nah verwandten Organismen zeigen. Dies bedarf weiterer Analysen, da beispielsweise die Deletionen der zu *makA* orthologen Genen in unterschiedlichen *A. oligospora* Isolaten zu verschiedenen Effekten führte. Während im Isolat TWF154 die $\Delta sit2$ Mutante weiterhin Fallen ausbildete, waren diese im Stamm ATCC 24,927 inhibiert (Chen et al., 2020; Zhen et al., 2018). Weiterhin führte der Verlust des Transkriptionsfaktors Ste12 in *A. oligospora* zu einem fast 100%igen Verlust der Fallenbildung. Dieser Effekt war in einer *Drechlerella dactyloides* Gendeletionsmutante $\Delta DdaSTE12$ nicht so drastisch. Die kontraktile Ringfallen wurden jedoch nicht mehr ausgelöst (Fan et al., 2021.)

Interessanterweise wurde in der $\Delta hexA$ Mutante GFP-Soft nicht an die Hyphenspitze interagierender Zellen rekrutiert. Eine Rekrutierung und oszillierende Lokalisation von MakB-mCherry wurde jedoch weiterhin in Hyphen der $\Delta hexA$ Mutante

beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass bestimmte Teile der Signalkaskade weiterhin funktionsfähig sind. Die alternierende Lokalisation der MAP-Kinase MAK-2 wurde in *N. crassa* in den Zellkernen nicht beobachtet und deutet darauf hin, dass der Mechanismus des Zelldialogs zwar hoch konserviert zu sein scheint, die genaue subzelluläre Dynamik jedoch an die Besonderheiten jeder Art angepasst ist (Aguilar et al., 2013; Fleissner et al., 2009). In *N. crassa* wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von MAK-2 und MAK-1 von weiteren essenziellen Proteinen der Zell-Zell Erkennung abhängig ist (Fu et al., 2011; Fu et al., 2014). In Stämmen, in denen entweder *ham-6*, *ham-7*, *ham-8*, *ham-9*, *ham-10*, *amph-1*, oder *whi-2* deletiert waren, konnte eine stark verringerte Phosphorylierung von MAK-2 und von MAK-1 identifiziert werden. Diese Ergebnisse deuten auf die komplexen Überschneidungen hin, die zwischen den einzelnen MAP-Kinase Modulen vorherrschen und durch weitere Signalmoleküle reguliert werden können.

Obwohl schon mehr als 70 essenzielle Gene für die Keimlingsfusion in *N. crassa* identifiziert wurden, ist das beteiligte Signalmolekül und der wahrnehmende Rezeptor noch unbekannt (Fischer & Glass, 2019). Die Rekrutierung von GFP-Soft an die Hyphenspitze interagierender Zellen deutet darauf hin, dass es mit der Sekretion in Verbindung steht. Weiterhin wurde gezeigt, dass Komponenten der Sekretion für die Zell-Zell Interaktion notwendig sind. In dieser Arbeit wurde das HAM-10 orthologe HamA als essenzielles Protein für die Zellfusion identifiziert. Das Protein besitzt eine konservierte C-terminale C2 Domäne, die als Calcium-abhängige Lipid-Bindedomäne in Vesikeltransport, Exozytose und Signaltransduktion eine Rolle spielt (Sutton et al., 1995). Intrazelluläre Calciumionen regulieren Aktin und die Vesikelfusion (Janmey, 1994; Schneggenburger & Neher, 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass Hyphen von *Aspergillus nidulans* oszillierende Wachstumsphasen besitzen (López-Franco et al., 1994). Zellulär wurde eine oszillierende Akkumulation von Ca^{2+} Ionen an den Hyphenspitzen identifiziert (Takeshita et al., 2017). Sekretorische Vesikel, die an der Hyphenspitze bei der Sekretion akkumulieren, und die Menge an F-Aktin zeigten eine positive oszillierende Korrelation mit der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Die Daten verstärken ein Modell, in dem die zeitlich kontrollierte Aktinpolymerisation und die Exozytose durch gepulsten Ca^{2+} Einstrom koordiniert werden. In *N. crassa* wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von MAK-2 und Soft an die Plasmamembran abhängig von HAM-10 ist und keinerlei Lokalisation der beiden Proteine in einer $\Delta ham-10$ Mutante an der Keimlingsspitze interagierender

Zellen beobachtet wurde (Fu et al., 2014). Diese Daten deuten darauf hin, dass die koordinierten oszillierenden Zyklen von Ca^{2+} Influx, Exozytose und Zell-Zell-Kommunikation in Verbindung stehen, und den Zellen ein dynamisches System zur Erkennung der Umwelt bieten.

In den letzten Jahren haben extrazelluläre Vesikel (EV) das Interesse der zellbiologischen Forschung und der biomedizinischen Anwendung geweckt (Cai et al., 2019a; Cai et al., 2019b). Die sekretierten Vesikel dienen als Mediatoren von Zell-Zell-Interaktionen, sogar zwischen unterschiedlichen biologischen Reichen. So sekretieren beispielsweise pflanzenpathogene Pilze kleine RNA Moleküle (sRNA) mit Hilfe der EVs in die Pflanzenzellen, um dort Abwehrgene durch RNA Interferenz zu regulieren (Huang et al., 2021). Die vergleichende Lokalisation von GFP-SoFT und BroA-GFP deuten darauf hin, dass ein mögliches Signalmolekül für die Zell-Zell Kommunikation mit Hilfe von Exosomen sekretiert wird und vermutlich nicht Art-spezifisch, sondern hoch konserviert ist. Interessanterweise wurden *in vitro* Keimlingsfusionen zwischen den pflanzenpathogenen Pilzen *Colletotrichum gloeosporioides* und *C. siamense* beobachtet, welche von einem *Quorum sensing* Verhalten abhängig waren (Mehta & Baghela, 2021). Die Interaktion wurde durch den MAPK-Kinase (MEK) Inhibitor InSolution PD98059 verhindert, was auf die Rolle der MAP-Kinase Signalwege MAK-2 und MAK-1 bei der Kommunikation zwischen den zwei Arten hindeutet. Diese Befunde verstärken die Theorie, dass die Signalmoleküle für den Zelldialog in filamentösen Pilzen hoch konserviert sind und von den Zellen sekretiert werden.

Die grundlegenden Mechanismen der Fallenkrümmung sind bisher noch nicht verstanden. Chemische Gradienten können die Wachstumsrichtung von Hyphen beeinflussen, sodass man annehmen könnte, dass eine chemotrope Wahrnehmung der umliegenden Hyphen zu dem gerichteten Wachstum und der Krümmung der Fallenspitze führt. In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass trotz der fehlenden Erkennung des umgebenden Myzels, die Zellfusionsmutanten nicht in der Krümmung, sondern lediglich im Ringschluss gestört waren. Während dieser Doktorarbeit betreuten Bachelor- und Masterarbeiten zeigten, dass die Zellendmarkerproteine TeaA, TeaC und TeaR für die korrekte Fallenbildung notwendig sind. Diese Proteine werden für die Etablierung und Aufrechterhaltung des polaren Wachstums benötigt. Gendeletionsmutanten in *A. nidulans* zeigen kurvigtes Hyphenwachstum, welches auf den Verlust der Polarität hindeutet (Higashitsuji et al., 2009; Takeshita et al., 2008). Während die *D. flagrans* Gendeletionsmutanten ΔteaA und ΔteaC vorwiegend einzelne

Fallenkompartimente ohne Krümmung ausbildeten, war der Fallendurchmesser der $\Delta teaR$ Mutante stark verkleinert (Bachelorarbeiten von Imane Bouabdallah und Jan Wäckerle; Masterarbeit von Anlun Wei). Dies deutet darauf hin, dass andere intrinsische Faktoren die Krümmung regulieren und diese und die Ringgröße durch weitere Faktoren beeinflusst werden, die möglicherweise sogar Nematoden-abhängig sind.

Mikroskopische Analysen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *D. flagrans* zeigten, dass Zellen den Zelldialog dynamisch regulieren können. Während es von Vorteil ist, ein Fallennetzwerk durch Hyphenfusionen physikalisch zu verstärken, wird diese Dynamik beispielsweise in Ernährungshyphen innerhalb von Nematoden unterdrückt. Ernährungshyphen keimen aus der Penetrationsstelle aus, um den gefangenen Nematoden zu kolonisieren und zu verdauen (Dijksterhuis et al., 1994). Trotz physikalischer Nähe konnte in diesen Hyphen keine vegetativen Hyphenfusion oder Rekrutierung von GFP-Soft an die Membran beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zur Akkumulation von Fetttropfchen in den Hyphen, und auch zur Hochregulation von Genen, die beim Verdau und der Nährstoffaufnahme wichtig sind (Chen et al., 2020; Liu et al., 2014; Yang et al., 2011). Dies zeigt die Komplexität, mit der filamentöse Pilze Umweltreize wahrnehmen können und der Zelldialog als vorhandener Baustein je nach Situation verändert werden kann, um neue Funktionen zu schaffen.

4.2 Bakterien induzieren die Fallenbildung in der *D. flagrans* $\Delta soft$ Mutante

Filamentöse Pilze stehen im ständigen Austausch mit ihrer Umwelt. Die Fallenbildung von NFP ist energieaufwändig, und muss deshalb streng reguliert werden. In den meisten NFP wird daher die Fallenbildung nur durch spezifische Reize induziert. Interessanterweise wurde gezeigt, dass neben Nematoden auch weitere organische und anorganische Stoffe die Fallenbildung (Nordbring-Hertz, 1973; Nordbring-Hertz, 1977; Wang et al., 2014). Besonders das zusätzliche Vorhandensein von Bakterien erhöhte stark die Fallenbildung in vier NFP im Vergleich zu Proben mit lediglich Nematoden (Rucker & Zachariah 1987).

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass Bakterien der Gattung *Delftia*, sowie *E. cloacae*, *B. subtilis*, *P. strutzeri* und *S. marcescent* die Fallenbildung in den Gendeletionsmutanten $\Delta soft$, $\Delta makB$ und $\Delta hexA$, aber nicht im WT induzierten.

Durch Vergleiche mit dem WT, der Zellfusionsmutante $\Delta hamA$ und *D. flagrans* Wildisolaten konnte geschlossen werden, dass es sich um einen Zellfusions-unabhängigen Effekt handelt. Welche Signalmoleküle und Kaskaden dabei eine Rolle spielen und weshalb die Bakterien die Fallenbildung induzieren, muss weiterhin geklärt werden.

In einer Studie mit *A. oligospora* wurde gezeigt, dass Bakterien gezielt mit dem Pilz kommunizieren können. Im dort vorgeschlagenen Modell rekrutieren Bakterien gezielt NFP durch sekretierten Harnstoff, um sich vor bacteriphoren Nematoden zu verteidigen (Wang et al., 2014). Diese Art von indirekter Verteidigung wurde schon bei der Interaktion von Pflanzen, Insekten und Nematoden beschrieben (Rasman et al., 2005). Von pflanzenfressenden Insekten geschädigte Blätter sekretieren flüchtige Stoffe, die weitere räuberische Insekten anlocken und somit die Pflanzenschädlinge vertreiben (Allmann & Baldwin, 2010; Paré & Tumlinson, 1999). Sieben von insgesamt 31 getestet NFP Arten reagierten auf Harnstoff als Fallen-induzierendes Signalmolekül (Wang et al., 2014). Daraus kann man schließen, dass die Harnstoffwahrnehmung in NFP zwar bei unterschiedlichen Arten vorkommt, aber nicht konserviert ist. Dies deutet zusätzlich darauf hin, dass die anderen Arten möglicherweise auf weitere Signalmoleküle reagieren. In dieser Doktorarbeit war die Bakterien-induzierte Fallenbildung der Zellfusionsmutanten spezifisch für Bakterien der Gattung *Delftia*, sowie *E. cloacae*, *B. subtilis*, *P. strutzeri* und *S. marcescent*, wobei neben *E. coli*, *P. mirabilis* und *M. luteus* noch weitere Bakterienarten getestet werden müssen. Die Zugabe von Harnstoff induzierte nicht die Fallenbildung und lediglich lebendige Bakterien, die im direkten Kontakt zum Myzel standen, waren zur Induktion fähig. In der Tat wurde in dieser Doktorarbeit festgestellt, dass in zwei weiteren von insgesamt fünf getesteten NFP Arten die Fallenbildung durch bestimmte Bakterien (Tabelle 1) induziert wurden. NFP können unterschiedliche Fallen ausbilden. Bisher zeigten lediglich Arten, die dreidimensionale klebrige Fallennetzwerke ausbilden (*A. oligospora* und *A. conoides*), die Eigenschaft, durch die Präsenz von *Delftia* Fallen auszubilden. Dies scheint jedoch nicht die Grundvoraussetzung zu sein, da *A. musiformis* bei Zugabe der Bakterien keine Fallen bildete.

Um zu testen, welche bakteriellen Metabolite die Fallenbildung induzieren, wurde Kulturüberstand von *Delftia* zu den Pilzstämmen auf Wasseragar gegeben. Diese Methode induzierte jedoch nicht die Fallenbildung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass entweder der direkte physische Kontakt zwischen Pilz und

Bakterium notwendig für die Induktion ist oder dass die Signalmoleküle unter den Kulturbedingungen nicht ausreichend ins Medium abgegeben werden.

In einer kürzlich erschienen Studie wurde gezeigt, dass Kulturüberstand von *Stenotrophomonas* und *Rhizobium* Kulturen erfolgreich die Fallenbildung in *A. oligospora* induzierten (Li et al., 2016b). Weiterhin wurden vier Diketopiperazine isoliert, die die Fallenbildung spezifisch induzieren. In einer weiteren Studie wurden drei bakterielle Stämme der Gattung *Chryseobacterium* von einer landwirtschaftlichen Nutzfläche isoliert, die lediglich in direktem Kontakt mit dem NFP *A. oligospora* die Fallen induzieren (Li et al., 2011). Diese Befunde deuten darauf hin, dass es unterschiedliche Arten der Kommunikation zwischen Bakterien und Pilzen gibt, die eine zeitliche und räumliche Regulation ermöglichen.

In der Natur stehen Bakterien und Pilze häufig in engem Kontakt und teilen sich Nährstoffe und ein Habitat (Steffan et al., 2020). Pilz-Bakterien-Interaktionen sind dabei abhängig von den Interaktionspartnern. So wird beispielsweise die Produktion von Sekundärmetaboliten in *A. niger* durch die Co-Kultivierung mit dem Bakterium *Bacillus subtilis* induziert (Benoit et al., 2015). Sekundärmetabolite dienen dabei zur Kommunikation und zum Wettbewerb um verfügbare Nährstoffe. Es entstehen weiterhin mutualistische Kooperationen, wie zum Beispiel in einer Studie über *A. nidulans* und *B. subtilis* gezeigt wurde (Abeyasinghe et al., 2020). Die Bakterien bewegten sich dabei entlang der Hyphen fort, um sich mit der Pilzkolonie weiter zu verbreiten und sekretierten dabei Thiamin als eine Art Mautgebühr, welches vom Pilz verstoffwechselt wurde. Viele Organismen sind auxotroph und benötigen daher eine externe Zufuhr von Nährstoffen wie zum Beispiel Aminosäuren oder Vitaminen. So sind beispielsweise viele NFP auxotroph für Thiamin und Biotin (Satchuthananthavale & Cooke, 1967). Diese Vitamine waren jedoch nicht ausreichend, um die Fallenbildung der *D. flagrans* Zellfusionsmutanten zu induzieren, oder bei zusätzlicher Präsenz der Bakterien zu reprimieren. Falls die Bakterien spezifische Signalmoleküle, oder Nährstoffe an die Pilzhyphen abgeben, könnten diese mit Hilfe von Transkriptomanalysen identifiziert werden. Differenziell exprimierte Gene würden Aufschluss über eine mögliche Kommunikation geben. Alternativ könnte man mit Hilfe von Transposon-Mutagenese Bakterien-Mutanten auf ihre Induktion der Fallenbildung testen und mit Genomsequenzierung putative Gene für die Kommunikation identifizieren.

Von den getesteten Bakterien waren nur Chitinase-produzierende Arten in der Lage, die Fallen der NFP zu induzieren. Dies muss zwar durch weitere Experimente mit vielen unterschiedlichen Bakterien verifiziert werden, stellt jedoch eine mögliche Art der Kommunikation zwischen Bakterien und NFP dar. Chitin ist ein Polymer und wird aus N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) Einheiten aufgebaut. Chitinasen können aufgrund der Bindestelle in Exo- und Endochitinasen unterteilt werden und katalysieren den Abbau von Chitin in diverse Oligomere (Henrissat, 1999; Henrissat & Bairoch, 1996). Chitinasen werden von vielen Organismen wie Bakterien, Pilzen, Insekten, Pflanzen aber auch Säugetieren produziert (Patil et al., 2000). Während in einigen Organismen die Chitinasen für den Auf- und Umbau des eigenen Chitinexoskeletts oder Zellwand benötigt werden, können andere Chitin als Nährstoffquelle verwenden (Gurav et al., 2017). In einer Studie wurde *S. marcescens* als stärkstes Chitin degradierendes Bakterium identifiziert (Monreal & Reese, 1969). Sie dienen auch als Erkennungsmuster in der Immunabwehr. So können Chitin und Chitinfragmente (Chitooligosaccharide) beispielsweise von Pflanzen wahrgenommen werden und die Immunabwehr auslösen (Wan et al., 2008). Weitere Abweichungen von Chitin dienen auch zur Kommunikation bei Symbiosen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen. Stickstoff-fixierende Bakterien produzieren Nod (*nodulation*) Faktoren, die die Knöllchenbildung der Wirtspflanzen induzieren (Lerouge et al., 1990). Diese Nod Faktoren sind Lipo-Chitooligosaccharide (LCO), die aus drei bis fünf GlcNAc Resten bestehen, die mit weiteren funktionellen Gruppen modifiziert sind (Dénarié et al., 1996).

Auch arbuskuläre Mycorrhiza (AM) Pilze produzieren LCOs, um mit den Pflanzen zu interagieren (Sun et al., 2015). Kürzlich wurde gezeigt, dass LCOs nicht nur von symbiontischen Mikroorganismen, sondern auch von vielen weiteren Pilzen gebildet werden und dabei pilzliches Wachstum und die Entwicklung regulieren (Rush et al., 2020). So wurde beispielsweise die Pseudohyphenbildung in *Candida glabrata* durch LCO induziert. Interessanterweise wurde die Produktion von LCOs in Rhizobien und AM Pilzen spezifisch durch bestimmte Signale der Wurzel induziert, wodurch eine zeitlich und räumliche Regulation der LCO Bildung stattfinden kann (Dénarié et al., 1996; Genre et al., 2013). Es gibt Hinweise, dass Chitinasen an der Modifikation der Nod Faktoren und dadurch an der Regulation der Knöllchenbildung beteiligt sind (Staehelein et al., 1992; Xie et al., 1999). In einer Studie wurde gezeigt, dass die Expression 8 Chitinase-codierender Gene ein unterschiedliches Muster bei der

Mykorrhizierung im Vergleich zur Infektion in *Medicago truncatula* zeigten (Salzer et al., 2000). So könnte es sein, dass in den *D. flagrans* Mutanten und einigen NFP Arten die Fallenbildung spezifisch durch Chitinasen der Bakterien und LCOs der Pilze induziert wird.

Interessanterweise erfolgte keine Bakterien-induzierte Fallenbildung im *D. flagrans* WT und vier weiteren getesteten *D. flagrans* Wildisolaten. Dies deutet auf ein spezifisches zelluläres Signalnetzwerk hin, welches durch die Deletion von *soft*, *makB*, oder *hexA* gestört ist. Die Lokalisation der Proteine in den jeweiligen Deletionsstämmen deutet auf eine spezifische Rolle von SofT bei der Regulation der Bakterien-vermittelten Fallenbildung hin. Durch Komplementationsanalysen wurde gezeigt, dass der N-Terminus mit WW Protein-Protein-Interaktionsdomäne dabei notwendig war, die Fallenbildung zu reprimieren. SofT ist mit 1213 kDa ein großes Protein und die Orthologen wurden in anderen Pilzen mit unterschiedlichen Funktionen in Verbindung gebracht (Huang et al., 2013; Maruyama et al., 2010; Tsukasaki et al., 2016). Neben der Funktion bei der Zell-Zell-Kommunikation und Hyphenfusion wurden auch Funktionen bei der Pathogenität und Stressregulation identifiziert. In *A. oryzae* führte die Deletion von AoSO zu einer verminderten Stressresistenz (Huang et al., 2013). AoSO lokalisierte in Stressgranula, die unter gewissen Stressbedingungen gebildet werden und zum Schutz von RNA vor Stress in Verbindung gebracht werden. Durch die heterologe Expression gekürzter AoSO Varianten in *Saccharomyces cerevisiae* und der Expression der Varianten in einer *A. oryzae* Δ AoSo Mutante wurden bestimmte Regionen des Proteins einzelnen Funktionen zugeordnet. Interessanterweise ist das vollständige Protein für die vegetative Hyphenfusion in *A. oryzae* notwendig. In dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass in *D. flagrans* lediglich der N-terminus mit vorhandener WW-Domäne für diese Funktion ausreichend ist. Bemerkenswerterweise ist der N-Terminus auch ausreichend, um die Bakterien-vermittelte Fallenbildung zu reprimieren. Notwendig für diese Funktion ist jedoch die konservierte WW-Protein-Interaktions-Domäne.

A. oligospora und *A. conoides* bildeten bei Kontakt mit den getesteten Bakterien Fallen aus. So entsteht die Frage, ob eine Veränderung der Proteinsequenz in *D. flagrans* SofT zur beobachteten Reprimierung der Fallenbildung im WT führt. Die Sequenzen von *D. flagrans* SofT und dem *A. oligospora* orthologen SO zeigen eine 94,03%ige Identität (bestimmt durch NCBI Blast 2 Protein Alignment) mit 64 Aminosäuren, die nicht miteinander übereinstimmen und einer Lücke im N-Terminus.

Die größten Unterschiede findet man dabei im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 300 – 400) direkt vor der konservierten WW-Protein-Interaktionsdomäne (**Abb. 41**). Durch eine Sequenzanalyse mit iupred2a wurde der N-Terminus von SoFT als intrinsisch ungeordneter Protein Bereich identifiziert. Diese Bereiche besitzen keine feste dreidimensionale Struktur, sodass eine hochspezifische Bindung an mehrere Interaktionspartnern ermöglicht und dadurch die Funktionsfähigkeit erhöht wird (Babu et al., 2012). Proteine mit intrinsisch ungeordneten Domänen spielen beispielsweise bei der Signaltransduktion und Transkription eine Rolle. Durch unterschiedliche Aminosäuren in diesen Bereichen des SoFT Proteins kommt es möglicherweise zu einer veränderten Bindung mit Interaktionspartnern, sodass in *D. flagrans* WT die Fallenbildung durch die Bakterien nicht induziert werden. Weitere Studien werden benötigt, um die vielseitigen Funktionen des N-terminalen Bereichs von SoFT zu charakterisieren. In Komplementationsanalysen könnten beispielsweise das jeweilige SoFT-orthologe in *D. flagrans* und *A. oligospora* ausgetauscht werden und die Bakterien-vermittelte Falleninduktion analysiert werden.

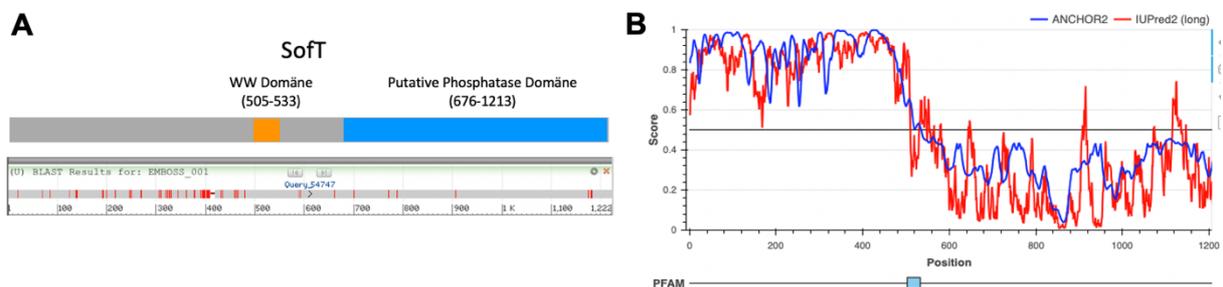


Abbildung 41: Vergleich der *D. flagrans* SoFT und *A. oligospora* So Sequenz. (A) Mit Hilfe von NCBI Protein BLAST wurden die zwei Sequenzen miteinander verglichen. Rote Bereiche im Alignment zeigen *Unterschiede* in der Aminosäuresequenz. Graue Bereiche des Alignments entsprechen einer 100%igen Übereinstimmung der Sequenz. (B) Intrinsisch ungeordnete Proteine Bereiche von *D. flagrans* SoFT wurden mit iupred2a bestimmt. Der Wert (zwischen 0 und 1) gibt die Tendenz zur Unordnung des Proteinbereichs an, wobei ein höherer Wert eine höhere Chance zur Unordnung besitzt. Die Wahrscheinlichkeit wurde mit den zwei Algorithmen ANCHOR2 und IUPred2 bestimmt.

Der C-Terminus der SO-orthologen ist stark konserviert und war in *A. oryzae* notwendig für die Stress-vermittelte Akkumulation in Stressgranula. Es könnte daher sein, dass die Deletion des C-Terminus zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Stress an der Zellwand führt und durch die aktive Bewegung der Bakterien entlang der Hyphen verursacht wird. Das in *S. macrospora* orthologe PRO40 dient als Gerüstprotein für den Zellwandintegritäts-Signalweg (*cell wall integrity*, CWI) und verbindet die MAP-Kinasen MEK1 und MIK1 mit der *upstream* regulierenden Proteinkinase C (PKC) (Teichert et al., 2014). Die direkte Interaktion des N-Terminus von PRO40 und PKC1 wurde in einem Hefe-zwei-Hybrid Experiment nachgewiesen.

Der CWI-Signalweg kontrolliert die Zellwandsynthese und Zellwandstress. Er beginnt mit der Wahrnehmung von Zellwandstress durch putative Mechanosensoren und mündet in einer konservierten MAP-Kinase Kaskade. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MAP-Kinase MakA des CWI-Signalwegs in *D. flagrans* nicht mit der Bakterien-induzierten Fallenbildung in Verbindung steht.

Da die direkte Interaktion des SofT orthologen PRO40 und PKC1 in *S. macrospora* nachgewiesen werden konnte, wurde die Rolle von PkcA in *D. flagrans* untersucht. PKC gehört zu der Familie der Serin/Threonin Kinasen. Mindestens 10 Isoformen wurden im Menschen identifiziert und werden mit schwerwiegenden Krankheiten wie Krebs und Alzheimer in Verbindung gebracht (Cooke et al., 2017; Khan et al., 2009). Wichtige Prozesse wie die Zellproliferation und Differenzierung werden durch PKC reguliert (Denning, 2004). Die Orthologen in Pilzen spielen nicht nur eine Rolle in der Wahrnehmung von Zellwandstress, sondern auch bei der Zellpolarität, Wachstum und Entwicklung (Jackson-Hayes et al., 2019; Katayama et al., 2012).

Der opportunistisch pathogene Pilz *Candida albicans* besitzt einen dimorphen Lebensstil, in dem der Wechsel vom Wachstum als Hefe zum filamentösen Wachstum für die Virulenz benötigt wird. Die Deletion des PKC-orthologen Capkc1 führte zum Verlust des filamentösen Wachstums, welches auch in der Präsenz von induzierendem humanen Serum ausblieb (Xie et al., 2016). Weiterhin wurde gezeigt, dass CapkC1 die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A phosphoryliert, und somit eine Verbindung der Stresswahrnehmung schafft. Daraus kann geschlossen werden, dass CaPkc1 für die morphologische Umwandlung und Virulenz benötigt wird. Der pflanzenpathogenen Pilz *Magnaporthe oryzae* verwendet spezialisierte Infektionsstrukturen (Appressorien), um Wirtspflanzen zu befallen (Ryder et al., 2019). Die gezielte Deletion des orthologen *PKC1* Gens war erfolglos und deutet auf essenzielle Funktionen bei Wachstum und Entwicklung hin (Penn et al., 2015). Die chemische Inhibierung von PKC1 verhinderte jedoch die Appressorienbildung. Anschließende Transkriptionsanalysen zeigten neben der Zellwandintegrität weitere PKC1-abhängige Signalnetzwerke und Stoffwechselwege. Transkriptomanalysen im NFP *D. stenobrocha* zeigten eine erhöhte Genexpression des orthologen Pkc Gens bei Kontakt mit Nematoden und deuten auf eine besondere Rolle bei der Fallenbildung hin (Liu et al., 2014).

Die chemische Inhibierung der PKC PkcA in *D. flagrans* WT und Δ soft Mutante verhinderte die Nematoden-, sowie Bakterien-induzierte Fallenbildung. Die Signalweiterleitung war jedoch unabhängig der *downstream* liegenden MAP-Kinase Signalweg von MakA und deutet somit auf die Interaktion von PkcA mit weiteren Signalnetzwerken bei der Fallenbildung. Das Zusammenspiel zellulärer Kompartimente wird benötigt, um Umweltstress wahrzunehmen. Stressgranula können sich bei Nährstoffmangel und Stress an der Plasmamembran assemblieren (Heinisch & Rodicio, 2017). In *S. cerevisiae* werden Eisosomen mit der Stressantwort an der Plasmamembran in Verbindung gebracht (Walther et al., 2006). Eisosomen sind Filament-ähnliche Multiproteinkomplexe, die in der Membran von Pilzen lokalisieren. Mit Hilfe weiterer Proteine können die Hauptbestandteile Pil1 (*phosphorylation inhibited by long-chain bases 1*) und Lsp1 (*long-chain bases stimulate phosphorylation 1*) die Membran einstülpen und eine Falte bilden, sodass eine Vertiefung entsteht (Karotki et al., 2011; Olivera-Couto et al., 2015). Die Regulation erfolgt durch Phosphorylierung von Pil1 und Lsp1 durch PKC-abhängige Kinase (Amen & Kaganovich, 2020; Luo et al., 2011). Insgesamt kann man 50 – 100 Eisosomen auf der Membranoberfläche von Hefen identifizieren. Sie formen sich bei Stress und assoziieren mit Nährstofftransportern und Ribonucleoproteinkomplexen (RNP) bei Nährstoffmangel. Es könnte daher sein, dass bei Nährstoffmangel, Präsenz von Bakterien und durch das Fehlen des C-Terminus von Soft die Regulation und Interaktion in Stressgranula verändert wird, sodass eine PKC-abhängige Induktion der Fallenbildung stattfinden kann.

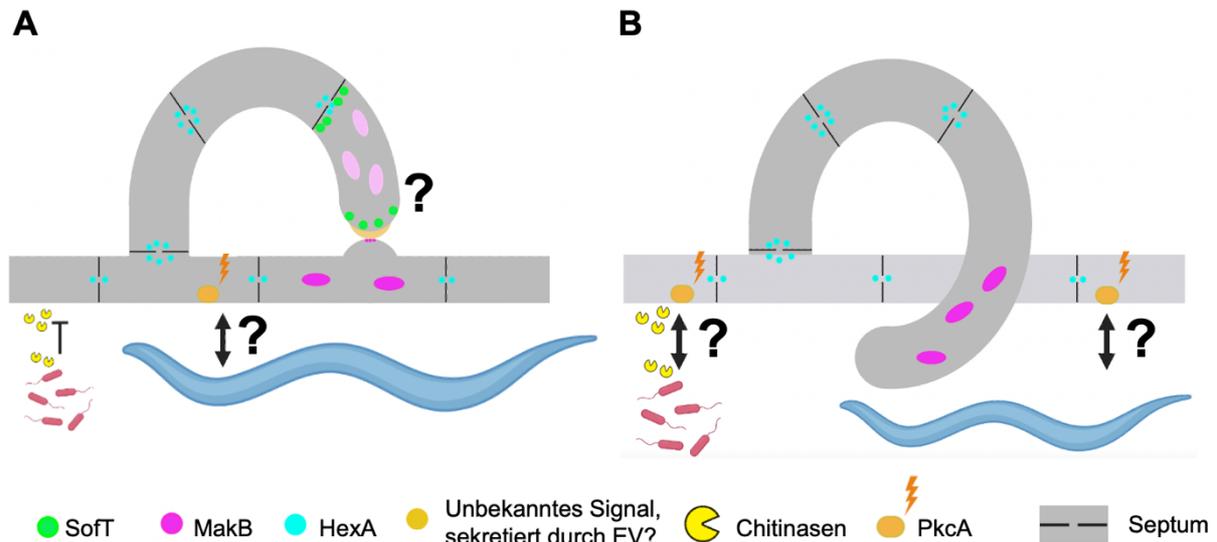


Abbildung 42: Das Zelldialog-Modell aus *N. crassa* ist in *D. flagrans* konserviert. (A) Während der Fallenbildung zeigt SofT eine oszillierende Lokalisation an der Plasmamembran der interagierenden Zellen. MakB zeigt eine oszillierende Lokalisation in den Zellkernen. Dabei ist das oszillierende Signal von SofT und MakB in den Partnerhyphen in genauer Gegenphase. Möglicherweise sind extrazelluläre Vesikel (EV) an der Sekretion des Signals für die Zellkommunikation beteiligt. Mehrere Woronin Körper lokalisieren an den septalen Poren der Falle und sind notwendig für die korrekte Lokalisation von SofT. Nematoden induzieren die Fallenbildung in *D. flagrans*, wobei in dieser Arbeit die Aktivität der Protein Kinase C (PkcA) notwendig war. Bakterien induzierten nicht die Fallenbildung in *D. flagrans* WT Hyphen. **(B)** In der $\Delta sofT$ Mutante ist der Ringschluss der Falle gestört. MakB zeigte weiterhin eine oszillierende Lokalisation in den Zellkernen. Neben der Induktion durch Nematoden, wurden die Fallen zusätzlich durch verschiedene Bakterien induziert. Möglicherweise sind Chitinasen an der Signalweiterleitung beteiligt. PkcA Aktivität war auch bei dieser Interaktion notwendig. Die Grafik wurde mit Hilfe von Biorender erstellt.

4.3 Die STRIPAK Komplex Komponente SipC wird für die Septierung und korrekte Fallenbildung in *D. flagrans* benötigt.

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen sind fundamentale posttranslationale Modifikationen, die die Proteinaktivität regulieren. Der in Eukaryoten konservierte *striatin-interacting phosphatase and kinase* (STRIPAK) Komplex ist durch seine Aktivität maßgeblich an diesen Modifikationen beteiligt. Durch physische Interaktion mit anderen konservierten Signalkaskaden entstehen komplexe Signalnetzwerke, die bei der Regulation fundamentaler zellulärer Prozesse beteiligt sind. In filamentösen Pilzen ist der Komplex an der Regulation des Wachstums, der Zellfusion und Differenzierung beteiligt (Kück et al., 2019). In dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass das STRIP1/2 orthologe SipC eine Rolle bei der Septierung, Sporen- und Fallenbildung spielt. Obwohl die ersten Schritte der Fallenbildung durch die Deletion von *sipC* unbeeinflusst waren, verloren die Fallen ihre Identität und re-differenzierten sich in normale vegetative Hyphen. Der gleiche Effekt wurde durch die chemische Depolymerisation des Aktinzytoskeletts beobachtet. Die STRIPAK Komplex-abhängige Regulation des Zytoskeletts wurde oft beschrieben (Sakuma et al., 2014; Sakuma et al., 2015). In Krebszellen führte beispielsweise die Strip1/2-

abhängige Regulation der GCKs MST3 und MST4 zur Kontraktion von Aktomyosin und resultierte in Zellmigration (Madsen et al., 2015). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen eine mögliche Verbindung zwischen dem STRIPAK Komplex, dem Aktinzytoskelett sowie der Identität der Fallen in *D. flagrans*.

In filamentösen Pilzen werden durch Aktinfilamente Aktinkabel, -ringe und patches gebildet (Berepiki et al., 2011). Aktinkabel werden durch Formine polymerisiert und lokalisieren an der Hyphenspitze. Sie sind beim polaren Wachstum involviert (Riquelme et al., 2018). Filamentöse Pilze besitzen normalerweise nur ein Formin-codierendes Gen, dessen Deletion beispielsweise in *A. nidulans* oder *N. crassa* letal ist (Justa-Schuch et al., 2010; Sharpless and Harris, 2002). Interessanterweise wurde PRO45 als Interaktionspartner von Formin in *S. macrospora* identifiziert (Nordzieke et al., 2015). Obwohl die genaue Funktion der Interaktion noch nicht geklärt ist, beeinflusst PRO45 möglicherweise die Aktivität des Formins. Das Wachstum der *D. flagrans* $\Delta sipC$ Mutante war stark verlangsamt und deutet auf eine mögliche Rolle bei der Aktinregulation an der Hyphenspitze hin. Neben dem Wachstumsdefekt hatte die Deletion von *sipC* einen großen Einfluss auf die Septierung. Diese war zwar nicht komplett eingeschränkt, die zeitliche Koordinierung scheint jedoch notwendig für die Fallenidentität zu sein. Ein ähnlicher Effekt wurde während der sexuellen Entwicklung der *S. macrospora* $\Delta pro22$ Gendeletionsmutante beobachtet, in der aspetierte Ascogonien einen Entwicklungsstop mit stark verlängerten Hyphen zeigte (Bloemendal et al., 2010).

In filamentösen Pilzen entstehen Kompartimente der Hyphen durch die Bildung von Septen. Während der Septierung kooperieren Aktinringe mit Klasse II Myosinen, um einen kontraktilen Ring zu bilden und einzuschnüren. Der Ringkomplex besteht aus weiteren Struktur- und Signalproteinen (Si et al., 2012). In *S. pombe* ist das *septation initiation network* (SIN) essenziell für die Septierung und wird durch den zum STRIPAK Komplex homologen SIP Komplex negativ reguliert. SIN und die dadurch regulierten Proteine sind in der Bildung des Aktinrings involviert. SIP dephosphoryliert die Ste20 Kinase Cdc7p, wodurch das SIN assembliert wird. Fehlregulation im SIP Komplex verhindern das Assemblieren von SIN (Singh et al., 2011). In *A. nidulans* wurde das Cdc7p homologe SepH als zentrale Komponente für die Initiierung der Septierung vor der Aktinringbildung identifiziert. SepH liegt *upstream* von SepL und SidB (Bruno et al., 2001; Kim et al., 2006). Wenn *sepH* herunterreguliert wird, fällt die Septierung in *A. nidulans* aus. Überexpression hingegen führt zu einem

Hyperseptierungs-Phänotyp, sodass SepH als positiver Regulator von SIN angesehen werden kann, der die Zytokinese in *A. nidulans* reguliert (Kim et al., 2006). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde in *S. macrospora* beobachtet, wenn das *sepL* orthologe *Smkin3* deletiert wird (Radchenko et al., 2018). Weiterhin interagiert das *S. macrospora* PRO45 mit einer Klasse II Myosin (Nordzieke et al., 2015). In dieser Doktorarbeit führte die Deletion der STRIPAK Komplex Komponente *sipC* zu einer stark reduzierten Anzahl an Septen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen in *S. macrospora* und in *S. pombe*. Dies deutet darauf hin, dass in *D. flagrans* die Septierung durch eine STRIPAK Komplex-abhängige Phosphorylierung des SIN reguliert wird. Die Deletion von *sipC* führt vermutlich zu einer erhöhten Phosphorylierung von Cdc7p, wodurch die SIN Assemblierung verhindert wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, wie SipC möglicherweise das Aktinzytoskelett und Septierung beeinflusst. Die Kompartimentsgröße, sowie Anzahl scheinen dabei eine große Rolle bei der Fellenidentität zu spielen.

4.4 Anwendungspotenzial von NFP zur biologischen Schädlingsbekämpfung von *X. index*

Pflanzenparasitäre Nematoden verursachen enorme Schäden in der Landwirtschaft weltweit. Trotz ihrer Wirksamkeit sind die meisten chemische Nematizide aufgrund ihrer Toxizität verboten. Daher werden langfristige ökologische Alternativen gebraucht. NFP zeigen dabei ein gutes Potenzial zur biologischen Schädlingsbekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden. In dieser Doktorarbeit wurde mit Hilfe von Infektionsstudien an Feigenpflanzen das Anwendungspotenzial von *D. flagrans* gegenüber dem pflanzenpathogenen Nematoden *X. index* getestet. In einem ersten Experiment wurde der Befall von Nematoden durch den Pilz drastisch reduziert. Es wurden NFP aus Erde eines Rebstocks isoliert und mit Hilfe von RFLP Wachstum von *D. flagrans* in dieser Erde gezeigt. Weiterhin zeigte *D. flagrans* eine hohe Fangrate von *X. index* *in vitro*. Die Verwendung von NFP aus dem Feld in Verbindung mit Felleninduzierenden Organismen oder Substanzen muss weiterhin überprüft werden. Die beobachtete Effizienz von *D. flagrans* in den Infektionsstudien in Topfkulturpflanzen deckt sich mit bisherigen Studien (Niu & Zhang, 2011; Peiris et al., 2020; Simon & Anamika, 2011; Singh et al., 2012). Die Effizienz muss jedoch näher an der realen Situation, oder im Idealfall direkt im Feld weiter getestet werden. Kürzlich wurde ein neu entwickeltes System zur Identifizierung von *X. index* resistenten

Rebunterlagen entwickelt (Schurig et al., 2021). Dieses ermöglicht die standardisierte Kultivierung von Weinreben bei *X. index* Infektion unter Laborbedingungen. Das System kann als Vorlage für Experimente mit NFP an Weinreben dienen. Die Verwendung von Erde eines Weinberges kann dabei reale Bedingungen simulieren. In einem nächsten Schritt kann die Effizienz zur biologischen Schädlingsbekämpfung erhöht werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Bakterien der Gattung *Delftia* die Fallenbildung in einem *A. conoides* Wildisolat eines Weinbergs induzierte. Weiterhin wurde *X. index* durch *A. conoides* gefangen und verdaut (**Abb. 43**).

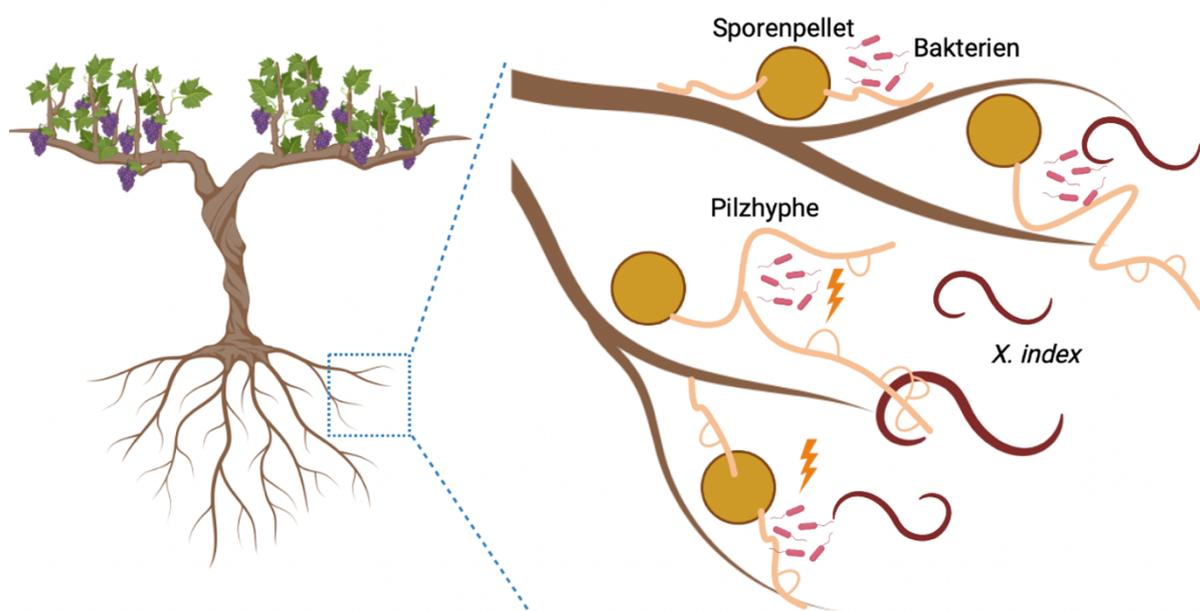
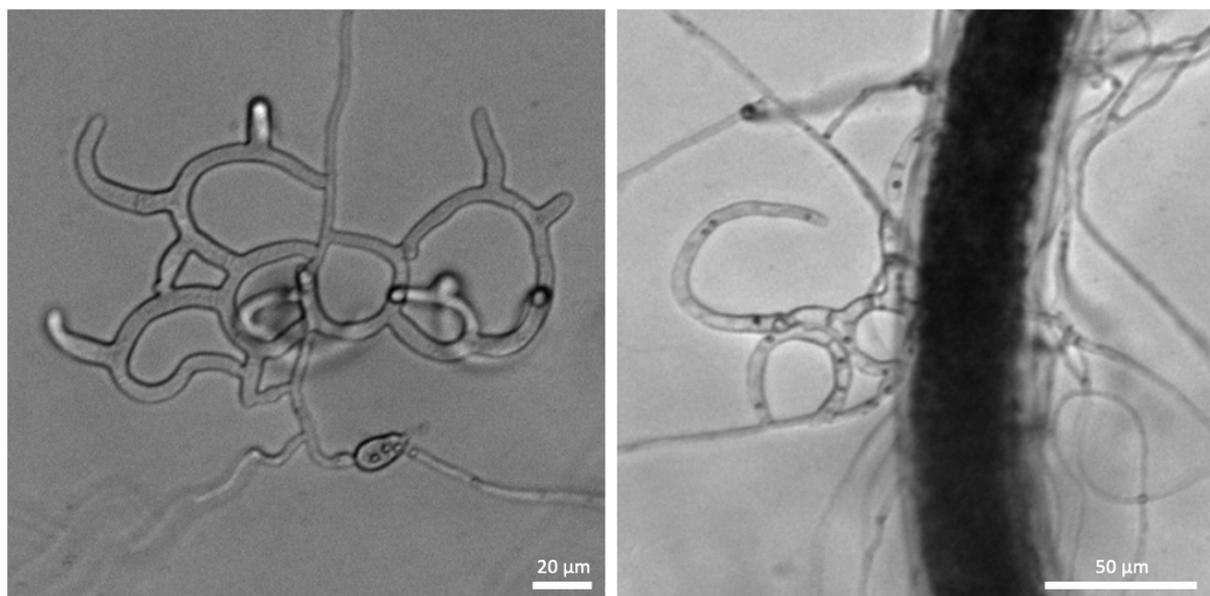


Abbildung 43: Steigerung des Anwendungspotenzial von NFP durch Bakterien. Oben: *A. conoides* bildet bei Präsenz von *X. index* Fallen aus und kann diese fangen und verdauen. Unten: Modell zur Effizienzsteigerung von NFP durch co-Inkubation mit Fallen-induzierenden Bakterien an Weinreben zur Bekämpfung von *X. index* Infektionen. Die Grafik wurde mit Hilfe von Biorender erstellt.

Es wurde gezeigt, dass *Delftia* Bakterien einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Pflanzen, sowie zur abwehrenden Eigenschaften gegenüber pflanzenpathogenen Pilzen besitzen (Han et al., 2005; Janahiraman et al., 2016). Durch die Kombination von NFP und Bakterium kann somit ein mikrobiologischer Schutzschild um die Wurzeln der Pflanze aufgebaut werden (**Abb. 43**).

Mögliche positive Effekte durch die Isolation und Verwendung von NFP aus dem Zielfeld müssen weiterhin überprüft werden. Diese ermöglicht jedoch eine einfache Etablierung in schon bestehenden Microfauna des Anwendungsbereichs.

5. Material & Methoden

5.1 Chemikalien und Geräte

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

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Mikroskope	Axio Imager Z1	Zeiss, Jena
	LSM 900	Zeiss, Jena
	Axio Observer Z1	Zeiss, Jena
	SteREO Lumar. V12	Zeiss, Jena
	Quanta 250 FEG	FEI, Brünn
LED-Lampe	LED Blue Line	Hydroca, Mannheim
Zentrifugen	Eppendorf 5415R	Eppendorf, Hamburg
	AccuSpin Micro 17	Fisher Scientific, Schwerte
	Universal 320 R	Hettich, Tuttlingen
PCR-Cycler	Labcycler	SensoQuest, Göttingen
Inkubatoren	Mintron AL 72	Infors HAT, Bottmingen-Basel
	Heraeus 6000	Heraeus, Instruments Hanau
Photospectrometer	Nanodrop Nd 1000	Peqlab, Erlangen
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophoresekammer	Mupid-exU	Advance, Tokyo
	Mini Protean Set	Bio-Rad, München
Gel Doc	FAS-V	Nippon Genetics
Autoklav	3870ELV	Tuttnauer, Breda
Gefrierschrank (-80 °C)	Innova U101	New Brunswick Scientific, Hamburg
Hybridisierungssofen	HB-1000 Hybridizer	UVP, Cambridge
Vortexer	Vortex-Genie2	Scientific Industry, Inc., New York

5.2 Kultivierung der Organismen

Kultivierung von *D. flagrans*

D. flagrans wurde bei 28 °C auf Kartoffel-Dextrose Agar (*potato dextrose agar*, PDA) oder in flüssigem Kartoffel-Dextrose Medium (*potato dextrose broth*, PDB) inkubiert. Die Inkubation der Flüssigkultur erfolgte bei 180 rpm. Je nach Bedarf wurden die Medien nach dem Autoklavieren mit den Antibiotika Hygromycin-B (100 µg/ml); Geneticin-Sulfat (150 µg/ml), oder Nourseothricin (100 µg/ml) ergänzt. Die verwendeten Medien und *D. flagrans* Stämme sind in Tabellen 3 und 4 gelistet. Für alle genetischen Studien wurde das Isolat CBS 349.94 verwendet.

Tabelle 3: Verwendete *D. flagrans* Medien

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Kartoffel-Dextrose-Medium	24 g Kartoffel-Dextrose-Bouillon pH-Wert 6,6 mit NaOH einstellen bei Bedarf 1,5 % Agar
Top-Agar	24 g Kartoffel-Dextrose-Bouillon 205 g Saccharose 0,3 g Pepton 0,3 g Hefeextrakt pH-Wert 6.6 mit NaOH einstellen 1,5 % Agar
Nährstoffarmes Medium	1,66 mM MgSO ₄ 5,4 µM ZnSO ₄ 2,6 µM MnSO ₄ 18,5 µM FeCl ₃ 13,4 mM KCL 0,34 µM Biotin 0,75 µM Thiamin pH 5.5 1 % Agar

Tabelle 4: Verwendete *D. flagrans* Stämme

Name	Genotyp	Referenz
CBS 349.94	Wildtyp	CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht Niederlande
CBS 143.89	Wildtyp	CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht Niederlande
CBS 343.94	Wildtyp	CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht Niederlande
CBS 565.50	Wildtyp	CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht Niederlande
sNH53	<i>broA::GFP; hph</i>	N. Wernet, KIT
sVW01	<i>sofT::hph (ΔsofT)</i>	Diese Arbeit
sVW03	<i>sipC::hph (ΔsipC); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW05	<i>ΔsipC; sipC(p)::sipC::sipC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW06	<i>ΔsofT; sofT(p)::sofT::sofT(t); neo</i>	Diese Arbeit
sVW08	<i>H2B(p)::H2B::mCherry::H2B(t); hph</i>	Diese Arbeit
sVW10	<i>H2B(p)::H2B::GFP::H2B(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW12	<i>ΔsofT; soft(p)::gfp::sofT</i>	Diese Arbeit
sVW13	<i>makB::hph (ΔmakB)</i>	Diese Arbeit
sVW14	<i>gpdA(p)::hexA::gluC(t); hph</i>	Diese Arbeit
sVW15	<i>ΔsipC; tubA(p)::mCherry::tubA::tubA(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW16	<i>ΔsipC; tubA(p)::lifeact::GFP::gluC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW18	<i>tubA(p)::mCherry::tubA::tubA(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW20	<i>ΔsofT; sofT(p)::sofT::gluC(t); neo; makB(p)::makB::makB(t); ntc</i>	Diese Arbeit
sVW19	<i>ΔmakB; makB(p)::makB::mCherry::makB(t); neo</i>	Diese Arbeit
sVW22	<i>ΔsipC; H2B(p)::H2B::GFP::H2B(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW24	<i>sVW10 + sipC(p)::H2B::mCherry::H2B(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW25	<i>tubA(p)::lifeact::GFP::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit

sVW26	<i>p12(p)::p12::mCherry::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW27	$\Delta sipC$; <i>p12(p)::p12::mCherry::gluC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
sVW28	<i>makA::hph</i> ($\Delta makA$)	Diese Arbeit
sVW29	<i>sofT::GFP; hph</i> Locus Integration	Diese Arbeit
sVW30	<i>hexA::hph</i> ($\Delta hexA$)	Diese Arbeit
sVW31	$\Delta hexA$; <i>sofT(p)::sofT::gluC(t); neo</i>	Diese Arbeit
sVW32	$\Delta hexA$; <i>makB(p)::makB::mCherry::makB(t); ntc</i>	Diese Arbeit
sVW33	<i>apsB::neo</i> ($\Delta apsB$)	Diese Arbeit
sVW34	<i>tubA(p)::mCherry::apsB::apsB(t); neo</i>	Diese Arbeit
sVW35	<i>sofT::GFP; hph; hexA::nat1</i> ($\Delta hexA$)	Diese Arbeit
sVW36	sVW18; <i>spa18::neo</i> ($\Delta spa18$)	Diese Arbeit
sVW37	sVW18; <i>spa10::neo</i> ($\Delta spa10$)	Diese Arbeit
sVW38	<i>spa10::neo</i> ($\Delta spa10$)	Diese Arbeit
sVW39	$\Delta sofT$; <i>hph; pkcA::mCherry::pkcA(t); neo</i>	Diese Arbeit
sVW40	<i>sofT(p)::sofT</i> (N-Terminus); <i>neo</i>	Diese Arbeit
sVW41	<i>sofT(p)::sofT</i> (C-Terminus); <i>neo</i>	Diese Arbeit
sVW43	<i>sofT(p)::sofT</i> (N-Terminus ohne WW-Domäne); <i>neo</i>	Diese Arbeit
sVW44	<i>hamA::hph</i> ($\Delta hamA$)	Diese Arbeit

Kultivierung von *C. elegans*

C. elegans wurde bei 20 °C auf *nematode-growth medium* (NGM) mit einem *Escherichia coli* OP50 Rasen kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte alle 7 Tage. Dafür wurde ein circa 0,5 cm großer Agarblock mit einem sterilen Spatel ausgeschnitten und an den Rand des Bakterienrasens einer frischen NGM-Agarplatte überführt. Für die Experimente mit NFP wurden Nematoden mit sterilem Wasser von den Agarplatten gespült. Um Bakterien aus der Kultur zu minimieren, wurden die Nematoden für eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und die Würmer mit sterilem Wasser gewaschen. Es wurde so oft gewaschen, bis der Überstand klar blieb. Die Anzahl an Individuen wurde mikroskopisch überprüft, indem die Anzahl in drei 1:10 verdünnten 10 µl Tropfen quantifiziert wurde. Die verwendeten *C. elegans* Stämme und Medien sind in Tabellen 5 und 6 aufgelistet.

Synchronisieren einer *C. elegans* Kultur

Um eine *C. elegans* Kultur im ersten Larvenstadium (L1) zu synchronisieren, wurden alle Nematoden einer NGM Agarplatte mit 4 ml sterilem Wasser gespült und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gefäß wurde auf 15 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt und bei 1200 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde

vorsichtig mit der Pipette entfernt und die Nematoden erneut durch die Zugabe von Wasser und Zentrifugation gewaschen. Es wurde so lange gewaschen, bis der Überstand klar wurde. Das Nematoden Pellet wurde mit 4 ml Wasser, 1,5 ml NaOH (5 M) und 500 µl Natriumhypochloritlösung (5 %) versehen und für 5 Minuten bei mittlerer Intensität gevortext. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß auf 15 ml mit Wasser aufgefüllt, für eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert und die Nematodeneier insgesamt drei Mal mit etwa 15 ml Wasser gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 2 ml M9 Puffer zu den Eiern pipettiert und diese in eine kleine Petrischale überführt und bei 20 °C über Nacht inkubiert. Die geschlüpften L1 Larven wurden anschließend auf frische NGM-Agarplatten mit OP50 Rasen überführt.

Tabelle 5: Verwendete *C. elegans* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
N2	/	Institut für Biologie III, Bioinformatik und Molekulargenetik, Freiburg
BAN126	<i>zuls178</i> <i>(his-72p::<i>his-72::gfp</i>)</i>	Dr. Daniele Bano, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Bonn

Tabelle 6: Medien für die Kultivierung von *C. elegans*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
NGM-Agar	3 g NaCl 2,5 g Pepton 1 ml Cholesterol (5 mg/ml Stammlösung in Ethanol) 20 g Agar -autoklavieren- Sterilfiltrierte Lösungen zugeben 1 ml CaCl ₂ (1M) 1 ml MgSO ₄ (1M) 25 ml KPO ₄ Puffer (1M)

M9-Puffer	3 g KH ₂ PO ₄
	6 g Na ₂ HPO ₄
	5 g NaCl
	1 ml MgSO ₄ (1M)

Kultivierung von *E. coli*

Die Inkubation von *E. coli* wurde mit *Luria Bertani* (LB) oder *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC) durchgeführt. Festmedien waren zusätzlich mit 1,5 % Agar versehen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und bei Flüssigkulturen bei 180 rpm. Zur Selektion wurde das Medium bei Bedarf mit Ampicillin (100 µg/ml) ergänzt. Verwendete Stämme und Medien sind in Tabellen 7 und 8 gelistet.

Tabelle 7: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
TOP10	<i>F-</i> <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80, <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galE15 galK16</i> <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1</i> λ ⁻	Invitrogen, Karlsruhe
OP50	<i>ura-</i>	Institut für Biologie III, Bioinformatik und Molekulargenetik, Freiburg
BL21	<i>F-</i> <i>ompT hsdSB</i> (<i>rB-</i> <i>mB-</i>) <i>gal dcm</i> (<i>DE3</i>)	Novagen, Darmstadt

Kultivierung diverser Bakterien

Kultivierung von *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. cloaca* und *P. mirabilis* erfolgte auf LB Festmedium bei 37 °C. Kultivierung von *Delftia*, *P. stutzeri* und *S. marcescent* erfolgte in LB Festmedium bei 28 °C, oder in Flüssigmedium bei 28 °C und 180 rpm.

Tabelle 8: Verwendete Medien für die Kultivierung von *E. coli* und weiteren Bakterien

Medium	Zusammensetzung pro Liter
LB	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7.0
SOC	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 0,19 g KCl 2 g MgCl ₂ x 6H ₂ O 3,6 g Glucose pH 7.0

Kultivierung diverser NFP

Kultivierung von *A. conoides*, *A. oligospora*, *A. musiformis*, *D. stenobrocha* und *D. haptotyla* erfolgte bei PDA bei 28 °C.

Zucht und Extraktion von *X. index*

Die Anzucht von *X. index* erfolgte an *F. carica*. Die Feigenpflanzen wurden aus Holzstecklingen in Wasser gezogen und nach erfolgreicher Bewurzelung in Perlite überführt. Die Kultivierung erfolgte bei Raumtemperatur und 16 Stunden Lichttag (Hydroca LED Blue Line 416). Die Pflanzen wurden einmal wöchentlich mit Long-Ashton-Nährlösung gedüngt.

Für die Nematodenzucht wurden einzelne Feigenpflanzen nach zwei bis drei Monaten in 500 g Sand (Körnung 2 mm) überführt und mit adulten Nematoden infiziert. Die infizierten Pflanzen wurden täglich auf 40 % der maximalen Wasserkapazität (WC_{max}) gegossen. Nematoden wurden frühestens nach 6 Monaten Inkubation aus dem Sand extrahiert. Dafür wurde der komplette Sand einer Pflanze in eine Schale gegeben und mit Wasser mehrmals aufgeschwemmt. Anschließend wurde der Überstand auf ein Analysesieb (80 µm Maschenweite) mit insgesamt 5 l Wasser dekantiert. Siebrückstände wurden mit einer Spritzflasche in einem neuen Gefäß gesammelt und die Nematoden über einen modifizierten Baerman-Trichter extrahiert. Ein Trichter wurde mit einem 20 cm langen Gummischlauch erweitert und am Ende mit einer

Schlauchklemme verschlossen. In den Trichter wurde eine Lage Miracloth gelegt und mit Nematodensuspension aufgefüllt und über Nacht inkubiert. Einzelne Nematoden wurden anschließend mit einem feinen Metalldraht und einem Steromikroskop überführt und für weitere Experimente verwendet.

Isolation von NFP aus Erdproben

Circa 10 g Erde einer Erdprobe aus dem Staatsweingut Durlach wurde mit 10 ml Wasser vermennt und für 30 Minuten bei 180 rpm gemischt. Anschließend wurden 50 µl der Suspension auf Wasseragar mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Chloramphenicol verteilt. Die Fallenbildung der NFP wurde durch die Zugabe von circa 2000 *C. elegans* Larven induziert und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 bis 7 Tagen wurden einzelne Sporen der Isolate mit Hilfe eines Stereomikroskop und einer dünnen Nadel auf frische Agarplatten überführt und angereichert.

Infektionsexperimente mit *X. index*

Infektionsexperimente mit *X. index* wurden in 80 g sterilisiertem Quarzsand (Körnung 2mm) in 50 ml Reaktionsgefäßen gemäß dem Substrattest durchgeführt (Schaaf, 2000). *F. carica* Samen wurden über Nacht bei 4 °C Kälte-stratifiziert. Vor dem Pflanzen wurden die Samen für eine Minute in 70 % Ethanol sterilisiert. Anschließend wurden sie drei Mal mit sterilem Wasser gewaschen und 15 Minuten in Chlorixlösung (5 % Natriumhypochlorid) inkubiert. Weiterhin wurden die Samen drei Mal mit sterilem Wasser gewaschen und in den Reaktionsgefäßen gepflanzt. Dafür wurden sie mit einer dünnen Sandschicht bedeckt. Die Samen keimten nach 14 bis 21 Tagen bei Raumtemperatur und einem 16-stündigen Lichtzyklus aus. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 8 Wochen. Die Pflanzen wurden täglich auf 60 % WCmax gegossen und einmal wöchentlich mit Long-Ashton-Nährlösung gedüngt. Für die Infektionsversuche wurde jede Pflanze mit 25 handverlesenen adulten *X. index* Weibchen infiziert. Dafür wurde ein kleines Loch in den Sand mit der Rückseite einer Pasteurpipette gegraben und die Nematoden in die Nähe der Wurzelzone pipettiert. Den getesteten Pflanzen wurden weiterhin 24 Stunden nach Zugabe der Nematoden 4×10^4 Sporen/g Sand als Sporensuspension zugegeben. Nach 40 Tagen wurde die Anzahl an Larven quantifiziert. Dafür wurde der Sand jeder Probe mit insgesamt 2 l Wasser wie oben beschrieben ausgewaschen. In einer mit einem Zählgitter versehenen Petrischale

wurden alle Nematoden einer Probe mit Hilfe eines Stereomikroskops quantifiziert. Pro Versuchsbedingung wurden fünf Replikate angesetzt.

Tabelle 9: Zusammensetzung von Long-Ashton Dünger

Macroelemente	Microelemente
1.5 mM MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,05 mM Fe(Na)-EDTA
8 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	0,01 mM MnSO ₄
4 mM K ₂ SO ₄	0,001 mM CuSO ₄ x 5H ₂ O
4 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,001 mM ZnSO ₄ x 7H ₂ O
1,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	0,1 NaCl
	0,05 H ₃ BO ₃
	0,0005 mM Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O
	0,002 mM CoSO ₄ x 7H ₂ O

Pelletierung und Keimfähigkeit von *D. flagrans* Sporen in Natriumalginat

D. flagrans Sporen einer 7-Tage alten PDA Agarplatte wurden mit sterilem Wasser und einem Drigalski-Spatel isoliert. Die Sporensuspension wurde durch einlagiges Miracloth gefiltert und in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach einer Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Sporen in 3 ml Wasser resuspendiert. Mit Hilfe einer Zählkammer wurde die Sporenmenge quantifiziert. Die Pilzsporen wurden anschließend in 1 % Natriumalginat (w/V) Lösung gebracht und tropfenweise in eine 0,1 M CaCl₂ Lösung pipettiert. Die entstehenden Pellets wurden gesammelt und für weitere Experimente verwendet. Die Keimfähigkeit der Sporen wurde auf PDA und in Erde des Staatsweinguts Durlach überprüft. Dafür wurden Erde in eine Petrischale gefüllt und mit *D. flagrans* Pellets inokuliert. Nach 14 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurde DNA aus der Erde isoliert und analysiert.

Wurzelklärung und WGAFITC Färbung

Nach 40 Tagen co-Inkubation von *D. flagrans* und *F. carica* Keimlingen in Sand wurden die Wurzeln mit Wasser abgespült, in kleine Stücke geschnitten und mit KOH (10 %) bei 80 °C für eine Stunde schüttelnd inkubiert, um das Wachstum des Myzels an den Wurzeln zu visualisieren. Anschließend wurden die Proben drei Mal mit 1x PBST-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, + 0,02 % Tween20) gewaschen und mit HCl (1 %) für 5 Minuten bei Raumtemperatur

angesäuert. Die Wurzeln wurden erneut drei Mal mit Wasser und drei Mal mit 1x PBST-Puffer (+ 0,02 % Tween20) gewaschen. Zur Visualisierung des Myzels wurde die Proben mit dem Farbstoff *Wheat Germ Agglutinin*, Alexa Fluor 488 (WGA-FITC) über Nacht bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wurzeln drei Mal mit 1x PBST-Puffer (+ 0,02 % Tween20) gewaschen und anschließend mikroskopiert.

5.3 Molekularbiologische Methoden

Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe von Q5-, Phusion-, oder Taq-Polymerase. Verwendete Oligonukleotide sind in Tabelle 10 gelistet. Eine Standard-PCR Reaktion wurde in einem Endvolumen von 50 µl mit jeweils 0,2 µM Oligonukleotiden und 200 µM Deoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) durchgeführt. Die von den Herstellern empfohlenen Reaktionspuffer in 1x Endkonzentration und 0,2 µl (entspricht etwa 1,25 Einheiten) Polymerase wurden zugegeben. Die Menge der DNA-Matrize lag im Bereich zwischen 5 und 500 µg pro Reaktion. Ein Standard PCR-Programm betrug 35 Zyklen, wobei für Q5- und Phusion-Polymerase die Denaturierung bei 98 °C, beziehungsweise für Taq-Polymerase bei 95 °C durchgeführt wurde. Als Polymerisationstemperatur wurden für Q5- und Phusion-Polymerase 72 °C, beziehungsweise 68 °C für Taq-Polymerase verwendet. Die Primerhybridisierung wurde an die jeweilig verwendete Sequenz angepasst. PCR-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide dieser Arbeit

Bezeichnung	Sequenz (5' => 3')	Verwendung
sofT_target	TTCTAATACGACTCACTATAGAAATTACAGCCTGCTCCCGCTTTTAGAGC TAGA	sgRNA Synthese Δ sofT
lb_fwd	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Δ makB
mak2_LB_hphOL_rev	CCTCCACTAGCATTACACTTGTGGCTACTGACTACCCAC	
mak2_hph_LBOL_fwd	TGTGGGGTAGTCAGTAGCCAACAAGTGAATGCTAGTGGAGGTC	
mak2_hph_RBOL_rev	TCCGCCACCACCAAACACTGCCGATTGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
mak2_RB_hphOL_fwd	ATGCTCTTCCCTAAACTCCCCCAATCGGCAGTGTGGTGGTG	
rb_rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATCATGTTTGAATTCACAGCATTGC	
mak2_ch_loc_fwd	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATAACCACGAGAACATCATTCC	MakB-mCherry
mcherry_mak2ollo_fwd	GTTGATCTTTGAGGAAATCATGCCGATGGTAAGCAAGGGCGAGG	
mcherry_hphOL_rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTCTATTTGTAGAGTTCATCCATTCC	
mak2_rb_loc_fwd	ATGCTCTTCCCTAAACTCCCCCAATCGGCAGTGTGGTGGTG	
mak2_rb_loc_rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATGGTAAGCAGAAAATATCCTCTC	

gpdP_mCherryOL_fwd	TGGAATGGATGAACTCTACAAATAGGGTATCTATTACATTGCATTGCCG	
trpC_mak2OLRB_rev	TCCGCCACCACCAAACACTGCCGATTGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
botMcherry_stop_rev	CTATTTGTAGAGTTCATCCATTCC	
softpr_gfp_prom_fwd	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAGACGACCGCGAAGCATTTTA	GFP-Soft
softpr_gfp_prom_rev	TACTTACCTCACCTTGAAACCATTGTGGAGACGAAGGCAAAGG	
gfp_soft_fwd	TCACACCTTTGCCTTCGTCTCCACAATGGTTTCCAAGGGTGAGG	
gfp_soft_rev	GTTCTGTCTCCGCGACGGCCGGCCATAGCGGCCGCTTTGTAAAGTT	
softorf_gfp_fwd	GGATGAACTTTACAAAGCGGCCGCTATGGCCGGCCGTCGCGGA	
softorf_gfp_rev	TAATCATACATCTTATCTACATACGTTAATACCCATACTCGCATCTGGGG	
hexA_crispr_target	TTCTAATACGACTCACTATAGCACCACCAGCTGAATACTTGTTTTAGAGC TAGA	sgRNA Δ hexA
hexon6_crispr_repair_fwd	CCCCAAGCCCTCCAAGATGTCTGAACACTCCACCCGCCACAAGTGAATG CTAGTGGAGGTC	Repair template Δ hexA
hexon6_crispr_repair_rev:	GGCTGTCTCGACGGGTGGAAGAATTCATCGACCTTGCGGTGGGGGGA GTTTAGGGAAAG	Δ hexA HR
hexA_ko_lb_fwd	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGATGGGCGAGGTTTAATTTCC	
hexA_ko_lb_rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTTTTTTGCTCCAGGCTGGGG	
hexA_ko_hph_fwd	GAAGGGGCCCCAGCCTGGAGCAAAAAAAGTGAATGCTAGTGGAGGTC	
hexA_ko_hph_rev	AGTAAATGCAAGAGAAACGATGCATTGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
hexA_ko_rb_fwd	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAATGCATCGTTTTCTTGCATTTAC	
hexA_ko_rb_rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATTGCCCGATTTTACTTGTAAATAG	
hexA_fwd	GGATGAACTTTACAAAGCGGCCGCTATGTCTGAACACTCCACCC	HexA-GFP
hexA_rev	TAATCATACATCTTATCTACATACGTTAAAGCTTGAAGTCACCGTG	
pro22_ko_LB_fwd	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCGATGCCTAACTGATATGGTAG	Δ sipC
pro22_ko_LB_rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTTTTGATGGTATATTTGGGAGGTG	
pro22_ko_hph_fwd	ACCACCTCCCAAATATACCATCAAAAAGTGAATGCTAGTGGAGGTC	
pro22_kp_hph_rev	GGGTCGCCACCTTCTGGCCCTCGTTTGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
pro22_ko_RB_fwd	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAACGAGGGCCAGAAGGTGG	
pro22_ko_RB_rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATCCAGTTTGTGAGGTGCTAAAC	
pro22_rek_prom_fwd	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCGAAACTTCTCTGGAAGCGA	Δ sipC Rescue
pro22_term_rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTCCAGTTTGTGAGGTGCTAAA	
pro22_g418_fwd	GTCGGTTTAGCACCTGACAAACTGGAAGTGAATGCTAGTGGAGGT	
pro22_g418_rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATTGGGGGGAGTTTAGGGAAA	
tubP_hphol_fwd	TGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAGTAGCTGCCAGCAAACCTC	mCherry-TubA
tubP_RFPol_rev	TACTTACCTCGCCCTTGCTTACCATGATGAATTATATTTTCGTCGAAGAAGA	
RFP_tubPol_fwd	TCTTCTTGACGAAATATAATTCATCATGGTAAGCAAGGGCGAGG	
RFP_tubAol_rev	CGTTGATAGAAACAACCTCACGCATTTTGTAGAGTTCATCCATTCCAC	
TubA_RFPol_fwd	CGGTGGAATGGATGAACTCTACAAAATGCGTGAAGTTGTTTCTATCAAC	
Df_tubA_term_rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATATACCGTGTGGCTGCCGAA	
lifeact_botgfp_fwd	ATGGGCGTGGCCGACCTGATCAAGAAGTTCGAGAGCATCAGCAAGGAAG AGATGGTTTCCAAGGGTGAGG	LifeAct-GFP
df_tub_rev	TGCAATTGTTGATGTTTCAGGC	
tgluc_fwd	CGTATGTAGATAAGATGTATGATTAG	
lifeact_tubOL_fwd	GAAAGCCTGAACATCAACAATTGCAATGGGCGTGGCCGACCT	

gfp_cterm_tglucol_rev	AATCATACATCTTATCTACATACGTTATTTGTAAAGTTCATCCATTCCCA	
p12_lb_hph_ol_fwd	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAGAGCAGCTCCGAAAGCAAAG	P12-mCherry
p12_ns_mch_ol_rev	TACTTACCTCGCCCTTGCTTACCATAGTGTGCGCAAGTGTAGCCG	
lb fwd	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGAGAAGAAAGGAGCAAATCG	H2B-mCherry
Lb rev	TACTTACCTCGCCCTTGCTTACCATGGCGCGCCTTTTGGCAGACGAGGAA GAGTA	
mcherry fwd	AGTACTCTTCCTCGTCTGCCAAAAGGCGCGCCATGGTAAGCAAGGGCGA G	
mcherry rev	GTTGACCTCCACTAGCATTACACTTTTTATTTGTAGAGTTCATCCATTCC	
hph fwd	TGGAATGGATGAAGTCTACAAATAAAAGTGAATGCTAGTGGAGGTCAAC	
hph rev	CGGAACCAAAAAAGACTTCAAATGCTGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
rb fwd	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAGCATTGAAGTCTTTTTGGTTC	
rb rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATACCTTAAACCCGAGGATGTTT	
g418_fwd	TTACCTATTCTACCCAAGCATCCAAATGATTGAACAAGATGGATTGCAC	H2B, neo
g418_rev	TAGTGGGGATCGGTCGGCATCTACTTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGG	
H2B_cherry_trpC_ter_fwd	TCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGA AGTAGATGCCGACCGATCC	
H2B_cherry_trpC_pr_rev	CGTGCAATCCATCTTGTTCATCATTGGATGCTTGGGTAGAATAG	
trpC_rev	TGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	Plasmid backbone
tgluc_fwd	CGTATGTAGATAAGATGTATGATTAG	Plasmid backbone
h2b_orf_fwd	ATGCCACCAAAGCCGCC	Plasmid backbone
pro22prom_trpCOL_fwd	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAGATGCCTAACTGATATGGTAG	sipC Promoterfusion
pro22prom_H2BOL_rev	TTTCGGCGGCGGCTTTTGGTGGCATTGATGGTATATTTGGGAGGTG	
apsb_lb_pjetol_fwd	ATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGAAAAACGATGCGAGGATC	Δ apsB
apsb_lb_g418nOL_rev	AACGCAATGCAATGTAATAGATACCTTTTATCGGTCACTCCTTCATC	
g418_apsblbol_fwd	CTTGATGAAGGAGTGACCGATAAAAAGGTATCTATTACATTGCATTGCG	
g418_apsrbol_rev	ATATCACCAGAAGAAAAGAAAACAATGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
apsb_rb_g418ol_fwd	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATTGTTTTCTTTCTTCTGGTGATAT	
apsb_rb_pjetol_rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATGCAATCAAAAAGAGAGTGGAG	
apsb_mcherry_fwd:	CGGTGGAATGGATGAACTCTACAAAATGGCGAGCACAAATCAGCG	mCherry-ApsB
apsb_mcherry_rev	TGAACAAAGATCCAATGCGATTCTACTCATCCTTCTTCCCTC	
mak2_prom_hphOL_fwd	ATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCAGCAGATTTCAACCTCAAACAGA	makB-mCherry
mak2_orf_cherryOL_rev	TACTTACCTCGCCCTTGCTTACCATCCGCATGATTTCTCAAAGAT	
mcherry_mak2OL_fwd	GTTGATCTTTGAGGAAATCATGCGGATGGTAAGCAAGGGCGGAGG	
mcherry_gluCOL_rev	TAATCATACATCTTATCTACATACGCTATTTGTAGAGTTCATCCATTCC	
spa18_lb_pjol_fwd	CTCGAGTTTTTCAGCAAGATCCGAGATTCTGGTATCGAG	Δ spa18
spa18_lb_RES1ol_rev	AATGCAATGTAATAGATACCTTTTGTCTTTCTCTTTCTGTAATTTT	
spa18_RES1_fwd	CACGAAAGAGAAAAACAAAAGGTATCTATTACATTGCATTGCG	
spa18_RES1_rev	ATAGAAAAGGGTGTATGTTGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
spa18_RB_fwd	CTTTCCCTAAACTCCCCCAACATGACACCCTTTTCTATATAC	
spa18_rb_pjol_rev	AGGAGATCTTCTAGAAAAGATAAACGCAGTACTCGGTTGTC	
spa10_lb_pjetol_fwd	CTCGAGTTTTTCAGCAAGATGTACATACAGAATAGCGCACC	Δ spa10
spa10_lb_g418ol_rev	AATGCAATGTAATAGATACCGGCTGTGGTTGGCATGTC	
spa10_RES1_fwd	CCGACATGCCAACACAGCCGGTATCTATTACATTGCATTGCG	
spa10_RES1_rev	GGTGGTGACAAGACAGGCGTTGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
spa10_RB_resiOL_fwd	CTTTCCCTAAACTCCCCCAACGCTGTCTTGTCAACCAC	
spa10_RB_pjol_rev	AGGAGATCTTCTAGAAAAGATTTCCGCACTGTCCAGCTTG	

soft_gfp_locus_fwd	CTCGAGTTTTTCAGCAAGATTACCGTCCTCAGTACAACATG	Soft-GFP <i>Locus</i>
soft_gfp_locus_rev	ACCTCACCCCTTGGAAACCATATACCCATACTCGCATCTGG	
soft_GFPcas_fwd	CCAGATGCGAGTATGGGTATATGGTTTTCCAAGGGTGAGG	
soft_GFPcas_rev	CAACCGCCCGGACGAATCATTGGGGGAGTTTAGGGAAA	
soft_Term_fwd	CTTCCCTAAACTCCCCCAATGATTCGTCGGGGCGGTT	
softterm_gfp_rev	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATTGGGACGAGTGGGATTTAAATGGA	
softProm_trpCOL_fwd	CTTCCCTAAACTCCCCCACAGAGTTCGAATAGCGTTGC	Soft C-Terminus <i>Rescue</i>
softProm_CtermOL_rev	ATACCGGTCTCCGGTGCCATTGTGGAGACGAAGGCAAAG	
softCterm_fwd	CCTTTGCCTTCGTCTCCACAATGGCACCGGAGACCGGTATT	
softCterm_tgluC_rev	ATACATCTTATCTACATACGTTAATACCCATACTCGCATCTG	
soft_Nterm_tgluCOL_rev	ATACATCTTATCTACATACGTTAATACCGGTCTCCGGTGC	Soft N-Terminus <i>Rescue</i>
soft_ntermnoWW_tgluCol_rev	ATACATCTTATCTACATACGTTATGGAAGAGGTGGGGGAGA	Soft N-Terminus <i>No WW Rescue</i>
pkcA_loc_tag_fwd	CTCGAGTTTTTCAGCAAGAT ATGCTAGCTGAAACAAAGGCTACTAA	PkcA-mCherry
pkcA_loc_tag_rev	ACCTCGCCCTTGCTTACCATTACAAAGTCTGCTGTGTACGAAAATC	
pkcA_cass_fwd	CGTACACAGCAGACTTTGTAATGGTAAGCAAGGGCGAGG	
pkcA_cassRBoI_rev	GCCCAAACCAATGGTGGTGATGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
pkcA_rb_fwd	CTTCCCTAAACTCCCCCATCACCACCATTGGTTTTGGG	
pkcA_rb_rev	AGGAGATCTTCTAGAAAGATCCCAAGGTGCATAGAATGG	
ham10_lb_fwd	CTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGCGGATATCAATCTTATCTTG	$\Delta hamA$
ham10_lb_rev	CCTCCACTAGCATTACACTTGGTGACCGAAATCGCCTTAT	
ham10_hph_fwd	ATAAGGCGATTTCCGGTCACCAAGTGAATGCTAGTGGAGG	
ham10_hph_rev	CACAAGGATGGCTTCCCATTTGGGGGGAGTTTAGGGAAAG	
ham10_rb_fwd	CTTCCCTAAACTCCCCCAAATGGGAAGCCATCCTTGTG	
ham10_rb_rev	AGGAGATCTTCTAGAAAGATCGTTCCGATTTACTCGTGC	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Bestätigung von Pilzarten
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Bestätigung von Pilzarten
Bak27F	GAGTTTGATCCTGGCTCA	Bestätigung von Bakterien
U1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	Bestätigung von Bakterien
pjet_kill_fwd	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	pJET1.2 Sequenzierung
pjet_kill_rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	pJET1.2 Sequenzierung

Gelelektrophorese

Mit Hilfe von 0,8 % Agarosegelen wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde der DNA-interkalierende Farbstoff MIDORI Green Advance (Nippon Genetics) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in 0,5x TAE-Puffer (40 mM TRIS-Acetat pH 8.0; 1 mM EDTA) bei 100 Volt für 30 Minuten durchgeführt. Als Größenstandard wurde der 1kb DNA Marker (NEB) verwendet. Gele wurden nach der Auftrennung im FAS V Geldokumentationssystem (Nippon Genetics) betrachtet. Mit Hilfe des Zymoclean Gel DNA Extraction Kit (Zymo Research) oder des FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) wurden einzelne DNA-Fragmente nach den Protokollen der Hersteller aufgereinigt und Quantität und Qualität durch ein Spektralphotometer (Nanodrop ND-1000, Peqlab) bestimmt.

Gibson Assembly

Mit Hilfe überlappender DNA-Sequenzen wurden DNA-Fragmente durch Gibson Assembly miteinander verbunden und in Zielplasmide kloniert. Die Reaktion erfolgte bei 50 °C für 30 bis 60 Minuten in einem 15 µl Mastermix, der mit den zu verbindenden DNA-Fragmenten auf 20 µl aufgefüllt wurde.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer für Gibson Assembly

Puffer	Zusammensetzung
5x ISO-Puffer	3 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 300 µl 1 M MgCl ₂ 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 ddH ₂ O (bidestilliert) 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 ddH ₂ O

Transformation von *E. coli* und Plasmid-DNA-Präparation

Zur Klonierung erfolgte die Transformation von Plasmiden im *E. coli* Stamm TOP10. Ein 50 µl Aliquot wurde dafür für 5 Minuten auf Eis aufgetaut und 10 µl der Gibson Assembly Reaktion hinzugegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen für zwei Minuten bei 42 °C Inkubiert. Nach weiteren zwei Minuten Inkubation auf Eis wurde der komplette Ansatz auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden einzelne Kolonien gepickt und in 2 ml LB + Ampicillin Medium für mindestens 5 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse. Die Zellen wurden für 30 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Zell-Lysispuffer zugegeben und die Proben 6-mal invertiert. Proteine wurden durch die anschließende Zugabe von 200 µl Kaliumacetatlösung gefällt. Die Proben wurden dafür 6 Mal invertiert und bei 4 °C und 13.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. 400 µl des klaren Überstands wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 800 µl Ethanol (100%, reinst) gemischt und bei -80 °C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die ausgefallene DNA für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch die Zugabe von 200 µl Ethanol (70 %) und einer ein-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm gewaschen. Das Pellet wurde schlussendlich bei 55 °C für 2 Minuten getrocknet und in 20 µl dH₂O (destilliert) für 20 Minuten bei 68 °C gelöst.

Plasmid-DNA, die für eine anschließende Transformation in *D. flagrans* vorgesehen war, wurde mit dem Nucleospin Plasmid Easy Pure Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Tabelle 12: Lösungen für die Plasmid-DNA-Präparation

Lösung	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5 10 mM Na ₂ EDTA pH 8.0 100 µg/ml RNase A
Lysispuffer	0,2 M NaOH 1 % SDS
Kaliumacetat	1,5 M KAc, pH 4.8

DNA-Restriktionsspaltung

Der Restriktionsverdau zur Überprüfung positiver Klone wurde in einem 10 µl Ansatz in vom Hersteller empfohlenen Puffer und geeigneter Temperatur durchgeführt. Etwa 0,2 µl Enzymlösung wurden für einen Ansatz verwendet. Nach 5 bis 60 minütiger Inkubation wurde der Restriktionsverdau mit Hilfe von Gelelektrophorese überprüft.

Plasmide

Es wurden folgende Plasmide in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 13: Verwendete Plasmide dieser Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pBV01	<i>gpdA(p)::GFP::stuA; pyr-4</i>	B. Voß, KIT
pFC332	<i>hph</i>	Nodvig et al., 2015
pRF62	<i>trpC(p)::nat1 (nat)</i>	Rosa Farjardo-Somera
pJET1.2	Klonierungsvektor	Fermentas
#62934	pET-NLS.Cas9-6xHis	Addgene
pJW01	<i>gpdA(p)::gfp</i>	J. Wäckerle
pIH02	<i>trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Youssar et al., 2019
pJM16	<i>gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	J. Menzner, KIT
pNH20	<i>tubA(p); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	N. Wernet, KIT
pEB02	<i>makA::hph (ΔmakA)</i>	E. Betz
pVW22	<i>makB::hph (ΔmakB)</i>	Diese Arbeit
pVW23	<i>H2B(p)::H2B::mCherry::H2B(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW27	<i>H2B(p)::H2B::mCherry::H2B(t); trpC(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW28	<i>sipC::hph (ΔsipC)</i>	Diese Arbeit

pVW37	<i>sipC(p)::sipC::sipC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW38	<i>sofT(p)::sofT::sofT(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW41	<i>lifeact::GFP</i>	Diese Arbeit
pVW42	<i>tubA(p)::lifeact::GFP; trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW56	<i>p12(p)::H2B::mCherry::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW57	<i>tubA(p)::mCherry::tubA::tubA(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW62	<i>sofT(p)::GFP::sofT::gluC(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW70	<i>sipC(p)::H2B::mCherry::H2B(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW71	<i>makB(p)::makB::mCherry::gluC(t); neo</i>	Diese Arbeit
pVW73	<i>gpdA(p)::GFP::hexA::gluC(t); trpC(p)::hph::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW77	<i>tubA(p)::mCherry::tubA::tubA(t); gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW78	<i>tubA(p)::lifeact::GFP; gpdA(p)::neo::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pVW86	<i>hexA::neo (ΔhexA)</i>	Diese Arbeit
pVW87	<i>apsB::neo (ΔapsB)</i>	Diese Arbeit
pVW88	<i>makB(p)::makB::mCherry::makB(t); neo</i>	Diese Arbeit
pVW89	<i>hexA::hph (ΔhexA)</i>	Diese Arbeit
pVW90	<i>makB::mCherry::makB(t); neo, Locus Integration</i>	Diese Arbeit
pVW92	<i>tubA(p)::mCherry::apsB::apsB(t); neo</i>	Diese Arbeit
pVW93	<i>makB::nat1 (ΔmakB)</i>	Diese Arbeit
pVW95	<i>hexA::nat1 (ΔhexA)</i>	Diese Arbeit
pVW98	<i>makB::mCherry::makB(t); nat1, Locus Integration</i>	Diese Arbeit
pVW100	<i>makB(p)::makB::makB(t); neo</i>	Diese Arbeit
pVW102	<i>spa18::nat1 (Δspa18)</i>	Diese Arbeit
pVW103	<i>spa18::neo (Δspa18)</i>	Diese Arbeit

pVW104	<i>spa10::nat1</i> ($\Delta spa10$)	Diese Arbeit
pVW105	<i>spa10::neo</i> ($\Delta spa10$)	Diese Arbeit
pVW106	<i>sofT::GFP::sofT(t)</i> ; <i>hph</i> , Locus Integration	Diese Arbeit
pVW107	<i>pkcA::mCherry::pkcA(t)</i> ; <i>neo</i> , locus Integration	Diese Arbeit
pVW108	<i>sofT(p)::sofT</i> (N-Terminus); <i>neo</i>	Diese Arbeit
pVW109	<i>sofT(p)::sofT</i> (C-Terminus); <i>neo</i>	Diese Arbeit
pVW112	<i>sofT(p)::sofT</i> (N-Terminus ohne WW-Domäne); <i>neo</i>	Diese Arbeit
pVW113	<i>hamA::hph</i> ($\Delta hamA$)	Diese Arbeit
pVW114	<i>p12(p)::p12::mCherry::gluC(t)</i> ; <i>hph</i>	Diese Arbeit
pVW115	<i>p12(p)::p12::mCherry::gluC(t)</i> ; <i>neo</i>	Diese Arbeit

sgRNA Synthese und Ribonukleoprotein Assemblierung

Die Synthese der sgRNA für CRISPR-Cas9 Ansätze erfolgte mit Hilfe des EnGen sgRNA Synthesis Kit, *S. pyogenes* (NEB). Es wurde mit Handschuhen, Nuklease-freien Reaktionsgefäßen und Filterspitzen gearbeitet.

Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur pipettiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Integrität und Menge der RNA wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Die Bildung des RNP Komplexes erfolgte bei 37 °C für 20 Minuten. Der komplette RNP Komplex wurde zusätzlich mit 2 µg aufgereinigtem PCR-Produkt der *hph*-Resistenzkassette in *D. flagrans* Protoplasten transformiert.

Tabelle 14: Pipettierschema für die sgRNA Synthese und RNP Assemblierung

Reagenz	Menge
sgRNA Synthese	
Nuklease-freies Wasser	3 µl
EnGen 2X sgRNA Reaktionsmix, <i>S. pyogenes</i>	10 µl
Ziel-spezifischer DNA Oligo (1 µM)	5 µl
EnGen sgRNA Enzymmix	2 µl
Bildung des RNP Komplexes	
sgRNA	4 µl
Cas9 (200 nM)	10 µl
10x Cas9 Nuklease Reaktionspuffer	5µl
Nuklease-freies Wasser	1µl

Protoplastentransformation von *D. flagrans*

Für die Transformation von *D. flagrans* wurden etwa 1×10^8 Sporen in 150 ml PDB inokuliert und für 24 Stunden bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Das Myzel wurde in einem sterilisierten Trichter mit Miracloth Filterpapier geerntet und mit MN-Puffer gewaschen. Circa 0,5 g des Myzels wurde in 5 ml Verdaulösung (MN-Puffer mit 4 mg/ml Kitalase (Fujufilm Wako Chemicals) und 20 mg/ml VinoTaste Pro (Novozymes) gegeben und für 3 Stunden bei 28 °C und 70 rpm inkubiert. Die Menge der Protoplasten wurde mikroskopisch überprüft. Unverdautes Myzel wurde anschließend durch die Filtration mit zweilagigem Miracloth entfernt. Die Protoplasten wurden dabei in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und mit MN-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Protoplasten wurden bei 3350 g für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und mit 50 ml KTC-Puffer gewaschen. Das resultierende Pellet wurde abschließend in 500 µl KTC-Puffer resuspendiert.

Für die Transformation wurden 100 µl Protoplasten (5×10^6) mit 2 bis 8 µg DNA (maximal 20 µl Volumen) auf Eis für zwei Minuten inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PTC-Puffer zugegeben und die Protoplasten bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. 10 ml Top-Agar (handwarm) wurden zum Transformationsmix zugegeben, gemischt und auf PDA Agarplatten mit dem zu selektierenden Antibiotikum gegeben. Die Agarplatten wurden bei 28 °C für vier bis 7 Tage inkubiert.

Tabelle 15: Verwendete Lösungen für die *D. flagrans* Protoplastentransformation

Lösung	Zusammensetzung
MN-Puffer	0,3 M MgSO ₄ 0,3 M NaCl
KTC-Puffer	1,2 M KCl 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 50 mM CaCl ₂
PTC-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 50 mM CaCl ₂ 60 % (w/v) Polyethylenglykol-6000
Top-Agar	24 g/l Kartoffel-Dextrose Bouillon 0,6 M Saccharose 0,3 g/l Pepton 0,3 g/l Hefeextrakt pH 6.5 15 g/l Agar

Isolation genomischer DNA aus *D. flagrans*

Für die Isolation genomischer DNA von *D. flagrans* wurden Sporen in etwa 5 ml PDB in einer 3,5 cm Petrischale inokuliert und für 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Das Myzel wurde geerntet und mit Mira cloth und Tüchern abgetrocknet. Etwa 50 – 100 mg Myzel wurden anschließend in 700 µl Lysispuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 25/s in einer Schwingmühle (Retsch) mit vier Glaskugeln aufgeschlossen. Anschließend folgte eine Inkubation bei 65 °C für 60 Minuten. Durch die Zugabe von 200 µl 1,5 M Kaliumacetatlösung (pH 4.8) wurden die Proteine für 30 Minuten auf Eis gefällt. Alle 5 Minuten wurde das Reaktionsgefäß einige Male invertiert. Die Zelltrümmer wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13.000 rpm von der wässrigen Phase getrennt. 500 µl des klaren Überstands wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol (100 %, reinst) gemischt und die DNA durch die Inkubation bei -20 °C für 15 Minuten gefällt. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm wurde die genomische DNA pelletiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurde die DNA mit 200 µl Ethanol (70 %) gewaschen, das Pellet bei 50 °C für 2 Minuten getrocknet und die DNA durch Zugabe von 40 bis 60 µl 1x TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A schüttelnd bei 68 °C gelöst.

Tabelle 16: Verwendete Lösungen für die Isolation genomischer DNA aus *D. flagrans*

Lösung	Zusammensetzung
Lysispuffer	1 % (w/v) SDS 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 50 mM Na ₂ -EDTA, pH 8.0 Für die Verwendung 1:1 mit 1x TE-Puffer mischen
TE (10x)	100 mM Tris-HCL, pH 7.0 10 mM Na ₂ -EDTA

Southern Blot

Digoxigenin (DIG) markierte DNA-Sonden wurden mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA-Bande wurde bei -80 °C für 20 Minuten in einem Streifen Parafilm gefroren und anschließend in ein Reaktionsgefäß ausgedrückt.

Für den Southern Blot wurde genomische DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym über Nacht bei der empfohlenen Temperatur und Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl verdaut. Die DNA-Banden wurden anschließend mit Hilfe einer Gelelektrophorese bei 100 V für 90 bis 120 Minuten aufgetrennt. Markerbanden wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze im Gel markiert. Das Gel wurde anschließend in einer Schale für 20 Minuten mit 250 mM HCL auf einem Schüttler gewaschen. Nachfolgend wurde es mit dH₂O gespült und für 20 Minuten mit Denaturierungspuffer inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt mit dH₂O wurde das Gel in Renaturierungspuffer für 20 Minuten inkubiert. Die DNA wurde auf eine positiv geladene Nylon Membran (Roti-Nylon plus, Roth) durch einen Kapillar-Blot transferiert. Ausgehend eines mit 20x SSC-Puffer gefüllten Reservoirs fließte der Puffer über eine aus Whatman Papier bestehenden Brücke durch das Gel, die Nylonmembran, drei Whatman Papiere und einem Stapel saugfähiges Papier. Der Kapillar-Blot wurde durch ein aufliegendes Gewicht beschleunigt und erfolgte für mindestens 6 Stunden oder über Nacht. Anschließend wurden die Markerbanden mit Hilfe eines Bleistifts auf der Membran markiert und die DNA in einem UV Crosslinker (Stratagene) bei 254 nm (je 1 min pro Seite) an die Membran fixiert. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte in 40 ml Hybridisierungspuffer bei 68 °C für 30 Minuten in einem Hybridisierungsofen.

Die DNA-Sonde wurde für 5 Minuten bei 95 °C linearisiert, in einem Gesamtvolumen von 15 ml Hybridisierungspuffer zur Membran gegeben und zusammen über Nacht bei 68 °C inkubiert. Die Membran wurde anschließend für jeweils 15 Minuten in 2x; 1x; und 0,1x SSPE-Puffer mit 0,1 % SDS bei 68 °C gewaschen. Die weiteren Inkubationsschritte erfolgten dann bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer. Nach fünfminütiger Inkubation mit DIG-Waschpuffer erfolgte die Blockierung der Membran durch die 30-minütige Inkubation in 25 ml DIG2-Lösung. Anschließend wurde die Membran mit Anti-DIG-Antikörper-AP Fragmenten (Roche) für 30 Minuten inkubiert (1:10.000 verdünnt; 1 µl Anti-DIG-Antikörper-AP Fragmente in 10 ml DIG2-Lösung). Die Membran wurde zweimal für 15 Minuten mit DIG-Waschpuffer inkubiert und anschließend für 5 Minuten in DIG3-Puffer äquilibriert. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe einer CDP-Star Lösung (1:500 verdünnt in 2 ml DIG3-Puffer). Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Membran mit Hilfe des ChemiSmart Chemilumineszenzsystems (PeqLab) entwickelt. Bei Bedarf wurde die gebundene Sonde durch die zweimalige Inkubation in Stripping Puffer bei 37 °C für 15 Minuten entfernt. Anschließend konnte eine erneute Hybridisierung durchgeführt werden, oder die Membran bei 4 °C gelagert werden. DNA-Sonden wurden nach der Verwendung bei -20 °C weggefroren und für bis zu 7-mal wiederverwendet. Die erneute Linearisierung der Sonde erfolgte in einem kochenden Wasserbad für 7 Minuten.

Tabelle 17: Verwendete Lösungen für die Southern Hybridisierung

Lösung	Zusammensetzung für 1 Liter
0,25 M HCL	20,7 ml HCl (37 %) in dH ₂ 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)
20x SSC Puffer	175,3 g NaCl (3,0 M) 88,2 g Na-Citrat x 2H ₂ O (0,3 M) pH 7.0
Hybridisierungspuffer	500 ml 1 M Na-Phosphat Puffer (0,5 M); pH 7.0 70 g SDS (7 %) autoklavieren

1 M Natriumphosphat Puffer

Lösung 1:

177,99 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (1M)

Lösung 2:

156,01 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (1M)

Lösung 1 in ein Becherglas füllen und mit Lösung 2 auffüllen, bis ein pH von 7.0 erreicht ist

20x SSPE Puffer

175,3 g/l NaCl

26,6 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

7,4 g/l $\text{Na}_2\text{-EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$

pH 7.4 mit NaOH einstellen

DIG1-Puffer

11,61 g/l Maleinsäure

8,77 g/l NaCl

pH 7.5 mit NaOH einstellen

Waschpuffer

0,3 % Tween-20 in DIG1

DIG2-Puffer

5 % Milchpulver in DIG1

Aliquots bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ lagern

DIG3-Puffer

5,84 g/l NaCl

10,17 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

pH 9.5 mit Tris-HCl einstellen, autoklavieren

CDP-Star Lösung

4 μl CDP-Star (Roche, Mannheim) in 2 ml DIG3

Stripping Puffer

0,2 M NaOH

0,1 % SDS

Isolation von DNA aus Erdproben, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Die Isolation von DNA aus Erdproben erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Für die Identifizierung von *D. flagrans* in Erdproben wurde die isolierte DNA als Matrize für eine PCR mit den Primern ITS1 und ITS4 zur Amplifikation der *internal transcribed spacer* (ITS) Region zwischen den rRNA-Genen verwendet. Das generierte PCR Produkt wurde mit dem Zymoclean Gel DNA Extraction Kit aufgereinigt und in den Klonierungsvektor pJET1.2 mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert und in *E. coli* TOP10 transformiert. Einzelne Klone wurden mit Hilfe der *pick & patch* Methode und den Insert-flankierenden Primern pjet_kill_fwd und pjet_kill_rev auf das Insert geprüft. Einzelne Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher zuerst auf eine frische LB-Agarplatte mit Rastermuster gepickt und anschließend in ein PCR Reaktionsgefäß mit vorhandenem PCR-Mastermix überführt. Die Agarplatte der überführten Kolonien wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Insgesamt wurden 24 Kolonien überprüft. Fünf µl eines jeweiligen PCR Produkts wurden mit dem Restriktionsenzym AluI im geeigneten Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 1 Stunde verdaut und anschließend auf ein 2 %iges Agarosegel geladen. Als Kontrolle des RFLP wurde die *D. flagrans* ITS Region verwendet. Inserts mit Übereinstimmung wurden zur weiteren Verifizierung sequenziert.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

Rekombinante Expression von Cas9 in *E. coli*

Die Expression des Cas9 Proteins erfolgte nach (Cromwell et al., 2018; Foster et al., 2018; Martin-Martin et al., 2018; Vonk et al., 2019; Zuris et al., 2015). Ein 50 µl Aliquot mit *E. coli* BL21 Zellen wurde wie oben beschrieben mit dem Plasmid pET-NLS-Cas9-6xHis Plasmid (Addgene 62934) transformiert und auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde gepickt und in 100 ml SOC Medium bei 37 °C und 180 rpm für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurden 5 ml der Kultur in 500 ml SOC überführt und bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6. Die Proteinexpression wurde durch 400 µM Isoprpyl-β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) und die Inkubation bei 22 °C über Nacht

induziert. Die Zellen wurden am nächsten Tag durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 5000rpm gesammelt und in 40 ml Resuspensionspuffer resuspendiert (10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0; 1 mM PMSF; 1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Thermo Fisher Scientific #A32965)). Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe einer French Press bei 1500 psi. Anschließend wurde das Lysat bei 20.000 rpm für eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Das Protein wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt (ROTI Garose-His/Ni Säule, Roth). Die Säule wurde mit einem Tropfen dH₂O befeuchtet und anschließend 1 ml Gelsuspension pipettiert (entspricht 500 µl Säulenvolumen). Anschließend wurde die Säule mit dem 10x Volumen (5ml) Puffer A (Resuspensionspuffer) äquilibriert. Danach wurde die Säule mit einer Kappe verschlossen, die Proteinprobe auf die Säule gegeben, mit einem Deckel verschlossen und bei 12 °C für 30 Minuten drehend inkubiert. Der Durchlauf wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurde mit steigenden Konzentrationen Imidazol und Puffer A die Probe eluiert (Puffer A + 20 mM Imidazol; Puffer A + 100 mM Imidazol; Puffer A + 500 mM Imidazol). Es wurden jeweils 500 µl pipettiert, um das Eluat in unterschiedliche Fraktionen aufzuteilen. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit Hilfe des Qubit Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Martinsried) nach Angaben des Herstellers.

SDS PAGE

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) wurden Proteine nach der Molekülmasse aufgetrennt. Zunächst wurde in einer Gelapparatur (Mini Protean Set, Bio-Rad) ein Trenngel mit 8 % Acrylamid gegossen, welches nach der Polymerisierung mit einem Sammelgel mit 5 % Acrylamid überzogen wurde. Die Proben wurden mit 4x Ladepuffer versehen und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert, bevor sie in die Geltaschen geladen wurden. Die Proteingröße wurde mit einem Proteinstandard (Prestained Plus, Thermo Fisher Scientific) verglichen. Die Proteine im Gel wurden mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau gefärbt.

Tabelle 18: Verwendete Lösungen für SDS-PAGE

Lösung	Zusammensetzung
Trenngel mit 8 % Acrylamid	4,6 ml dH ₂ O 2,6 ml 30 % Acrylamid-Mix 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8.8 0,1 ml 10 % SDS-Lösung 0,1 ml 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) 0,006 ml Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Sammelgel mit 5 % Acrylamid	3,4 ml dH ₂ O 0,83 ml 30 % Acrylamid-Mix 0,63 ml 1 M Tris-HCl pH 6.8 0,05 ml 10 % SDS-Lösung 0,05 ml 10 % APS 0,005 ml TEMED
10 % SDS	10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat in dH ₂ O
10 % APS	10 % (w/v) APS in dH ₂ O
Tris-Glycin-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
4 x Ladepuffer	2 % (w/v) SDS 10 mM Dithiothreitol (DTT) 60 mM Tris pH 6.8 0,01 % Bromphenolblau 10% (v/v) Glycerin

5.5 Mikroskopische Methoden

Induktion der Fallenbildung in *D. flagrans*

Um die Fallenbildung zu induzieren wurden 1×10^4 *D. flagrans* Sporen auf dünnen Agarkissen mit etwa 100 bis 200 *C. elegans* Larven in einer Feuchtekammer bei 28 °C für mindestens 6 bis 72 Stunden inkubiert. Es wurde entweder Wasseragar (1 %) oder LNA verwendet. Für die Herstellung dünner Agarkissen wurden zwei Objektträger mit Klebeband abgeklebt und nebeneinandergelegt. Zwischen diese wurde ein steriler Objektträger gelegt, auf einen weiteren querliegenden Objektträger platziert wurde. In

den so entstandenen Zwischenraum wurden 500 µl flüssiger Agar pipettiert. Beschichtete Objektträger wurden in eine sterile, mit Wasser gefüllte Petrischale auf zwei 1 ml Pipettenspitzen gelegt.

Für die Induktion der Fallen mit Bakterien wurden *D. flagrans* Sporen vorerst auf Wasseragar oder LNA für 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Die Bakterien wurden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei der jeweiligen optimalen Temperatur kultiviert. Anschließend wurde eine Kolonie der jeweiligen Art mit einem sterilen Zahnstocher in 100 µl steriles Wasser überführt und gevortext. Ein µl der Bakteriensuspension wurde auf das 24 Stunden alte Myzel pipettiert und für weitere 24 bis 72 Stunden co-inkubiert.

Mikroskopie

Konventionelle Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem AxioImager Z.1 (Zeiss) und AxioCamMR (Zeiss) angefertigt. Es wurde entweder ein Plan-Apochromat 63x/1.4 Ölimmersions, ein EC Plan-Neofluar 40x/0.75, ein 20x/0.50, oder ein EC Plan-Neofluar 10x/0.30 Objektiv verwendet. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der ZEN 2012 Blue Edition Software angefertigt. Mit Hilfe von Apotome I wurden durch strukturierte Beleuchtung optische Schnitte generiert.

Hochauflösende Mikroskopie wurde mit Hilfe eines LSM900 (Zeiss) mit Airyscan 2 Detektor in *super resolution* Modus angefertigt. Aufnahmen wurden mit einem GaASP-PMT (Galliumarsenidphosphid *Photomultiplier tube*) Detektor (450-700 nm) aufgenommen bei einer Anregung von 488 oder 558 nm. Laserintensität betrug zwischen 0,2 bis 2 %. Maximumintensitätsprojektionen wurden mit Hilfe der ZEN Blue Software angefertigt.

Spinning Disk Konfokalmikroskopie erfolgte mit Hilfe eines AxioObserver Z1 (Zeiss) Mikroskops mit einem Plan-Apochromat 63x/1.4 Objektiv, Zeiss Multi Laser Modul (488 Dioden Laser und 561 nm OPAL Laser), Spinning Disk Modul CSU-X1M 5000 und Evolve 512 Kamera (Photometrics).

Stereomikroskopische Aufnahmen wurden im Durchlicht Modus eines SteREO Lumar. V12 (Zeiss) und der Axiovision Software angefertigt.

Für Kryo-Rasterelektronenmikroskopische (Kryo-REM) Aufnahmen wurden Proben auf ein Probenträger mit Eindeckmedium (1:1 Mischung aus Tissue-Tek O.C.T und kolloides Graphit, Agar Scientific Ltd., Stansted, Großbritannien) gebracht und in

Stickstoff-Slush gefroren. Anschließend wurden die Proben sofort in eine auf -135 °C vorgekühlte Kryokammer (PP2000 T, Quorum Technologies Ltd., Laughton, Großbritannien) transferiert und bei -90 °C für 15 Minuten sublimiert. Die Probe wurde mit einer Platinschicht für 60 Sekunden bei 5-10 mA besputtert und anschließend in die Probenbühne der -135 °C kalten REM Kammer geführt. Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines Quanta 250 FEG (FEI, Brünn, Tschechische Republik) unter Hochvakuum. Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines Everhart-Thornley Detektor bei einem Arbeitsabstand von 5 mm und einer Beschleunigungsspannung von 5 kV.

Fluoreszente Farbstoffe und Inhibitoren

Die Zellwand wurde mit dem fluoreszenten Farbstoff Calcofluor white (CFW, F-3543, Sigma) angefärbt. CFW wurde in 0,5 % (wt/vol) KOH und 83 % (vol/vol) Glycerin gelöst und eine 1 % (wt/vol) Stammlösung hergestellt. Eine 1:1000 verdünnte Arbeitskonzentration (in dH₂O) wurde auf das Myzel pipettiert und für drei Minuten inkubiert.

Eine Stammlösung (1 mg/ml) von Benomyl (Sigma) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) vorbereitet und in einer Endkonzentration von 5 µg/ml in dH₂O verwendet. Eine Stammlösung (1 mg/ml) von Cytochalasin A wurde in DMSO vorbereitet und in einer Endkonzentration von 5 µg/ml in dH₂O verwendet. Für die Inhibitoren wurde ein 0,5 x 0,5 cm großes Agarkissen mit Myzel in 100 µl der Arbeitskonzentration jedes Inhibitors inkubiert.

Quantifizierung der Kompartimentsgröße

Um die Kompartimentsgröße des vegetativen Myzels zu quantifizieren, wurden 1000 Sporen des jeweiligen *D. flagrans* Stamms auf LNA Kissen bei 28 °C für 24 Stunden inkubiert. Die Zellwand wurde mit CFW gefärbt und Aufnahmen bei 100x Vergrößerung gemacht. Für jeden Stamm wurde die Länge von zehn Kompartimenten von fünf ausgekeimten Sporen quantifiziert. Die Analyse wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt.

Quantifizierung der Sporenmenge und Morphologie

Um die Sporenmenge der einzelnen *D. flagrans* Stämme zu quantifizieren wurden mit einer 1 ml Pipettenspitze Agarblöcke von 7 Tage alten Kulturen mit circa 8 mm Durchmesser ausgeschnitten. Diese wurden in 500 µl dH₂O überführt und für 5 Minuten gevortext. Die Konidien wurden mit Hilfe einer Helber Zählkammer quantifiziert. Die Sporen jedes biologischen Replikats wurden vier Mal quantifiziert. Um die Anzahl und Morphologie der Chlamydosporen zu quantifizieren wurden circa 1000 Sporen des jeweiligen *D. flagrans* Stamms auf LNA Kissen bei 28 °C inkubiert. Die Chlamydosporenmenge und Morphologie wurden nach 72 Stunden quantifiziert.

Quantifizierung der Fallenmorphologie

Um die Fallenmorphologie zu quantifizieren wurden circa 1000 Sporen des jeweiligen Stamms auf LNA Kissen mit circa 200 *C. elegans* Larven bei 28 °C für 48 Stunden co-inkubiert. Die Fallen wurden bei 100x und 400x Vergrößerung quantifiziert. Für jeden Stamm wurden drei biologische Replikate quantifiziert.

Statistische Analayen

p-Werte wurden aus dem Mittelwert von drei biologischen Replikaten und ungepaarten t-Test bestimmt. Die Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 9 durchgeführt. Jedes biologische Replikat ist in den Balkendiagrammen farblich markiert (orange, blau, grau). Einzelne Datenpunkte sind als Punkte markiert, der Durchschnitt als Dreiecke. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Bild und Datenanalyse

Mikroskopische Aufnahmen wurde mit ImageJ/Fiji bearbeitet und dargestellt. Die relative Fluoreszenzintensität wurde in ZEN Blue bestimmt. Konservierte Proteindomänen wurden mit dem Illustrator for Biological Sequences (IBS) dargestellt.

Literaturverzeichnis

- Abeyasinghe, G., Kuchira, M., Kudo, G., Masuo, S., Ninomiya, A., Takahashi, K., Utada, A. S., Hagiwara, D., Nomura, N., Takaya, N., Obana & N., Takeshita, N.** (2020). Fungal mycelia and bacterial thiamine establish a mutualistic growth mechanism. *Life Sci Alliance* **3**, e202000878.
- Aguilar, P. S., Baylies, M. K., Fleissner, A., Helming, L., Inoue, N., Podbilewicz, B., Wang, H. & Wong, M.** (2013). Genetic basis of cell–cell fusion mechanisms. *T Genet* **29**, 427–437.
- Ahmad, G., Khan, A., Khan, A. A., Ali, A. & Mohhamad, H. I.** (2021). Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1–28.
- Ahrén, D., Tholander, M., Fekete, C., Rajashekar, B., Friman, E., Johansson, T. & Tunlid, A.** (2005). Comparison of gene expression in trap cells and vegetative hyphae of the nematophagous fungus *Monacrosporium haptotylum*. *Microbiology* **151**, 789–803.
- Allmann, S. & Baldwin, I. T.** (2010). Insects betray themselves in nature to predators by rapid isomerization of green leaf volatiles. *Science* **329**, 1075–1078.
- Amen, T. & Kaganovich, D.** (2020). Stress granules sense metabolic stress at the plasma membrane and potentiate recovery by storing active Pkc1. *Sci Signal* **13**, eaaz6339.
- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P. & Fuchs, C. S.-G. & M.** (2004). Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *J Plant Pathol*, 183-195
- Babu, M. M., Kriwacki, R. W. & Pappu, R. V.** (2012). Structural biology. Versatility from protein disorder. *Science* **337**, 1460–1.
- Bae, S. J., Ni, L., Osinski, A., Tomchick, D. R., Brautigam, C. A. & Luo, X.** (2017). SAV1 promotes Hippo kinase activation through antagonizing the PP2A phosphatase STRIPAK. *Elife* **6**, e30278.
- Bai, S. W., Herrera-Abreu, M. T., Rohn, J. L., Racine, V., Tajadura, V., Suryavanshi, N., Bechtel, S., Wiemann, S., Baum, B. & Ridley, A. J.** (2011). Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *Bmc Biol* **9**, 54.
- Belval, L., Marmonier, A., Schmitt-Keichinger, C., Gersch, S., Andret-Link, P., Komar, V., Vigne, E., Lemaire, O., Ritzenthaler, C. & Demangeat, G.** (2019). From a movement-deficient grapevine fanleaf virus to the identification of a new viral determinant of nematode transmission. *Viruses* **11**, 1146.
- Benoit, I., Esker, M. H., Patyshakuliyeva, A., Mattern, D. J., Blei, F., Zhou, M., Dijksterhuis, J., Brakhage, A. A., Kuipers, O. P., Vries, R. P. & Kovác, A. T.** (2015). *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism. *Environ Microbiol* **17**, 2099–2113.
- Berepiki, A., Lichius, A. & Read, N. D.** (2011). Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat Rev Microbiol* **9**, 876–887.

- Bird, A. F.** (1974). Plant response to root-knot nematode. *Annu Rev Phytopathol* **12**, 69–85.
- Bloemendal, S., Lord, K. M., Rech, C., Hoff, B., Engh, I., Read, N. D. & Kück, U.** (2010). A mutant defective in sexual development produces aseptate ascogonia. *Eukaryot Cell* **9**, 1856–1866.
- Bordallo, J. J., Lopez-Llorca, L. V., Jansson, H. -B., Salinas, J., Persmark, L. & Asensio, L.** (2002). Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytol* **154**, 491–499.
- Braga, F. R., Araújo, J. V., Soares, F. E. F., Geniêr, H. L. A. & Queiroz, J. H.** (2012). An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. *Biocontrol Sci Techn* **22**, 1131–1142.
- Braga, F. R., Ferraz, C. M., Silva, E. N. da & Araújo, J. V. de** (2020). Efficiency of the Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control in vivo and in vitro of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. *3 Biotech* **10**, 62.
- Bruno, K. S., Morrell, J. L., Hamer, J. E. & Staiger, C. J.** (2001). SEPH, a Cdc7p orthologue from *Aspergillus nidulans*, functions upstream of actin ring formation during cytokinesis. *Mol Microbiol* **42**, 3–12.
- Burges, H. D.** (1998). Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. 131–185.
- Burges, H. D. & Jones, K. A.** (2011). Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. 33–127.
- Cai, Q., He, B. & Jin, H.** (2019a). A safe ride in extracellular vesicles – small RNA trafficking between plant hosts and pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **52**, 140–148.
- Cai, Q., He, B., Weiberg, A., Buck, A. H. & Jin, H.** (2019b). Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *Plos Pathog* **15**, e1008090.
- Carter, R. F. & Wright, K. A.** (1984). Formation of the odontostyle during molting of the nematode *Xiphinema americanum* (Nematoda: Dorylaimoidea). *J Ultra Mol Struct R* **87**, 221–241.
- Charlton, N. D., Shoji, J.-Y., Ghimire, S. R., Nakashima, J. & Craven, K. D.** (2012). Deletion of the fungal gene *soft* disrupts mutualistic symbiosis between the grass endophyte *Epichloë festucae* and the host plant. *Eukaryot Cell* **11**, 1463–1471.
- Chen, R., Xie, R., Meng, Z., Ma, S. & Guan, K.-L.** (2019). STRIPAK integrates upstream signals to initiate the Hippo kinase cascade. *Nat Cell Biol* **21**, 1565–1577.
- Chen, S.-A., Lin, H.-C., Schroeder, F. C. & Hsueh, Y.-P.** (2020). Prey sensing and response in a nematode-trapping fungus is governed by the MAPK pheromone response pathway. *Genetics* **217**, iyaa008.
- Chitwood, D. J.** (2003). Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service. *Pest Manag Sci* **59**, 748–753.

- Cooke, M., Magimaidas, A., Casado-Medrano, V. & Kazanietz, M. G.** (2017). Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions. *Mol Carcinogen* **56**, 1531–1542.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S. & Picard, M.** (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biology Rev Mmbr* **61**, 411–28.
- Coyne, D. L., Cortada, L., Dalzell, J. J., Claudius-Cole, A. O., Haukeland, S., Luambano, N. & Talwana, H.** (2018). Plant-parasitic nematodes and food security in sub-Saharan Africa. *Annu Rev Phytopathol* **56**, 381–403.
- Craven, K. D., Véléz, H., Cho, Y., Lawrence, C. B. & Mitchell, T. K.** (2008). Anastomosis is required for virulence of the fungal necrotroph *Alternaria brassicicola* ∇ . *Eukaryot Cell* **7**, 675–683.
- Cromwell, C. R., Sung, K., Park, J., Kryslar, A. R., Jovel, J., Kim, S. K. & Hubbard, B. P.** (2018). Incorporation of bridged nucleic acids into CRISPR RNAs improves Cas9 endonuclease specificity. *Nat Commun* **9**, 1448.
- Cruz, D. G., Costa, L. M., Rocha, L. O., Retamal, C. A., Vieira, R. A. M., Seabra, S. H., Silva, C. P., DaMatta, R. A. & Santos, C. P.** (2015). Serine proteases activity is important for the interaction of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with infective larvae of trichostrongylides and free-living nematodes *Panagrellus* spp. *Fungal Biol* **119**, 672–678.
- Cui, Z. -H., Agüero, C. B., Wang, Q. -C. & Walker, M. A.** (2019). Validation of micrografting to identify incompatible interactions of rootstocks with virus-infected scions of Cabernet Franc. *Aust J Grape Wine R* **25**, 268–275.
- Daskalov, A., Heller, J., Herzog, S., Fleißner, A. & Glass, N. L.** (2017). The fungal kingdom. *Microbiol Spectr* **5**, 215–229.
- Daskalov, A., Mitchell, P. S., Sandstrom, A., Vance, R. E. & Glass, N. L.** (2020). Molecular characterization of a fungal gasdermin-like protein. *Proc Natl Acad Sci* **117**, 18600–18607.
- Degenkolb, T. & Vilcinskas, A.** (2016). Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. *Appl Microbiol Biot* **100**, 3799–3812.
- Dénarié, J., Debellé, F. & Promé, J.-C.** (1996). Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**, 503–535.
- Denning, M. F.** (2004). Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biology* **36**, 1141–1146.
- Dettmann, A., Heilig, Y., Ludwig, S., Schmitt, K., Illgen, J., Fleißner, A., Valerius, O. & Seiler, S.** (2013). HAM-2 and HAM-3 are central for the assembly of the *Neurospora* STRIPAK complex at the nuclear envelope and regulate nuclear accumulation of the MAP kinase MAK-1 in a MAK-2-dependent manner. *Mol Microbiol* **90**, 796–812.
- Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., Harder, W. & Nordbring-Hertz, B.** (1994). Nematophagous fungi: physiological aspects and structure–function relationships. *Adv Microb Physiol* **36**, 111–143.

- Duncan, L. W. & Moens, M.** (2006). Plant nematology. 123–152.
- Eder, R.** (2020). Dämpfen zur Regulierung von Wurzelgallennematoden *Meloidogyne* spp. *Pflanzen Agroscope Merkblatt*.
- Eiramli, N., Karahoda, B., Sarikaya-Bayram, Ö., Frawley, D., Ulas, M., Oakley, C. E., Oakley, B. R., Seiler, S. & Bayram, Ö.** (2019). Assembly of a heptameric STRIPAK complex is required for coordination of light-dependent multicellular fungal development with secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Plos Genet* **15**, e1008053.
- Engh, I., Würtz, C., Witzel-Schlömp, K., Zhang, H. Y., Hoff, B., Nowrousian, M., Rottensteiner, H. & Kück, U.** (2007). The WW domain protein PRO40 is required for fungal fertility and associates with Woronin bodies. *Eukaryot Cell* **6**, 831–843.
- Ethiopia, M. W. U., Bale Robe, & Beyan, A.** (2019). Response of tomato genotypes to *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* co-infestation under glasshouse conditions. *Pakistan J Nematol* **37**, 63–82.
- Fan, Y., Zhang, W., Chen, A., Xiang, M. & Liu, X.** (2021). DdaSTE12 is involved in trap formation, ring inflation, conidiation, and vegetative growth in nematode-trapping fungus *Drechlerella dactyloides*. *Appl Microbiol Biotechnol, in revision*.
- Fischer, M. S. & Glass, N. L.** (2019). Communicate and fuse: how filamentous fungi establish and maintain an interconnected mycelial network. *Front Microbiol* **10**, 619.
- 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., 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. & Glass, N. L.** (2007). SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. *Eukaryot Cell* **6**, 84–94.
- Foster, A. J., Martin-Urdiroz, M., Yan, X., Wright, H. S., Soanes, D. M. & Talbot, N. J.** (2018). CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated co-editing and counterselection in the rice blast fungus. *Sci Rep* **8**, 14355.
- Francisco, C. S., Zwysig, M. M. & Palma-Guerrero, J.** (2020). The role of vegetative cell fusions in the development and asexual reproduction of the wheat fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Bmc Biol* **18**, 99.
- 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.
- Fu, C., Ao, J., Dettmann, A., Seiler, S. & Free, S. J.** (2014). Characterization of the *Neurospora crassa* Cell Fusion Proteins, HAM-6, HAM-7, HAM-8, HAM-9, HAM-10, AMPH-1 and WHI-2. *PloS One* **9**, e107773.

- Gao, X., Schmid, M., Zhang, Y., Fukuda, S., Takeshita, N. & Fischer, R.** (2019). The spindle pole body of *Aspergillus nidulans* is asymmetrical and contains changing numbers of γ -tubulin complexes. *J Cell Sci* **132**, jcs234799.
- Garcia, S., Hily, J.-M., Komar, V., Gertz, C., Demangeat, G., Lemaire, O. & Vigne, E.** (2019). Detection of multiple variants of grapevine fanleaf virus in single *Xiphinema index* nematodes. *Viruses* **11**, 1139.
- Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pagès, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Bécard, G., Bonfante, P., Barker, D. G.** (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca^{2+} spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol* **198**, 190–202.
- Ghelder, C. V., Reid, A., Kenyon, D. & Esmenjaud, D.** (2015). Development of a real-time PCR method for the detection of the dagger nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi* and *X. italiae*, and for the quantification of *X. index* numbers. *Plant Pathol* **64**, 489–500.
- Glass, N. L., Rasmussen, C., Roca, M. G. & Read, N. D.** (2004). Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends Microbiol* **12**, 135–141.
- Goryachev, A. B., Lichius, A., Wright, G. D. & Read, N. D.** (2012). Excitable behavior can explain the “ping-pong” mode of communication between cells using the same chemoattractant. *Bioessays* **34**, 259–266.
- Goudreault, M., D’Ambrosio, L. M., Kean, M. J., Mullin, M. J., Larsen, B. G., Sanchez, A., Chaudhry, S., Chen, G. I., Sicheri, F., Nesvizhskii, A. I., Aebersold, R., Raught, B. & Gingras, A.** (2009). A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the Cerebral Cavernous Malformation 3 (CCM3) Protein. *Mol Cell Proteomics* **8**, 157–171.
- Green, K. A., Becker, Y., Fitzsimons, H. L. & Scott, B.** (2016). An *Epichloë festucae* homologue of MOB3, a component of the STRIPAK complex, is required for the establishment of a mutualistic symbiotic interaction with *Lolium perenne*. *Mol Plant Pathol* **17**, 1480–1492.
- Grønvold, J., Wolstrup, J., Nansen, P., Henriksen, S. A., Larsen, M. & Bresciani, J.** (1993). Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. *Vet Parasitol* **48**, 311–325.
- Grum-Grzhimaylo, A. A., Bastiaans, E., Heuvel, J. van den, Millanes, C. B., Debets, A. J. M. & Aanen, D. K.** (2021). Somatic deficiency causes reproductive parasitism in a fungus. *Nat Commun* **12**, 783.
- Guertin, D. A., Chang, L., Irshad, F., Gould, K. L. & McCollum, D.** (2000). The role of the Sid1p kinase and Cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast. *Embo J* **19**, 1803–1815.
- Gurav, R., Tang, J. & Jadhav, J.** (2017). Novel chitinase producer *Bacillus pumilus* RST25 isolated from the shellfish processing industry revealed antifungal potential against phytopathogens. *Int Biodeter Biodegr* **125**, 228–234.

- Haarith, D., Bushley, K. E. & Chen, S.** (2020). Fungal communities associated with *Heterodera glycines* and their potential in biological control: a current update. *J Nematol* **52**, 1–17.
- Haarith, D., Kim, D., Chen, S. & Bushley, K. E.** (2021). Growth chamber and greenhouse screening of promising in vitro fungal biological control candidates for the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Biol Control* **160**, 104635.
- Hajji-Hedfi, L., M’Hamdi-Boughalleb, N. & Horrigue-Raouani, N.** (2019). Fungal diversity in rhizosphere of root-knot nematode infected tomatoes in Tunisia. *Symbiosis* **79**, 171–181.
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y. & Song, W.** (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol* **28**, 66–76.
- Harris, A.** (1983). Distribution of parasitic nematodes in vineyards in central and north-eastern Victoria. *Anim Prod Sci* **23**, 221–224.
- Heilig, Y., Schmitt, K. & Seiler, S.** (2013). Phospho-regulation of the *Neurospora crassa* septation initiation network. *PLoS One* **8**, e79464.
- Heinisch, J. J. & Rodicio, R.** (2017). Protein kinase C in fungi—more than just cell wall integrity. *Fems Microbiol Rev* **42**,.
- Henrissat, B.** (1999). Classification of chitinases modules. *Exs* **87**, 137–56.
- Henrissat, B. & Bairoch, A.** (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* **316** (Pt 2), 695–6.
- Hernández, J. Á., Arroyo, F. L., Suárez, J., Cazapal-Monteiro, C. F., Romasanta, Á., López-Arellano, M. E., Pedreira, J., Carvalho, L. M. M. de, Sánchez-Andrade, R., Arias, M. S., Gives, P. M. de & Paz-Silva, A.** (2016). Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. *Vet Parasitol* **229**, 37–44.
- 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.
- Hoogen, J. van den, Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D. A., Goede, R. G. M. de, Adams, B. J., Ahmad, W., Andriuzzi, W. S., et al.** (2019). Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* **572**, 94–198.
- Hsueh, Y.-P., Mahanti, P., Schroeder, F. C. & Sternberg, P. W.** (2013). Nematode-trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones. *Curr Biol* **23**, 83–86.
- 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.
- Huang, H.-T., Maruyama, J. & Kitamoto, K.** (2013). *Aspergillus oryzae* AoSO Is a novel component of stress granules upon heat stress in filamentous fungi. *PLoS One* **8**, e72209.

- Huang, T.-Y., Lee, Y.-Y., Ulzurrun, G. V.-D. de & Hsueh, Y.-P.** (2020). Forward genetic screens identified mutants with defects in trap morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *G3* **11**, jkaa022.
- Huang, C.-Y., Rangel, D. S., Qin, X., Bui, C., Li, R., Jia, Z., Cui, X. & Jin, H.** (2021). The chromatin-remodeling protein BAF60/SWP73A regulates the plant immune receptor NLRs. *Cell Host Microbe* **29**, 425-434.e4.
- Hwang, J. & Pallas, D. C.** (2014). STRIPAK complexes: Structure, biological function, and involvement in human diseases. *Int J Biochem Cell Biology* **47**, 118–148.
- Jackson-Hayes, L., Atiq, Z., Betton, B., Freyaldenhoven, W. T., Myers, L., Olsen, E. & Hill, T. W.** (2019). *Aspergillus nidulans* protein kinase C forms a complex with the formin SepA that is involved in apical growth and septation. *Fungal Genet Biol* **122**, 21–30.
- Janahiraman, V., Anandham, R., Kwon, S. W., Sundaram, S., Pandi, V. K., Krishnamoorthy, R., Kim, K., Samaddar, S. & Sa, T.** (2016). Control of wilt and rot pathogens of tomato by antagonistic pink pigmented facultative methylophilic *Delftia lacustris* and *Bacillus* spp. *Front Plant Sci* **7**, 1626.
- Janmey, P. A.** (1994). Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu Rev Physiol* **56**, 169–191.
- Jansson, H. & Poinar, G. O.** (1986). Some possible fossil nematophagous fungi. *T Brit Mycol Soc* **87**, 471–474.
- Jedd, G.** (2011). Fungal evo–devo: organelles and multicellular complexity. *T Cell Biol* **21**, 12–19.
- Jedd, G. & Chua, N.-H.** (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol* **2**, 226–231.
- Jedd, G. & Pieuchot, L.** (2012). Multiple modes for gatekeeping at fungal cell-to-cell channels. *Mol Microbiol* **86**, 1291–1294.
- Jeong, B.-C., Bae, S. J., Ni, L., Zhang, X., Bai, X. and Luo, X.** (2021). Cryo-EM structure of the Hippo signaling integrator human STRIPAK. *Nat Struct Mol Biol* **28**, 290–299.
- Jiang, X., Xiang, M. & Liu, X.** (2017). Nematode-trapping fungi. *Microbiol Spectr* **5**, 963–974.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E.** (2012). A programmable dual-rna–guided dna endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L. & Perry, R. N.** (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **14**, 946–961.
- Jonkers, W., Leeder, A. C., Ansong, C., Wang, Y., Yang, F., Starr, T. L., Camp, D. G., Smith, R. D. & Glass, N. L.** (2014). HAM-5 functions as a map kinase scaffold during cell fusion in *Neurospora crassa*. *Plos Genet* **10**, e1004783.

- Jonkers, W., Fischer, M. S., Do, H. P., Starr, T. L. & Glass, N. L.** (2016). Chemotropism and cell fusion in *Neurospora crassa* relies on the formation of distinct protein complexes by HAM-5 and a Novel Protein HAM-14. *Genetics* **203**, 319–334.
- Justa-Schuch, D., Heilig, Y., Richthammer, C. & Seiler, S.** (2010). Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **76**, 220–235.
- Karotki, L., Huiskonen, J. T., Stefan, C. J., Ziólkowska, N. E., Roth, R., Surma, M. A., Krogan, N. J., Emr, S. D., Heuser, J., Grünewald, K. & Walther, T. C.** (2011). Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *J Cell Biology* **195**, 889–902.
- Katayama, T., Uchida, H., Ohta, A. & Horiuchi, H.** (2012). Involvement of Protein Kinase C in the suppression of apoptosis and in polarity establishment in *Aspergillus nidulans* under conditions of heat stress. *PLoS One* **7**, e50503.
- Kemp, H. A. and Jr., G. F. S.** (2003). Far3 and five interacting proteins prevent premature recovery from pheromone arrest in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**, 1750–1763.
- Khan, T. K., Nelson, T. J., Verma, V. A., Wender, P. A. & Alkon, D. L.** (2009). A cellular model of Alzheimer's disease therapeutic efficacy: PKC activation reverses Abeta-induced biomarker abnormality on cultured fibroblasts. *Neurobiol Dis* **34**, 332–9.
- Kim, J.-M., Lu, L., Shao, R., Chin, J. & Liu, B.** (2006). Isolation of mutations that bypass the requirement of the septation initiation network for septum formation and conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **173**, 685–696.
- Kiontke, K. & Fitch, D. H. A.** (2013). Nematodes. *Curr Biol* **23**, R862–R864.
- Kück, U., Beier, A. M. & Teichert, I.** (2016). The composition and function of the striatin-interacting phosphatases and kinases (STRIPAK) complex in fungi. *Fungal Genet Biol* **90**, 31–38.
- 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.
- 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.
- Lai, J., Koh, C. H., Tjota, M., Pieuchot, L., Raman, V., Chandrababu, K. B., Yang, D., Wong, L. & Jedd, G.** (2012). Intrinsically disordered proteins aggregate at fungal cell-to-cell channels and regulate intercellular connectivity. *Proc Natl Acad Sci* **109**, 15781–15786.
- Leisen, T., Bietz, F., Werner, J., Wegner, A., Schaffrath, U., Scheuring, D., Willmund, F., Mosbach, A., Scalliet, G. & Hahn, M.** (2020). CRISPR/Cas with ribonucleoprotein complexes and transiently selected telomere vectors allows highly efficient marker-free and multiple genome editing in *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog* **16**, e1008326.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C. & Dénarié, J.** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781–784.

- Li, L., Ma, M., Liu, Y., Zhou, J., Qu, Q., Lu, K., Fu, D. & Zhang, K.** (2011). Induction of trap formation in nematode-trapping fungi by a bacterium. *Fems Microbiol Lett* **322**, 157–165.
- Li, J., Hyde, K. & Zhang, K.-Q.** (2014). Nematode-trapping fungi. 13–40.
- Li, J., Liu, Y., Zhu, H. & Zhang, K.-Q.** (2016a). Phylogenetic analysis of adhesion related genes Mad1 revealed a positive selection for the evolution of trapping devices of nematode-trapping fungi. *Sci Rep* **6**, 22609.
- Li, L., Yang, M., Luo, J., Qu, Q., Chen, Y., Liang, L. & Zhang, K.** (2016b). Nematode-trapping fungi and fungus-associated bacteria interactions: the role of bacterial diketopiperazines and biofilms on *Arthrobotrys oligospora* surface in hyphal morphogenesis. *Environ Microbiol* **18**, 3827–3839.
- 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.
- Li, J., Wu, R., Wang, M., Borneman, J., Yang, J. & Zhang, K.-Q.** (2019). The pH sensing receptor AopalH plays important roles in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Fungal Biol* **123**, 547–554.
- Liu, K., Zhang, W., Lai, Y., Xiang, M., Wang, X., Zhang, X. & Liu, X.** (2014). *Drechlerella stenobrocha* genome illustrates the mechanism of constricting rings and the origin of nematode predation in fungi. *Bmc Genomics* **15**, 114.
- López-Franco, R., Bartnicki-Garcia, S. & Bracker, C. E.** (1994). Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 12228–12232.
- Luo, G., Costanzo, M., Boone, C. & Dickson, R. C.** (2011). Nutrients and the Pkh1/2 and Pkc1 protein kinases control mRNA decay and P-body assembly in yeast. *J Biol Chem* **286**, 8759–8770.
- Madsen, C. D., Hooper, S., Tozluoglu, M., Bruckbauer, A., Fletcher, G., Eler, J. T., Bates, P. A., Thompson, B. & Sahai, E.** (2015). STRIPAK components determine mode of cancer cell migration and metastasis. *Nat Cell Biol* **17**, 68–80.
- Märker, R., Blank-Landeshammer, B., Beier-Rosberger, A., Sickmann, A. & Kück, U.** (2020). Phosphoproteomic analysis of STRIPAK mutants identifies a conserved serine phosphorylation site in PAK kinase CLA4 to be important in fungal sexual development and polarized growth. *Mol Microbiol* **113**, 1053–1069.
- Martin-Martin, I., Aryan, A., Meneses, C., Adelman, Z. N. & Calvo, E.** (2018). Optimization of sand fly embryo microinjection for gene editing by CRISPR/Cas9. *PloS Neglect Trop D* **12**, e0006769.
- Maruyama, J., Escaño, C. S. & Kitamoto, K.** (2010). AoSO protein accumulates at the septal pore in response to various stresses in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem Bioph Res Co* **391**, 868–873.
- Meerupati, T., Andersson, K.-M., Friman, E., Kumar, D., Tunlid, A. & Ahrén, D.** (2013). Genomic mechanisms accounting for the adaptation to parasitism in nematode-trapping Fungi. *PloS Genet* **9**, e1003909.

- Mehta, N. & Baghela, A.** (2021). Quorum sensing-mediated inter-specific conidial anastomosis tube fusion between *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. siamense*. *Ima Fungus* **12**, 7.
- Mello, I. N. K. D., Braga, F. R., Monteiro, T. S. A., Freitas, L. G., Araujo, J. M., Soares, F. E. F. & Araújo, J. V.** (2014). Biological control of infective larvae of *Ancylostoma* spp. in beach sand. *Revista Iberoamericana De Micología* **31**, 114–118.
- Mesa-Valle, C. M., Garrido-Cardenas, J. A., Cebrian-Carmona, J., Talavera, M. & Manzano-Agugliaro, F.** (2020). Global research on plant nematodes. *Agronomy* **10**, 1148.
- Monreal, J. & Reese, E. T.** (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* **15**, 689–696.
- Monteiro, T. S. A., Valadares, S. V., Mello, I. N. K. de, Moreira, B. C., Kasuya, M. C. M., Araújo, J. V. de & Freitas, L. G. de** (2018). Nematophagous fungi increasing phosphorus uptake and promoting plant growth. *Biol Control* **123**, 71–75.
- Nagy, L. G., Varga, T., Csernetics, Á. & Virágh, M.** (2020). Fungi took a unique evolutionary route to multicellularity: Seven key challenges for fungal multicellular life. *Fungal Biol Rev* **34**, 151–169.
- Newton, A. C.** (2018). Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit Rev Biochem Mol* **53**, 208–230.
- Nguyen, V. C., Tandonnet, J.-P., Khallouk, S., Ghelder, C. V., Portier, U., Lafargue, M., Banora, M. Y., Ollat, N. & Esmenjaud, D.** (2020). Grapevine resistance to the nematode *Xiphinema index* is durable in muscadine-derived plants obtained from hardwood cuttings but not from *in vitro*. *Phytopathology* **110**, 1565–1571.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Nijs, L. den, Hockland, S. & Maafi, Z. T.** (2011). Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. 21–43.
- Niu, X.-M. and Zhang, K.-Q.** (2011). *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology* **2**, 59–78.
- Nordbring-Hertz, B.** (1972). Scanning electron microscopy of the nematode-trapping Organs in *Arthrobotrys oligospora*. *Physiol Plantarum* **26**, 279–284.
- Nordbring-Hertz, B.** (1973). Peptide-induced morphogenesis in the nematode-trapping Fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Physiol Plantarum* **29**, 223–233.
- Nordbring-Hertz, B.** (1977). Nematode-induced morphogenesis in the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Nematologica* **23**, 443–451.
- Nordbring-Hertz, B.** (2004). Morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* - an extensive plasticity of infection structures. *Mycology* **18**, 125–133.
- Nordzike, S., Zobel, T., Fränzel, B., Wolters, D. A., Kück, U. & Teichert, I.** (2015). A fungal sarcolemmal membrane-associated protein (SLMAP) homolog plays a fundamental role in development and localizes to the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and mitochondria. *Eukaryot Cell* **14**, 345–358.

- Olivera-Couto, A., Salzman, V., Mailhos, M., Digman, M. A., Gratton, E. & Aguilar, P. S.** (2015). Eisosomes are dynamic plasma membrane domains showing pil1-lsp1 heterooligomer binding equilibrium. *Biophys J* **108**, 1633–1644.
- Ollat, N., Peccoux, A., Papura, D., Esmenjaud, D., Marguerit, E., Tandonnet, J.-P., Bordenave, L., Cookson, S. J., Barrieu, F. & Rossddeutsch, L.** (2015). Grapevine in a changing environment. 68–108.
- Oro, V., Živković, S., Ivanović, Ž. & Waeyenberge, L.** (2012). First report of the cereal cyst nematode *Heterodera filipjevi* on wheat in Serbia. *Plant Dis* **96**, 1583.
- Panda, O., Akagi, A. E., Artyukhin, A. B., Judkins, J. C., Le, H. H., Mahanti, P., Cohen, S. M., Sternberg, P. W. & Schroeder, F. C.** (2017). Biosynthesis of modular ascarosides in *C. elegans*. *Angewandte Chemie Int Ed* **56**, 4729–4733.
- Paré, P. W. & Tumlinson, J. H.** (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol* **121**, 325–332.
- Patil, R. S., Ghormade, V. & Deshpande, M. V.** (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Tech* **26**, 473–483.
- Peiris, P. U. S., Li, Y., Brown, P. & Xu, C.** (2020). Fungal biocontrol against *Meloidogyne* spp. in agricultural crops: A systematic review and meta-analysis. *Biol Control* **144**, 104235.
- Peneva, V., Urek, G., Lazarova, S., Širca, S., Knapič, M., Elshishka, M. & Brown, D.** (2012). *Longidoridae* and nepoviruses in Bulgaria and Slovenia. *Helminthologia* **49**, 49–56.
- Penn, T. J., Wood, M. E., Soanes, D. M., Csukai, M., Corran, A. J. & Talbot, N. J.** (2015). Protein kinase C is essential for viability of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Microbiol* **98**, 403–419.
- Pöggeler, S. & Kück, U.** (2004). A WD40 repeat protein regulates fungal cell differentiation and can be replaced functionally by the mammalian homologue striatin. *Eukaryot Cell* **3**, 232–240.
- Pracheil, T., Thornton, J. & Liu, Z.** (2012). TORC2 signaling is antagonized by protein phosphatase 2a and the far complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 1325–1339.
- Pramer, D.** (1964). Nematode-trapping fungi. *Science* **144**, 382–388.
- Pramer, D. & Stoll, N. R.** (1959). Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. *Science* **129**, 966–967.
- Pungaliya, C., Srinivasan, J., Fox, B. W., Malik, R. U., Ludewig, A. H., Sternberg, P. W. & Schroeder, F. C.** (2009). A shortcut to identifying small molecule signals that regulate behavior and development in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 7708–7713.
- Radchenko, D., Teichert, I., Pöggeler, S. & Kück, U.** (2018). A Hippo pathway related GCK controls both sexual and vegetative developmental processes in the fungus *Sordaria macrospora*. *Genetics* **210**, genetics.301261.2018.

- Rasmann, S., Köllner, T. G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J. & Turlings, T. C. J. (2005). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* **434**, 732–737.
- Read, N. D. & Beckett, A. (1996). Ascus and ascospore morphogenesis. *Mycol Res* **100**, 1281–1314.
- Read, N. D., Goryachev, A. B. & Lichius, A. (2012). The mechanistic basis of self-fusion between conidial anastomosis tubes during fungal colony initiation. *Fungal Biol Rev* **26**, 1–11.
- Ribeiro, P. S., Josué, F., Wepf, A., Wehr, M. C., Rinner, O., Kelly, G., Tapon, N. & Gstaiger, M. (2010). Combined functional genomic and proteomic approaches identify a pp2a complex as a negative regulator of hippo signaling. *Mol Cell* **39**, 521–534.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mourino-Perez, R. R., Takeshita, N. & Fischer, R. (2018). Fungal Morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiol Mol Biol R* **82**, e00068-17.
- Rodrigues, J. V. F., Braga, F. R., Campos, A. K., Carvalho, L. M. de, Araujo, J. M., Aguiar, A. R., Ferraz, C. M., Silveira, W. F. da, Valadão, M. C., Oliveira, T. de, Freitas, S. G. de & Araújo, J. V. de. (2017). *Duddingtonia flagrans* formulated in rice bran in the control of *Oesophagostomum* spp. intestinal parasite of swine. *Exp Parasitol*. **184**, 11-15
- Rohn, J. L., Sims, D., Liu, T., Fedorova, M., Schöck, F., Dopie, J., Vartiainen, M. K., Kiger, A. A., Perrimon, N. & Baum, B. (2011). Comparative RNAi screening identifies a conserved core metazoan actinome by phenotype. *J Cell Biology* **194**, 789–805.
- Rubio, B., Lalanne-Tisné, G., Voisin, R., Tandonnet, J.-P., Portier, U., Ghelder, C. V., Lafargue, M., Petit, J.-P., Donnart, M., Joubard, B., Bert, P., Papura, D., Cunff, L., Ollat, N. & Esmenjaud, D. (2020). Characterization of genetic determinants of the resistance to phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae*, and the dagger nematode *Xiphinema index* from muscadine background. *Bmc Plant Biol* **20**, 213.
- Rush, T. A., Puech-Pagès, V., Bascaules, A., Jargeat, P., Maillet, F., Haouy, A., Maës, A. Q., Carriel, C. C., Khokhani, D., Keller-Pearson, M., et al. (2020). Lipochitooligosaccharides as regulatory signals of fungal growth and development. *Nat Commun* **11**, 3897.
- Ryder, L. S., Dagdas, Y. F., Kershaw, M. J., Venkataraman, C., Madzvamuse, A., Yan, X., Cruz-Mireles, N., Soanes, D. M., Osés-Ruiz, M., Styles, V., Sklenar, J., Menke, F. L. H. & Talbot, N. J. (2019). A sensor kinase controls turgor-driven plant infection by the rice blast fungus. *Nature* **574**, 423–427.
- Sakuma, C., Kawauchi, T., Haraguchi, S., Shikanai, M., Yamaguchi, Y., Gelfand, V. I., Luo, L., Miura, M. & Chihara, T. (2014). *Drosophila* Strip serves as a platform for early endosome organization during axon elongation. *Nat Commun* **5**, 5180.
- Sakuma, C., Okumura, M., Umehara, T., Miura, M. & Chihara, T. (2015). A STRIPAK component Strip regulates neuronal morphogenesis by affecting microtubule stability. *Sci Rep* **5**, 17769.

- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vögeli-Lange, R., Aeschbacher, R. A., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D. R. & Boller, T.** (2000). Differential expression of eight chitinase genes in medicago truncatula roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 763–777.
- Satchuthananthavale, V. & Cooke, R. C.** (1967). Vitamin requirements of some nematode-trapping fungi. *T Brit Mycol Soc* **50**, 221–228.
- Schmidpeter, J., Dahl, M., Hofmann, J. & Koch, C.** (2017). ChMob2 binds to ChCbk1 and promotes virulence and conidiation of the fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum*. *Bmc Microbiol* **17**, 22.
- Schmidt, A. R., Dörfelt, H. & Perrichot, V.** (2007). Carnivorous fungi from cretaceous amber. *Science* **318**, 1743–1743.
- 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.
- Schneggenburger, R. & Neher, E.** (2005). Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 266–274.
- Schurig, J., Ipach, U., Hahn, M. & Winterhagen, P.** (2021). Evaluating nematode resistance of grapevine rootstocks based on *Xiphinema index* reproduction rates in a fast screening assay. *Eur J Plant Pathol* **160**, 233–238.
- Schuster, M. & Kahmann, R.** (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genet Biol* **130**, 43–53.
- 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.
- Sharpless, K. E. & Harris, S. D.** (2002). Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol Biol Cell* **13**, 469–479.
- Shi, Z., Jiao, S. & Zhou, Z.** (2016). STRIPAK complexes in cell signaling and cancer. *Oncogene* **35**, 4549–4557.
- Shi, T.-Q., Gao, J., Wang, W.-J., Wang, K.-F., Xu, G.-Q., Huang, H. & Ji, X.-J.** (2019). CRISPR/Cas9-based genome editing in the filamentous fungus *Fusarium fujikuroi* and its application in strain engineering for gibberellic acid production. *Acs Synth Biol* **8**, 445–454.
- Si, H., Rittenour, W. R., Xu, K., Nicksarlian, M., Calvo, A. M. & Harris, S. D.** (2012). Morphogenetic and developmental functions of the *Aspergillus nidulans* homologues of the yeast bud site selection proteins Bud4 and Axl2: Fungal Bud4 and Axl2 homologues. *Mol Microbiol* **85**, 252–270.
- Silva, M. E. da, Araújo, J. V. de, Braga, F. R., Borges, L. A., Soares, F. E. F., Lima, W. dos S. & Guimarães, M. P.** (2013). Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* under different culture conditions. *Bmc Res Notes* **6**, 340.

- Silva, M. E. da, Braga, F. R., Borges, L. A., Oliveira, J. M. de, Lima, W. dos S., Guimarães, M. P. & Araújo, J. V. de** (2014). Evaluation of the effectiveness of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of gastrointestinal nematodes in female bovines bred in the semiarid region. *Vet Res Commun* **38**, 101–106.
- Silva, M. E. da, Braga, F. R., Gives, P. M. de, Uriostegui, M. A. M., Reyes, M., Soares, F. E. de F., Carvalho, L. M. de, Rodrigues, F. B. & Araújo, J. V. de** (2015). Efficacy of *Clonostachys rosea* and *Duddingtonia flagrans* in reducing the *Haemonchus contortus* infective larvae. *Biomed Res Int* **2015**, 1–5.
- Simanis, V.** (2015). Pombe's thirteen – control of fission yeast cell division by the septation initiation network. *J Cell Sci* **128**, 1465–1474.
- Simon, S. & Anamika, A.** (2011). Management of root knot disease in rice caused by *Meloidogyne graminicola* through nematophagous fungi. *J Agr Sci* **3**,.
- Singh, N. S., Shao, N., McLean, J. R., Sevugan, M., Ren, L., Chew, T. G., Bimbo, A., Sharma, R., Tang, X., Gould, K. L., Balasubramanian, M. K.** (2011). SIN-Inhibitory phosphatase complex promotes Cdc11p dephosphorylation and propagates SIN asymmetry in fission yeast. *Curr Biol* **21**, 1968–1978.
- Singh, U. B., Sahu, A., Singh, R. K., Singh, D. P., Meena, K. K., Srivastava, J. S., Renu & Manna, M. C.** (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Arthrobotrys oligospora* against *Meloidogyne graminicola* and *Rhizoctonia solani* in Rice (*Oryza sativa* L.). *Biol Control* **60**, 262–270.
- Singh, S., Singh, B. & Singh, A. P.** (2015). Nematodes: a threat to sustainability of agriculture. *Procedia Environ Sci* **29**, 215–216.
- Soliman, M. S., El-Deriny, M. M., Ibrahim, D. S. S., Zakaria, H. & Ahmed, Y.** (2021). Suppression of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato plants using the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* Fresenius. *J Appl Microbiol*.
- Stahelin, C., Müller, J., Mellor, R. B., Wiemken, A. & Boller, T.** (1992). Chitinase and peroxidase in effective (fix+) and ineffective (fix-) soybean nodules. *Planta* **187**, 295–300.
- Staudt & Kassenmeyer.** Resistance to transmission of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index* in some *Vitis* species and hybrids. *Openagrar*.
- Steffan, B. N., Venkatesh, N. & Keller, N. P.** (2020). Let's get physical: bacterial-fungal interactions and their consequences in agriculture and health. *J Fungi* **6**, 243.
- Stein, V., Blank-Landeshammer, B., Müntjes, K., Märker, R., Teichert, I., Feldbrügge, M., Sickmann, A. & Kück, U.** (2020). The STRIPAK signaling complex regulates dephosphorylation of GUL1, an RNA-binding protein that shuttles on endosomes. *PLoS Genet* **16**, e1008819.
- Stein, V., Blank-Landeshammer, B., Märker, R., Sickmann, A. & Kück, U.** (2021). Targeted quantification of phosphorylation sites identifies STRIPAK-dependent phosphorylation of the Hippo pathway-related kinase SmKIN3. *Mbio* **12**,.
- Steinberg, G., Harmer, N. J., Schuster, M. & Kilaru, S.** (2017). Woronin body-based sealing of septal pores. *Fungal Genet Biol* **109**, 53–55.

- Su, H., Zhao, Y., Zhou, J., Feng, H., Jiang, D., Zhang, K. & Yang, J.** (2015). Trapping devices of nematode-trapping fungi: formation, evolution, and genomic perspectives. *Biol Rev* **92**, 357–368.
- Su, H. N., Xu, Y. Y., Wang, X., Zhang, K. Q. & Li, G. H.** (2016). Induction of trap formation in nematode-trapping fungi by bacteria-released ammonia. *Lett Appl Microbiol* **62**, 349–353.
- Sun, J., Miller, J. B., Granqvist, E., Wiley-Kalil, A., Gobbato, E., Maillet, F., Cottaz, S., Samain, E., Venkateshwaran, M., Fort, S., Morris, R. J., Ané, J., Dénarié, J. & Oldroyd, G. E. D.** (2015). Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *Plant Cell* **27**, 823–838.
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Sudhof, T. C. & Sprang, S. R.** (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: A novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* **80**, 929–938.
- 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., Evangelinos, M., Zhou, L., Serizawa, T., Somera-Fajardo, R. A., Lu, L., Takaya, N., Nienhaus, G. U. & Fischer, R.** (2017). Pulses of Ca²⁺ coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension. *Proc Natl Acad Sci* **114**, 5701–5706.
- Teichert, I., Steffens, E. K., Schnaß, N., Fränzel, B., Krisp, C., Wolters, D. A. & Kück, U.** (2014). PRO40 is a scaffold protein of the cell wall integrity pathway, linking the map kinase module to the upstream activator protein kinase C. *PLoS Genet* **10**, e1004582.
- Teichert, I., Pöggeler, S. & Nowrousian, M.** (2020). *Sordaria macrospora*: 25 years as a model organism for studying the molecular mechanisms of fruiting body development. *Appl Microbiol Biot* **104**, 3691–3704.
- Tsukasaki, W., Saeki, K., Katayama, T., Maruyama, J. & Kitamoto, K.** (2016). Molecular dissection of SO (SOFT) protein in stress-induced aggregation and cell-to-cell interactive functions in filamentous fungal multicellularity. *Fungal Biol-uk* **120**, 775–782.
- Tunlid, A. & Ahrén, D.** (2011). Biological control of plant-parasitic nematodes: building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms. 145–169.
- Tunlid, A., Johansson, T. & Nordbring-Hertz, B.** (1991). Surface polymers of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J Gen Microbiol* **137**, 1231–1240.
- Ulzurrún, G. V.-D. de & Hsueh, Y.-P.** (2018). Predator-prey interactions of nematode-trapping fungi and nematodes: both sides of the coin. *Appl Microbiol Biot* **102**, 3939–3949.
- Vilela, V. L. R., Feitosa, T. F., Braga, F. R., Araújo, J. V. de, Souto, D. V. de O., Santos, H. E. da S., Silva, G. L. L. da & Athayde, A. C. R.** (2012). Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the northeastern Brazil. *Vet Parasitol* **188**, 127–133.
- Villate, L., Fievet, V., Hanse, B., Delemarre, F., Plantard, O., Esmenjaud, D. & Helden, M. van** (2008). Spatial distribution of the dagger nematode *Xiphinema index* and its associated grapevine fanleaf virus in french vineyard. *Phytopathology* **98**, 942–948.

- Villate, L., Morin, E., Demangeat, G., Helden, M. V. & Esmenjaud, D. (2012). Control of *Xiphinema index* populations by fallow plants under greenhouse and field conditions. *Phytopathology* **102**, 627–634.
- Vonk, P. J., Escobar, N., Wösten, H. A. B., Lugones, L. G. & Ohm, R. A. (2019). High-throughput targeted gene deletion in the model mushroom *Schizophyllum commune* using pre-assembled Cas9 ribonucleoproteins. *Sci Rep* **9**, 7632.
- Waele, D. D. & Elsen, A. (2007). Challenges in tropical plant nematology. *Annu Rev Phytopathol* **45**, 457–485.
- Walther, T. C., Brickner, J. H., Aguilar, P. S., Bernales, S., Pantoja, C. & Walter, P. (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**, 998–1003.
- Wan, J., Zhang, X.-C. & Stacey, G. (2008). Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signal Behav* **3**, 831–833.
- 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., et al. (2014). Bacteria can mobilize nematode-trapping fungi to kill nematodes. *Nat Commun* **5**, 5776.
- Wenderoth, M., Pinecker, C., Voß, B. & Fischer, R. (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Biol* **101**, 55–60.
- Wilson, J. F. & Dempsey, J. A. (1999). A hyphal fusion mutant in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Reports* **46**, 25–30.
- Xie, Z.-P., Staehelin, C., Wiemken, A., Broughton, W. J., Müller, J. & Boller, T. (1999). Symbiosis-stimulated chitinase isoenzymes of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J Exp Bot* **50**, 327–333.
- Xie, J. L., Grahl, N., Sless, T., Leach, M. D., Kim, S. H., Hogan, D. A., Robbins, N. & Cowen, L. E. (2016). Signaling through Lrg1, Rho1 and Pkc1 Governs *Candida albicans* morphogenesis in response to diverse cues. *Plos Genet* **12**, e1006405.
- Yang, J., Wang, L., Ji, X., Feng, Y., Li, X., Zou, C., Xu, J., Ren, Y., Mi, Q., Wu, J., et al. (2011). Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *Plos Pathog* **7**, e1002179.
- Yang, E., Xu, L., Yang, Y., Zhang, X., Xiang, M., Wang, C., An, Z. & Liu, X. (2012). Origin and evolution of carnivorism in the Ascomycota (fungi). *Proc National Acad Sci* **109**, 10960–10965.
- Yang, C.-T., Ulzurrun, G. V.-D. de, Gonçalves, A. P., Lin, H.-C., Chang, C.-W., Huang, T.-Y., Chen, S.-A., Lai, C.-K., Tsai, I. J., Schroeder, F. C., Stajich, J. E. & Hsueh, Y.P. (2020). Natural diversity in the predatory behavior facilitates the establishment of a robust model strain for nematode-trapping fungi. *Proc Natl Acad Sci* **117**, 6762–6770.
- 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.

- Zekert, N., Veith, D. & Fischer, R.** (2010). Interaction of the *Aspergillus nidulans* Microtubule-Organizing Center (MTOC) Component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs ▽. *Eukaryot Cell* **9**, 795–805.
- Zengler, K. & Zaramela, L. S.** (2018). The social network of microorganisms — how auxotrophies shape complex communities. *Nat Rev Microbiol* **16**, 383–390.
- Zhen, Z., Xing, X., Xie, M., Yang, L., Yang, X., Zheng, Y., Chen, Y., Ma, N., Li, Q., Zhang, K.-Q. & Yang, K.** (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.
- Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., Maeder, M. L., Joung, J. K., Chen, Z.-Y. & Liu, D. R.** (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* **33**, 73–80.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Professor Reinhard Fischer bedanken, der es mir ermöglichte, an diesem Thema zu arbeiten. Er hatte immer ein offenes Ohr für neue Ideen und unterstützte mich bei vielen Aktionen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Kämper für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Vielen Dank auch an Dr. Hedda Schlegel-Starmann und der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die Förderung des Projekts und die Möglichkeiten des Austauschs innerhalb des Promotionsstipendiums.

Ein großes Dankeschön geht an die ganze Wurmgruppe.

Vielen Dank Jenni, Maria, Theresa, und Marius für die gute Zeit und die großartige Unterstützung im Labor, vor allem am Ende mit Kuchen, Eis und Schokolade!

Vielen Dank auch an alle Bachelor- und Masterstudenten, die jeweils spitzen Arbeit geleistet haben! 1000 Dank auch an Süheyla, Michel, Linda und Luis für die starke Unterstützung! Natürlich möchte ich mich auch beim ganzen Labor für eine gute Atmosphäre und den Wissensaustausch bedanken. Danke auch an das Kämper und Requena Labor für die Unterstützung im Labor!

Bedanken möchte ich mich auch bei Ulrike Ipach und Juliane Schurig, die mir vieles über die Nematoden beigebracht und einige ihrer *Xiphinema* zur Verfügung gestellt haben.

Vielen Dank auch an Gert Sonntag und Prof. Dr. Sylvia Erhardt, die mir den Zugang zu ihren Mikroskopen ermöglichten. Ein großes Dankeschön auch an Prof. Dr. André Fleißner und PD Dr. Ines Teichert für den großartigen Austausch über Pilze.

1000 Dank auch an Doktor-Jenny, die am Anfang der Promotion eine tolle Anlaufstelle für alle Fragen und bis zum Schluss *triple 20* war! Vielen Dank auch an Stephan, der ruckzuck Teile der Arbeit korrekturgelesen hat.

Mein größter Dank gilt all meinen Lieblingsmenschen, die mich aus weiter Ferne oder nächster Nähe unendlich unterstützt haben. Ich danke meinen Eltern und meinem Bruder für die großartige Hilfe und den immensen Rückhalt! Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau Nicole bedanken. Wir haben es geschafft und ich freue mich auf alle weiteren Kapitel, die wir gemeinsam schreiben werden!