

## Myxococcus xanthus – Mikrobe des Jahres 2020

# Myxobakterielle Naturstofffabriken

DANIEL KRUG, RONALD GARCIA, ROLF MÜLLER

ABTEILUNG MIKROBIELLE NATURSTOFFE, HELMHOLTZ-INSTITUT FÜR PHARMAZEUTISCHE FORSCHUNG SAARLAND (HIPS), SAARBRÜCKEN, HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR INFEKTIONSFORSCHUNG (HZI), BRAUNSCHWEIG

***Myxococcus xanthus* is a prime example of soil-living myxobacteria featuring a complex lifestyle, including coordinated movement through swarming, predatory feeding on other microorganisms, and the formation of multicellular fruiting bodies. Due to its biosynthetic capabilities for secondary metabolite production and its applicability as biotechnological chassis organism for heterologous expression, *Myxococcus* stands out as a biochemical factory for bioactive molecules with future applications, not only in human therapy.**

DOI: 10.1007/s12268-020-1334-1  
© Die Autoren 2020

■ Der Boden lebt: Jedes Stückchen Erde teilt sich eine Vielzahl verschiedener Lebensformen, darunter unzählige Mikroorganismen wie Pilze und Bakterien. Im Laufe der Evolution entwickelten sie verschiedene Strategie-

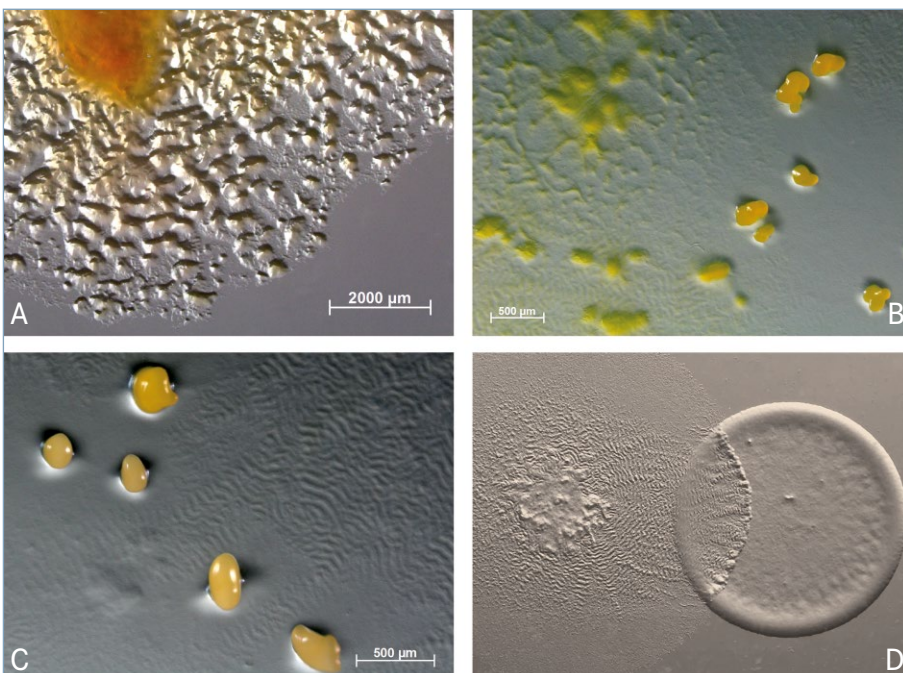
gien, um sich in dieser dicht besiedelten ökologischen Nische zu behaupten. Ein ganz besonderes Konzept verfolgen dabei die nahezu überall verbreiteten Myxobakterien: Zwar wachsen sie langsamer als viele andere

Bakterien, können sich aber in Schwärmen fortbewegen und andere Mikroorganismen als Nahrungsquelle nutzen, indem sie diese enzymatisch zersetzen und sich die dabei frei werdenden Nährstoffe zunutze machen (Abb. 1; siehe auch S. 28 in dieser Ausgabe). Unter Hungerbedingungen hingegen startet ein komplexes Entwicklungsprogramm, an dessen Ende die Bildung multizellulärer Fruchtkörper steht [1]. In diesen können die Myxobakterien in Form von Myxosporen lange Zeit auch widrige Umweltbedingungen wie Hitze und Trockenheit überdauern.

### Ein außergewöhnliches Bodenbakterium

Aufgrund dieser Kombination aus faszinierenden und für Bakterien sehr ungewöhnlichen Fähigkeiten dient das Myxobakterium *Myxococcus xanthus* als Modellorganismus für Studien über die mehrzellige Differenzierung im Bakterienreich, um die molekularen Grundlagen des myxobakteriellen Lebenszyklus im Detail zu verstehen (siehe auch S. 28 in dieser Ausgabe). Der *M. xanthus*-Stamm DK1622 war das erste Myxobakterium, für das 2006 die komplette Genomsequenz veröffentlicht wurde. Sie umfasst 9,8 Megabasenpaare (Millionen Basenpaare); eine bemerkenswerte Größe für ein bakterielles Genom [2].

Neben den beeindruckenden physiologischen Eigenschaften der Myxobakterien gibt es allerdings einen weiteren Grund, weshalb diese seit mehreren Jahrzehnten mit ständig steigendem Aufwand erforscht werden, nämlich ihre Fähigkeit, strukturell anspruchsvolle Moleküle zu synthetisieren und in die Umgebung freizusetzen. Diese sekundären Naturstoffe zeichnen sich nicht nur durch eine enorme strukturelle Vielfalt, sondern auch in vielen Fällen durch starke biologische Aktivität aus. Vermutlich spielen einige der inzwischen mehr als 130 beschriebenen myxobakteriellen Sekundärmetabolitklassen eine Rolle für die aufwendige Lebensweise der Myxobakterien, etwa als Mittel zur „chemischen Verteidigung“ gegen Fraßfeinde innerhalb ihres Lebensraums. In räuberischen myxobakteriellen Schwärmen bilden sie auch Antibiotika, die andere Bakterien töten, welche ihnen dann als Nährstoffquelle



▲ **Abb. 1:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Myxococcus xanthus*. **A**, Schwärmende Kolonie von *M. xanthus* auf einer Agarplatte; **B**, beginnende Fruchtkörperbildung unter Hungerbedingungen; **C**, typische *Myxococcus*-Fruchtkörper sowie Gruppen von schwärmenden Zellen, die dazwischen als wellenförmige Muster sichtbar sind; **D**, „räuberisches“ Vorgehen gegenüber einer unbeweglichen *Escherichia coli*-Kolonie (rechts).

dienen. Sekundärstoffe sind auch Kommunikationssignale zur koordinierten Schwarmbewegung und Fruchtkörperbildung. Der myxobakterielle Naturstoff Myxovirescin ist beispielsweise entscheidend daran beteiligt, dass *Myxococcus* sich eindrucksvoll gegen „Beutebakterien“ wie *Escherichia coli* durchzusetzen vermag, obwohl diese deutlich schneller wachsen (**Abb. 1D**, [3]).

### Faszinierende Naturstoff- und Methodenvielfalt

Die meisten bisher gefundenen myxobakteriellen Naturstoffe sind Produkte komplexer Multienzymsysteme – hergestellt von Polyketidsynthasen (PKS) und nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) oder Kombinationen daraus (**Abb. 2**). Diese Biosynthesewege, deren enzymatische Funktionen im Genom meist gruppiert in biosynthetischen Genclustern (BGC) codiert sind, bringen eine enorme strukturelle Diversität hervor. Das hängt mit den variablen Verknüpfungen einer großen Auswahl an niedermolekularen Bausteinen zusammen. Zudem werden diese

*building blocks* während der Biosynthese modifiziert und nicht zuletzt die unfertigen Produkte am Ende mithilfe spezialisierter Enzyme mit weiteren funktionellen Gruppen dekoriert.

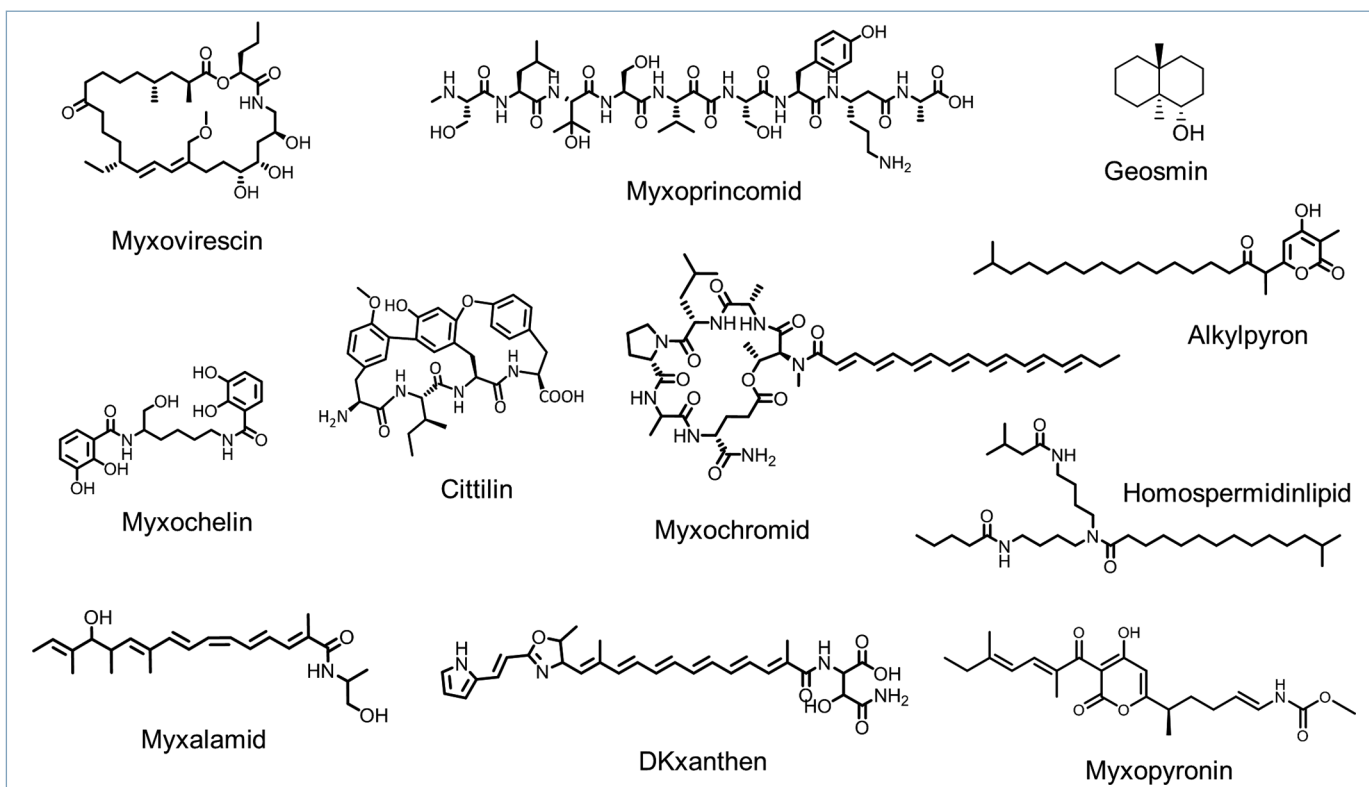
So vielfältig wie die Strukturen der myxobakteriellen Sekundärmetaboliten sind inzwischen auch die Methoden, die zu ihrer Entdeckung und Charakterisierung angewendet werden – von der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung von Kulturextrakten über chemisches Screening mittels hochauflösender Massenspektrometrie (MS) bis hin zu neueren *Genomics*- oder *Metabolomics*-basierten Ansätzen. Früher wurden Substanzen meist bei der Suche nach bestimmten Aktivitäten entdeckt, beispielsweise die antibiotischen Myxovirescine aus *M. virescens* und die antifungischen Myxalamide aus *M. xanthus* (**Abb. 2**). Heute ermöglicht die eingehende Analyse myxobakterieller Extrakte mittels hochauflösender HPLC (*high performance liquid chromatography*)-MS mühelos die Identifikation weiterer Sekundärmetaboliten, die teils schon aus anderen

Myxobakterien bekannt sind. So zeigte sich, dass der Modellstamm *M. xanthus* DK1622 neben Myxovirescin und Myxalamid auch den Eisenchelator Myxochelin sowie Cittilin und Myxochromid produziert (**Abb. 2**, [4]).

### Gelbe Pigmente fördern die Keimung

Aus den Genomdaten für *M. xanthus* DK1622 konnten die biosynthetischen Gencluster für die Produktion dieser Substanzklassen mittels gezielter Geninaktivierung und nachfolgender HPLC-MS-Profilierung zugeordnet werden. Basierend auf diesem als *genome mining* bekannten Ansatz wurden auch neue Sekundärmetaboliten entdeckt. Beispiele hierfür sind intensiv gelbe Pigmente, die DKxanthene (**Abb. 2**), die offenbar eine wichtige Rolle für das effiziente Auskeimen der Myxosporen aus den Fruchtkörpern von *M. xanthus* spielen, sowie Myxoprincomid, das die Bakterien nur in äußerst geringer Menge produzieren und dessen Funktion bisher ungeklärt ist [5, 6].

Auch flüchtige Sekundärmetaboliten aus Myxobakterien sind bekannt. Dazu zählt



▲ **Abb. 2:** Strukturen der Substanzklassen, die von *Myxococcus xanthus* DK1622 produziert werden, sowie des antibiotischen Sekundärmetaboliten Myxopyronin aus dem verwandten *Myxococcus fulvus*.

Geosmin, das mittels Gaschromatographie(GC)-MS-Analytik im Luftraum über Agarplattenkulturen von *M. xanthus* identifiziert wurde und einen „erdigen“ Geruch aufweist [7]. Je nach Wahl des analytischen Ansatzes lassen sich weitere Substanzen entdecken. So charakterisierten wir erst kürzlich durch Vergleich von HPLC-MS- und MALDI-Imaging-Messungen Homospermidinlipid als neuen Sekundärmetaboliten, den DK1622 spezifisch während der Fruchtkörperentstehung bildet [8]. Alkylpyron (**Abb. 2**) wurde erst nach Überexpression eines PKS-Genclusters in DK1622 erhalten, wobei es schon vorab anhand der Genomdaten einen Hinweis auf die Aktivität der Substanz als Topoisomerase-Inhibitor gab [9]. Wahrscheinlich ist bisher erst weniger als die Hälfte des Sekundärmetaboloms aus *M. xanthus* aufgeklärt.

### Heterologe Expression: *Myxococcus* als Wirkstofffabrik

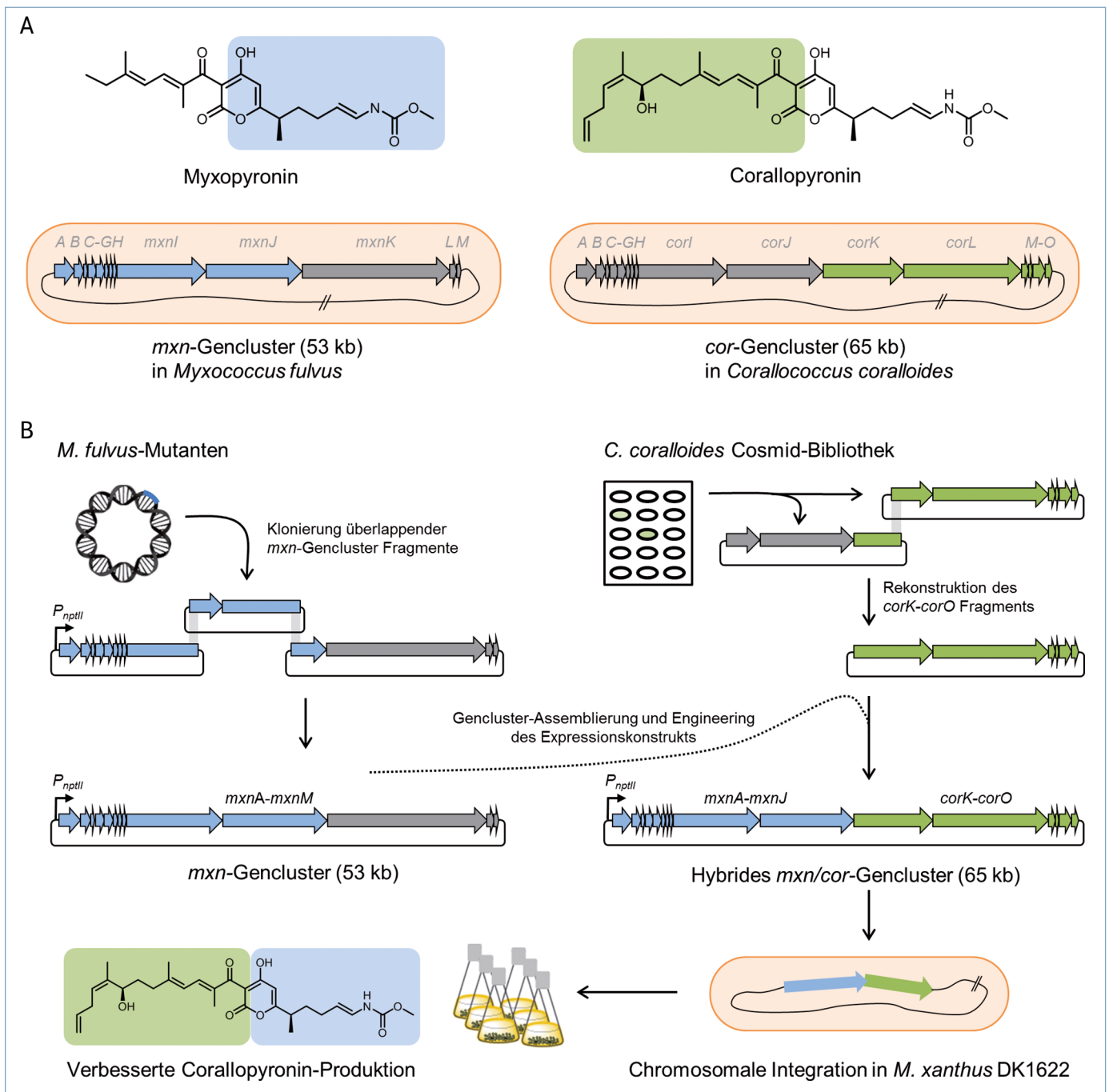
Die Entdeckung eines neuen Naturstoffs mit interessanter biologischer Aktivität (*screening hit*) ist zwar ein erster wichtiger Schritt, doch auf dem Weg zum neuen Wirkstoff oder gar Medikament warten zahlreiche weitere Hürden. Unter anderem müssen

ausreichende Mengen der Testsubstanz gewonnen werden. Zudem ist es häufig hilfreich, strukturelle Derivate herzustellen. Ein aktuelles Beispiel sind die Corallopyronine, myxobakterielle Naturstoffe mit  $\alpha$ -Pyron-Grundstruktur. Diese Sekundärmetaboliten von *Coralloccoccus coralloides* könnten eines Tages zu einem Antibiotikum entwickelt werden; sie hemmen die bakterielle RNA-Polymerase, ohne dass eine Kreuzresistenz mit dem klinisch verwendeten Rifampicin besteht. Bisher existiert für Corallopyronin jedoch keine Totalsynthese mit zufriedenstellender Ausbeute, und die erforderlichen Substanzmengen für die derzeit durchgeführte präklinische Evaluation sind durch Kultivierung des natürlichen Produzenten praktisch nicht zu erhalten. Außerdem ist *Coralloccoccus* bislang keiner genetischen Manipulation zugänglich, weshalb ein heterologes Produktionssystem mit dem gut manipulierbaren Modellstamm *M. xanthus* DK1622 als Wirt etabliert wurde (**Abb. 3**, [10]). Dafür entnahmen wir Teile des Corallopyronin-Genclusters (*cor*) einer Cosmidbibliothek und fügten sie mittels molekularbiologischer Methoden passend zusammen. Um den Biosynthese-Gencluster zu vervollständigen, klonierten

wir fehlende Gene aus *Myxococcus fulvus*, dessen Myxopyronin-Gencluster (*mxn*) zum Teil mit dem *cor*-Gencluster übereinstimmt (**Abb. 3**). Durch weitere Veränderungen am so erhaltenen hybriden Expressionskonstrukt gelang es in nachfolgenden Arbeiten, die Produktion von Corallopyronin im heterologen Wirt *M. xanthus* DK1622 auf mehr als 200 Milligramm pro Liter zu steigern. Zudem war es damit möglich, die Selbstresistenz des Produktionsstamms gegenüber dem antibiotischen Naturstoff zu untersuchen [11]. So schufen wir eine nützliche Basis für die biotechnologische Produktion von Corallopyronin. Zudem ist es nun möglich, weitere Details der Corallopyronin-Biosynthese zu beleuchten, was wiederum Voraussetzung für die Herstellung von neuen Strukturvarianten mittels *Engineering* des zugrunde liegenden biosynthetischen Genclusters ist.

### Anwendung in Medizin, Landwirtschaft und Biotechnologie

Myxobakterien sind eine wichtige Quelle für neuartige Naturstoffe mit vielfältigen biologischen Aktivitäten. Sie werden auch dringend für die Entwicklung zukünftiger Behandlungsoptionen benötigt, besonders im



**▲ Abb. 3:** Heterologe Expression mikrobieller Naturstoffe. **A,** Strukturen und Gencluster der antibiotischen Substanzen Myxopyronin aus *Myxococcus fulvus* (*mxn*) und Corallopyronin aus *Coralloccoccus coralloides* (*cor*). **B,** Klonierungsstrategie für die Konstruktion eines hybriden *mxn/cor*-Genclusters zwecks verbesserter Produktion von Corallopyronin. Das hybride Expressionskonstrukt kann in *Escherichia coli* weiter verändert werden. Im heterologen Wirt *M. xanthus* DK1622 kann es schließlich Corallopyronin mit hoher Ausbeute produzieren [10].

Bereich der Infektionskrankheiten – nicht zuletzt wegen der sich stetig verschärfenden Antibiotikaresistenz-Problematik. Aber auch für die Krebstherapie, als antivirale Wirkstoffe sowie für Anwendungen etwa im Pflanzenschutz bieten myxobakterielle Sekundärmetaboliten spannende Perspektiven [12]. Das biosynthetische Potenzial der Myxobakterien erscheint vielversprechend für zukünftige Naturstoffentdeckungen, wofür die einge-

hende Analyse neuer Spezies, Genera und Familien entscheidend sein wird. Auch von *Myxococcus* – mit bisher nur vier beschriebenen Spezies – sind weitere interessante Naturstoffunde zu erwarten. Zudem werden genetisch gut charakterisierte Myxobakterien wie *M. xanthus* zukünftig auch eine immer wichtigere Rolle als biotechnologische Produktionsplattform für die Herstellung von komplexen Naturstoffmolekülen spielen.

Bei der Suche nach interessanten neuen Myxobakterien setzen wir neuerdings auch auf die Mithilfe der Bevölkerung: Im Rahmen der *Citizenscience*-Aktion „Sample das Saarland“ kann sich jeder als Bürgerwissenschaftler betätigen und mithilfe eines Probensammel-Sets Bodenproben an das HIPS-Labor senden, aus denen dann bisher unbekannte Myxobakterien isoliert werden (siehe **Kasten**).



## Citizenscience-Aktion

Sie möchten den Wissenschaftlern am Helmholtz-Institut in Saarbrücken helfen, neue Myxobakterien zu entdecken? Senden Sie ihnen eine Bodenprobe! Mehr Informationen hier: <https://hips.saarland/sample>.

### Widmung

Die Autoren widmen diesen Artikel Silke C. Wenzel (†2019) in Erinnerung an ihre wegweisenden Arbeiten zur heterologen Expression von myxobakteriellen Naturstoffen und ihre tragende Rolle beim Aufbau unseres Instituts. ■

### Literatur

- [1] Muñoz-Dorado J, Marcos-Torres FJ, García-Bravo E et al. (2016) Myxobacteria: moving, killing, feeding, and surviving together. *Front Microbiol* 7, doi: 10.3389/fmicb.2016.00781
- [2] Goldman BS, Nierman WC, Kaiser D et al. (2006) Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15200–15205
- [3] Xiao Y, Wei X, Ebright R et al. (2011) Antibiotic production by myxobacteria plays a role in predation. *J Bacteriol* 193:4626–4633
- [4] Krug D, Zurek G, Revermann O et al. (2008) Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity. *Appl Environ Microbiol* 74:3058–3068
- [5] Meiser P, Bode HB, Müller R (2006) The unique DKxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19128–19133
- [6] Cortina NS, Krug D, Plaza A et al. (2012) Myxoprincomide: a natural product from *Myxococcus xanthus* discovered by comprehensive analysis of the secondary metabolome. *Angew Chem Int Ed* 51:811–816
- [7] Dickschat JS, Wenzel SC, Bode HB et al. (2004) Biosynthesis of volatiles by the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *ChemBiochem* 5:778–787
- [8] Hoffmann M, Auerbach D, Panter F et al. (2018) Homospermidine lipids: a compound class specifically formed during fruiting body formation of *Myxococcus xanthus* DK1622. *ACS Chem Biol* 13:273–280
- [9] Hug JJ, Panter F, Krug D et al. (2019) Genome mining reveals uncommon alkylpyrones as type III PKS products from myxobacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46:319–334
- [10] Sucipto H, Pogorevc D, Luxenburger E et al. (2017) Heterologous production of myxobacterial  $\alpha$ -pyrone antibiotics in *Myxococcus xanthus*. *Metab Eng* 44:160–170

[11] Pogorevc D, Panter F, Schillinger C et al. (2019) Production optimization and biosynthesis revision of coralopyronin A, a potent anti-filarial antibiotic. *Metab Eng* 55:201–211

[12] Herrmann J, Fayad AA, Müller R (2017) Natural products from myxobacteria: novel metabolites and bioactivities. *Nat Prod Rep* 34:135–160

**Funding:** Open Access funding provided by Projekt DEAL.

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

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Rolf Müller  
Helmholtz-Institut für Pharmazeutische  
Forschung Saarland  
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung  
Abteilung Mikrobielle Naturstoffe  
Uni Campus, Gebäude E8.1  
D-66123 Saarbrücken  
rolf.mueller@helmholtz-hips.de  
[www.helmholtz-hips.de](http://www.helmholtz-hips.de)

### AUTOREN



#### Daniel Krug

1997–2003 Chemiestudium an der TU Braunschweig. 2004–2009 Promotion am Institut für Pharmazeutische Biotechnologie an der Universität des Saarlandes. Seit 2009 Wissenschaftler am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) in Saarbrücken.



#### Ronald Garcia

1999–2003 Mikrobiologiestudium an der Universität Santo Tomas, Manila, Philippinen. 2011 Promotion an der Universität des Saarlandes und am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS). Seit 2012 Wissenschaftler am HIPS und seit 2016 am Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF).



#### Rolf Müller

1986–1990 Pharmaziestudium an der Universität Bonn, dort 1994 Promotion. 1996–1997 Postdoc in Seattle, USA. 1998–2003 Juniorgruppenleiter an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig. Seit 2003 Professor für Pharmazeutische Biotechnologie an der Universität des Saarlandes und seit 2009 Gründungsdirektor des Helmholtz-Instituts für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS).