

Ein chimärer Siderophor stoppt das Schwarmverhalten von *Vibrio***

Thomas Böttcher und Jon Clardy*

Unter bestimmten Bedingungen beginnen manche Bakterien zu schwärmen; sie bewegen sich rasch und als Kollektiv über eine Oberfläche. Um die molekularen Signalstoffe, die das Schwarmverhalten kontrollieren, besser zu verstehen, isolierten wir zwei Bakterienstämme von einer Rotalgenprobe – *Vibrio alginolyticus* B522, ein aktiv schwärmender Stamm, und *Shewanella algae* B516, der das Schwärmen von *V. alginolyticus* in seinem Umfeld inhibiert. Platten-basierte Tests in Kombination mit NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Röntgenbeugung ermöglichen es, ein kleines Molekül, dem wir den Namen Avaroferrin gaben, als Inhibitor des Schwarmverhaltens zu identifizieren. Bei Avaroferrin, einem zuvor unbekannten cyclischen Dihydroxamat-Siderophor, handelt es sich um eine Chimäre zweier bekannter Siderophore: Putrebactin und Bisucaberin. Das sequenzierte Genom von *S. algae* zeigte, dass der Gencluster für die Biosynthese von Avaroferrin eine Mischung aus den Biosynthesegenen für Putrebactin und Bisucaberin darstellt. Avaroferrin hemmt das Schwärmen durch seine Fähigkeit, Eisen so zu binden, dass es nicht von *V. alginolyticus* ausgebeutet werden kann, und sichert dabei diese wichtige Ressource für seinen Produzenten.

Während Bakterien lange Zeit nur als individuelle Zellen mit planktonischer Lebensweise erforscht wurden, werden sie heute mehr und mehr als vielzellige Gemeinschaften auf Oberflächen wahrgenommen. Diese neue Sichtweise führte zu Beobachtungen, Fragen und Theorien darüber, wie und warum Bakterien sich über Oberflächen bewegen.^[1] Bakterielles Schwarmverhalten ist eine häufig beobachtete und eindrucksvolle Form von gruppendiffusiver Bewegung, wobei die Gründerkolonie sich konzentrisch im Geschwindigkeitsbereich von mm h^{-1} ausdehnt.

Schwärmer-Zellen unterscheiden sich grundlegend von ihren nichtschwärzenden Verwandten hinsichtlich Morpho-

logie und Metabolismus.^[2] Zum Beispiel weisen Schwärmer-Zellen eine höhere Toleranz gegen Antibiotika^[3] und höhere Virulenz in Infektionsmodellen gegenüber nichtschwärzenden Zellen auf.^[4]

Um Einblicke zu erhalten, warum Bakterien schwärzen und möglicherweise therapeutische Ansätze zur Verbesserung der Antibiotikasensitivität oder zur Unterdrückung der Virulenz zu finden, versuchten wir kleine Moleküle mit regulatorischen Funktionen für das Schwarmverhalten zu identifizieren. Wir berichten hier über die Entdeckung eines chimären Siderophors produziert von *Shewanella algae* B516, welches das Schwärmen von *V. alginolyticus* B522 inhibiert, sowie die Annotation seines Biosynthesewegs und die Aufklärung des Wirkmechanismus.

Wir entwickelten vor kurzem ein ökologisch relevantes Modell für Schwarmverhalten basierend auf *Vibrio alginolyticus* B522, einem Umweltisolat von der Carrageenan-produzierenden Rotalge *Chondrus crispus*, und Kulturplatten hergestellt mit dem sulfatierten Polysaccharid κ-Carrageenan als Ersatz für Agar. Der Bakterienstamm erwies sich als aktiver Schwärmer mit einer Vorstoßgeschwindigkeit von ca. 5 mm h^{-1} . In einem Screening weiterer Isolate von der gleichen Rotalgenprobe fanden wir Stamm B516, den eine klare Zone von schwärmenden *V. alginolyticus* B522 auf Carrageenan-Platten trennte (Abbildung 1A). Dieses Isolat wurde durch phylogenetische Analyse der 16S-RNA und der *gyrB*-Gensequenz als *Shewanella algae* identifiziert (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).

Hochauflösende Differentialinterferenzkontrast(DIC)-Mikroskopie zeigte, dass die klare Zone nicht durch einen antibiotischen Effekt zustande kam, da sich auch innerhalb der Zone eine dünne Schicht lebender, aber nicht mobiler Zellen von *V. alginolyticus* fand. Mit DIC-Aufnahmen im Zeitraffer konnten wir zeigen, dass die Beweglichkeit der Zellen in der Inhibitionzone (S1) stark eingeschränkt war im Vergleich zu außerhalb (S2) oder verglichen mit den Negativkontrollen (C1 und C2) in gleichem Abstand (Abbildung 1B, Abbildung S2). Längere Inkubationszeiten (mehrere Tage) führten zum Verschwinden der Zone, was uns schlussfolgern ließ, dass lediglich die Mobilität von *V. alginolyticus* B522 durch *S. algae* verringert wurde. Unsere computergestützte Analyse der mikroskopischen Zeitrafferaufnahmen bestätigte die visuellen Beobachtungen, und Zellen in der Inhibitionzone verbrachten signifikant weniger Zeit in Bewegung (Abbildung S3). Wir vermuteten daher, dass ein diffusionsfähiger nicht-toxischer Inhibitor des Schwarmverhaltens für diesen ungewöhnlichen Effekt verantwortlich war.

Wir kultivierten *S. algae* B516 auf Carrageenan-Platten und extrahierten die Kulturen mit Isopropylalkohol. Die Fraktionierung mittels einer C18-Sep-Pak-Kartusche ergab die aktive Fraktion in der Elution mit 30 % Methanol, welche

[*] Dr. T. Böttcher, Prof. Dr. J. Clardy
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology,
Harvard Medical School
240 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (USA)
E-Mail: Jon_Clardy@hms.harvard.edu

[**] Wir danken Jennifer Waters und dem Nikon Imaging Center an der Harvard Medical School für die Nutzung der Hochauflösungsmikroskopie und Dr. Shao-Liang Zheng vom Center for Crystallographic Studies der Harvard University für die Lösung der Kristallstruktur von Avaroferrin. Bildanalyse und Auswertungssoftware wurden am Image and Data Analysis Core (IDAC) der Harvard Medical School mit der Hilfe von Hunter Elliott entwickelt. Das Forschungsprojekt wurde durch ein Stipendium der Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina LPDS 2009-45 (T.B.), NIH grant GM086258 (J.C.) und NERCE-BEID über 5U54 AI057159 (J.C.) gefördert.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310729> zu finden.

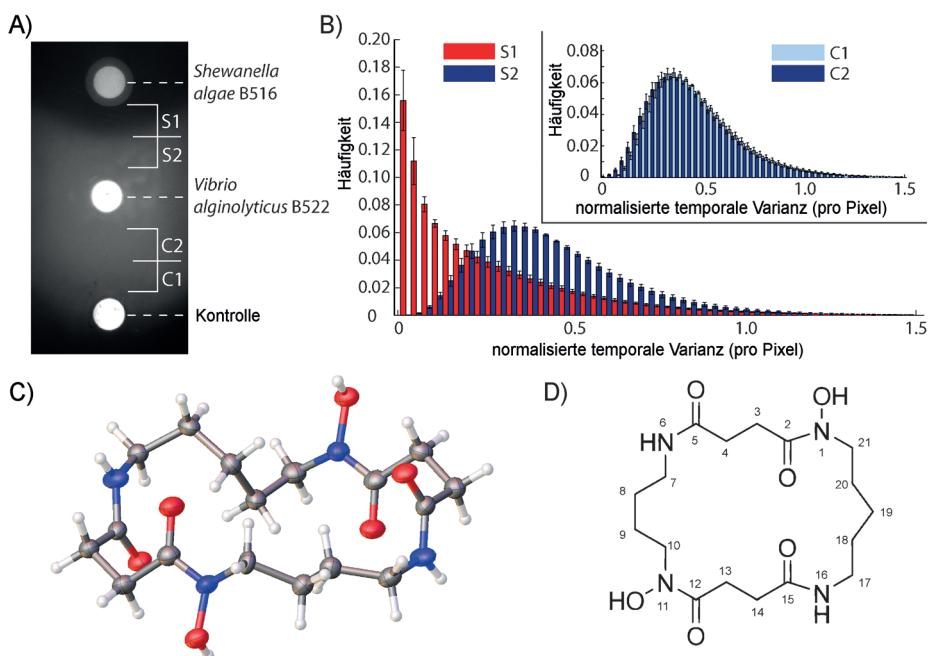


Abbildung 1. *Shewanella algae* B516 hemmt die Schwarmbeweglichkeit von *Vibrio alginolyticus* durch Avaroferrin. A) Ein Platten-basierter Test des Schwarmverhaltens zeigt eine Inhibitionzone um die Kolonie von *S. algae*. B) Bewegungsanalyse auf Zellebene, gegeben durch normalisierte temporale Varianz (pro Pixel) von Zeitrafferaufnahmen, wobei hohe temporale Varianz hohe Bewegungsaktivität bedeutet und die Frequenz den Anteil an Pixel bei einer gegebenen Bewegungsaktivität darstellt. Bakterien in der dünnen Schicht innerhalb der Inhibitionzone S1 weisen stark verringerte Beweglichkeit auf im Vergleich zu Zone S2 nahe der Kolonie von *V. alginolyticus*. Einschub: die Bewegungsaktivität in den entsprechenden Zonen (C1 und C2) in der nicht-inhibierten Kontrolle zeigt keine Abstandabhängigkeit. Fehlerbalken geben den Standardfehler des arithmetischen Mittels. C) Kristallstruktur von Avaroferrin mit 0.84 Å Auflösung und D) Strukturformel von Avaroferrin.

bis zur Homogenität über HPLC aufgereinigt wurde (Abbildung S4).

Hochauflösende Massenspektrometrie (MS) ergab $C_{17}H_{30}N_4O_4$ als Summenformel. NMR-Spektroskopie führte zu Struktur **1**, welche mittels Kristallstrukturanalyse bestätigt wurde (Abbildungen 1 C,D, Abbildungen S5–S12, Tabelle S1).

Die aktive Verbindung ist ein bislang unbekannter makrocyclischer Dihydroxamat-Siderophor, den wir Avaroferrin (**1**) nannten – vom lateinischen Wort *avarus* für geizig. Die Verwendung von 50 nmol reinem Avaroferrin und Co-Kultivierung mit dem *S. algae*-Stamm auf Carrageenan-Platten resultierten in der gleichen Halo-bildenden Inhibition des Schwarmverhaltens von *V. alginolyticus* auf makroskopischer Ebene und in der gleichen Hemmung der Motilität auf mikroskopischer Ebene, was die Rolle von Avaroferrin bestätigte (Abbildung S13).

Avaroferrin (AF) ist die heterodimere Chimäre von zwei homodimeren Siderophoren: Putrebactin (PB)^[5] und Bisucaberin (BC).^[6] Alle drei Moleküle sind Dimere von Polyaminen, Putrescin mit vier und Cadaverin mit fünf Kohlenstoffatomen, verknüpft mit Bernsteinsäure über eine Hydroxamatbindung (Abbildung 2). Um die Biosynthese von Avaroferrin zu untersuchen, sequenzierten wir das Genom *S. algae* B516 und fanden nur einen einzigen Gencluster mit Homologie zu den Bisucaberin- und Putrebactin-Clustern,

die zuvor für andere Spezies beschrieben worden waren (Abbildung 2 A, Abbildung S14).^[7] Dieser Cluster, *avbA–D*, wies die höchste Homologie mit Genen im Bisucaberin-Cluster *bibA–C* von *Vibrio salmonicida*^[7b] oder den Genen im Putrebactin-Cluster *pubA–C* von *Shewanella putrefaciens* auf (Tabelle S2).^[7a]

Die Biosynthese von Putrebactin und Bisucaberin benötigt Putrescin oder Cadaverin, die jeweils durch die Umwandlung von Ornithin oder Lysin durch Decarboxylasen hergestellt werden (Abbildung 2). Eine Aminofunktion des Polyamins wird zum Hydroxylamin umgewandelt und anschließend an Succinyl-CoA gekuppelt, um die entsprechende Hydroxamsäure zu bilden. Diese Einheit wird durch die Kupplung des freien Amins eines Monomers mit der freien Carboxylgruppe eines zweiten Monomers dimerisiert und ergibt zunächst einen linearen Vorläufer. Das gleiche Enzym, das die Bildung der Amid Bindung katalysiert, makrocyclisiert den linearen Vorläufer zum cyclischen Homodimer.^[7]

Der Biosynthesecluster für Avaroferrin besteht aus *avbA*, einem nahen Homolog zur Decarboxylase *bibA* für die Cadaverin-Biosynthese im Bisucaberin-Cluster, und *avbB–D*, welche die höchste Ähnlichkeit zu *pubA–C* in der Putrebactin-Biosynthese aufweisen. Die in *avbC* und *avbD* im Avaroferrin-Cluster codierten Enzyme entsprechen dem einzelnen, aus zwei Domänen fusionierten Protein BibC im Bisucaberin-Cluster. Acht nachfolgende Gene mit transportbezogenen Funktionen (*avtA–H*) wurden identifiziert, und eine nähere Analyse ergab auch hier eine gemischte Abstammung. Während eine Serie von ABC-Transportern (*avtB–E*) für den Siderophorexport die höchste Homologie zu den Bisucaberin-Exportern (*bitB–E*) aufwies, teilten die TonB-abhängigen Rezeptoren (*avtA* und *avtG*) und die Reduktase (*avtF*) Homologie mit denen des Putrebactin-Clusters (*putA* und *putB*) in *Shewanella*. Ein Fragment eines ähnlichen Genclusters von einer unbekannten Spezies wurde in einer Metagenom-Datenbank aus Tiefseesedimenten gefunden, und dieser Cluster kloniert in *E. coli* produziert Bisucaberin.^[8] Diese Beobachtung ließ vermuten, dass Avaroferrin möglicherweise nicht das einzige Siderophor ist, das von *S. algae* B516 produziert wird.

Eine Neuauswertung der inaktiven Fraktionen der *S. algae* B516-Extrakte mittels LC-MS-Analyse zeigte, dass die beiden Homodimere, Putrebactin und Bisucaberin ebenfalls vorlagen (Abbildung 2 A). Die drei Siderophore wurden im Verhältnis AF/PB/BC von 2:1:1 erhalten, was zu erwarten

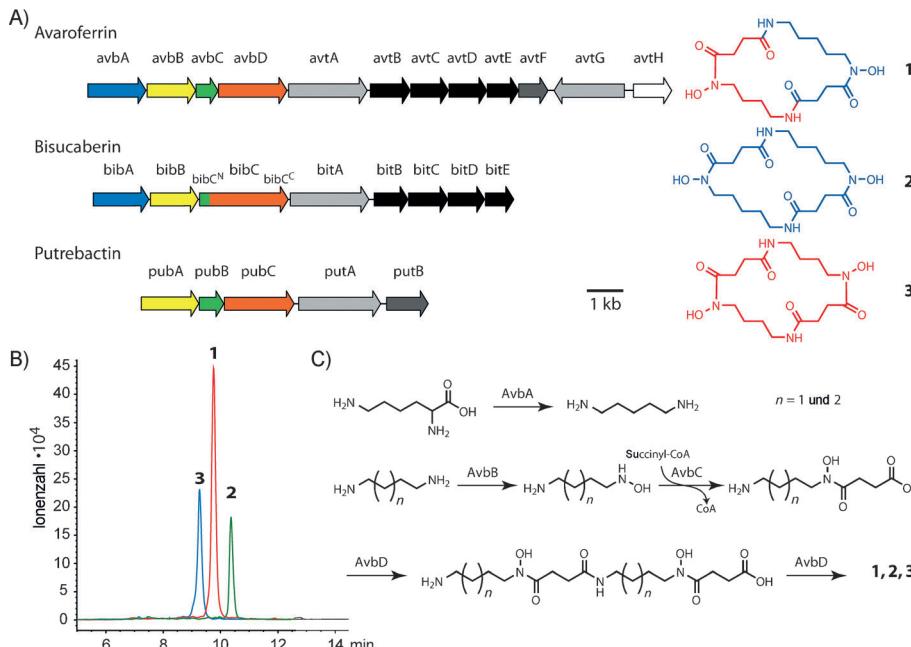


Abbildung 2. Biosynthese von Avaroferrin. A) Annotierter Gencluster für die Biosynthese und den Transport von Avaroferrin im Vergleich zu den Clustern für Bisucaberin und Putrebactin von *V. salmonicida* und *S. putrefaciens*. Funktion und Sequenzhomologie der Genprodukte sind durch gleiche Farbcodierung dargestellt. Die Strukturen von allen drei Verbindungen, die ihren entsprechenden Biosyntheseclustern zugeordnet sind, zeigen die chimäre Natur von Avaroferrin. B) HPLC-Spektren der entsprechenden extrahierten $[M + H]^+$ -Ionen ergaben, dass alle drei Siderophore durch *S. algae* B516 im Verhältnis 2:1:1 produziert werden. C) Vorgeschlagene Route für die promiskuitive Biosynthese von Avaroferrin (1), Bisucaberin (2) und Putrebactin (3) durch den Biosynthesekomplex von *V. alginolyticus*.

wäre, wenn die einzelnen Schritte in der Biosynthese indifferent bezüglich der Anzahl an Methylengruppen im Polyaminsubstrat sind (Abbildung 2B). Die offenbar fehlende Diskriminierung dürfte angesichts der Beteiligung nahezu identischer chemischer Umwandlungen nicht überraschen (Abbildung 2C),^[7] besonders im Hinblick auf frühere Untersuchungen, die zeigten, dass das AvbD-Homolog PubC sowohl die Dimerisierung als auch die Cyclisierung katalysiert.^[7a]

Wir isolierten und charakterisierten auch Putrebactin und Bisucaberin (Abbildungen S15, S16) und verglichen die Hemmung des Schwarmverhaltens von *Vibrio alginolyticus* mit dem von Avaroferrin. Zusätzlich dazu, dass Avaroferrin in zweifach höherer Menge produziert wurde, erwies es sich auch als etwa doppelt so aktiv wie Bisucaberin und Putrebactin bei der Ausbildung von Inhibitionszonen, und die entstandenen Zonen hatten länger bestand (Abbildungen 3A,B). Die relativ geringe Aktivität der letzteren erklärt, warum diese in der ursprünglichen bioaktivitätsgestützten Fraktionierung nicht gefunden wurden, und wirft die Frage auf, wie derart ähnliche Verbindungen so unterschiedliche Aktivität gegen das Schwärmen aufweisen können.

Weder für Putrebactin noch Bisucaberin wurde zuvor eine Rolle im Schwarmverhalten gefunden. Beide sind jedoch wohlbekannte Siderophore, kleine diffusionsfähige Moleküle, die viele Bakterien herstellen, um Eisen in seiner schwer löslichen dreiwertigen Form aus der Umwelt aufzunehmen zu können. Um zu unterscheiden, ob Avaroferrin das Schwär-

men hemmt, indem es als Siderophor agiert oder ob es als eine Art von Signal wirkt, untersuchten wir, ob die Zugabe von Eisen(III)-Ionen der Inhibition des Schwarmverhaltens entgegenwirkte. Avaroferrin verlor seine Wirkung als Inhibitor, wenn es zusammen mit einem Überschuss an Eisen(III) eingesetzt wurde. Eisen(III) alleine hatte keinen Einfluss auf das Schwärmen (Abbildung S17).

Dieser Antagonismus zwischen Eisen und Avaroferrin ließ vermuten, dass entweder *V. alginolyticus* Eisen zum Schwärmen benötigte und dass Avaroferrin seine Fähigkeit es aufzunehmen einschränkte, oder dass Avaroferrin in seiner eisengebundenen Form nicht als putatives Signal agieren konnte.

Wir verglichen die Eisenbindefähigkeit von Avaroferrin, Bisucaberin, und Putrebactin durch die Messung ihrer pm(Fe^{III})-Werte, wie zuvor beschrieben.^[9] Alle drei bildeten rote Eisenkomplexe mit $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$ und zeigten sehr ähnliche pm(Fe^{III})-Werte bei pH 7.4.

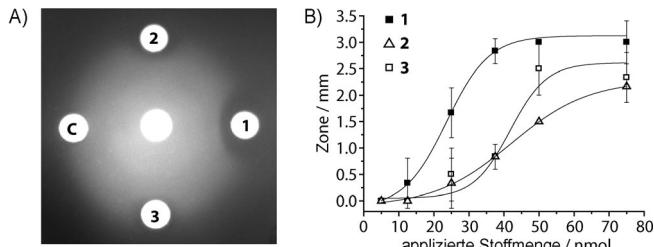


Abbildung 3. Avaroferrin (1) ist wirksamer als Bisucaberin (2) und Putrebactin (3). A) Auch nach verlängerter Inkubation (30 h) ist das Schwärmen von *V. alginolyticus* B522 ausgehend vom Zentrum durch 1 noch immer signifikant inhibiert, während die Zonen von 2 und 3 großteils durch schwärmende Zelle überlaufen wurden (75 nmol von jeder Verbindung). Punkt (C): DMSO-Kontrolle (Dimethylsulfoxid). B) Dosis-Wirkungs-Beziehung für alle drei Verbindungen gemessen an der Größe der Inhibitionszonen mit mittlerer effektiver Dosis (ED_{50}) von 24 nmol für Avaroferrin und 41 nmol und 43 nmol jeweils für Bisucaberin und Putrebactin.

(23.5 für AF, 23.3 für BC und 22.8 für PB), was mit zuvor publizierten Daten übereinstimmt (Abbildung 4A, Abbildung S18).^[10] Es ist unwahrscheinlich, dass diese kleinen Unterschiede für die einzigartige Aktivität von Avaroferrin verantwortlich sind, und wir untersuchten daher das Potential verschiedener Eisen-Chelatliganden und Siderophore.

Deferoxamin, eine von Bakterien produzierte, zu Bisucaberin strukturverwandte Verbindung (Abbildung 4B) mit einem sogar höheren pm(Fe^{III})-Wert, ergab keine Inhibition

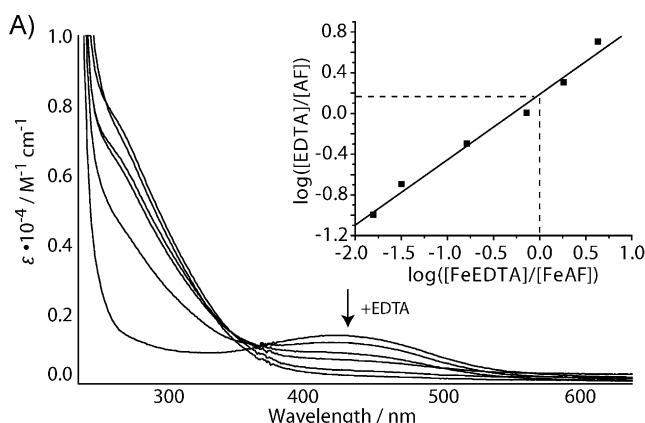


Abbildung 4. Komplexbildung mit Eisen(III)-Ionen. A) Spektralphotometrische Titration von Avaroferrin mit EDTA (Ethylenediethyltetraessigsäure) bei pH 7.4 mit $[Fe^{3+}] = [AF] = 0.1 \text{ mM}$. AF: Avaroferrin. Einschub: Graph für die Bestimmung von $\rho_m(Fe^{III})$. Der $\Delta\rho_m$ zu EDTA ist durch den Schnittpunkt mit der y-Achse gegeben. B) Struktur von Deferoxamin und C) Deferasirox.

des Schwarmverhaltens bei der höchsten getesteten Dosis (500 nmol) – einer 100fach höheren Dosis als die minimale Hemmdosis (MSID) von Avaroferrin (Tabelle S3). Diese Resultate sind nicht völlig unerwartet, da viele frühere Untersuchungen zeigten, dass *Vibrio* die Fähigkeit hat, Siderophore von anderen Spezies, die nicht selbst produziert werden, sogenannte Xenosiderophore, aufzunehmen, wie z.B. Deferoxamin durch *V. vulnificus*^[11] und *V. furnissii*^[12]. Der Siderophor Ferrichrom und der natürliche Chelatligand 2,3-Dihydroxybenzoësäure und Quercetin waren entweder inaktiv oder hatten nur sehr geringe Aktivität bei der Inhibition des Schwarmverhaltens (Tabelle S3, Abbildung S19). Der einzige Chelatligand mit vergleichbarer Aktivität war der synthetisch optimierte Eisen-Komplexbildner Deferasirox, der den gleichen MSID-Wert (5 nmol) wie Avaroferrin aufwies (Tabelle S3, Abbildung 4C).

Die Aktivität von Siderophoren und Chelatliganden korrelierte nicht mit ihrer Bindeaffinität für Eisen(III) (Tabelle S3), was folgern lässt, dass die Fähigkeit von *V. alginolyticus*, Siderophor-gebundenes Eisen auszubeuten, nicht jedoch die Stärke, mit der der Siderophor Eisen bindet, die Aktivität bei der Inhibition des Schwarmverhaltens bestimmt. Untersuchungen an Flüssigkulturen zeigten zudem, dass Avaroferrin zwar nicht die Lebensfähigkeit von *V. alginolyticus* bei Konzentrationen bis zu 1 mM beeinflusste, aber die Wachstumsrate bei Konzentrationen von über 100 μM verringert wurde, was darauf hinweist, dass Avaroferrin mit der Eisenaufnahme von *V. alginolyticus* interferiert (Abbildung S20). Die Genomanalyse von *V. alginolyticus* B522 ergab mindestens 20 verschiedene Proteine mit Homologie zu

bekannten Siderophor-Rezeptoren und anderen Eisen-Aufnahmee- und Eisen-Speicherproteinen, was sowohl die Eisen-abhängigkeit als auch die Fähigkeit, Eisen über Xenosiderophore aufzunehmen, bestätigt (Tabelle S4).

Warum Bakterien schwärmen ist noch immer großteils ein Rätsel, und Theorien greifen die gängigen Massenwanderungsthemen auf – Flucht vor negativen Umweltfaktoren und/oder Erkundung neuer, günstigerer Regionen. Es ist wahrscheinlich, dass Schwarmsignale, wie auch andere chemische Signale, in hohem Maße vom Kontext abhängig sind. So induziert Eisenmangel Schwärmen von *V. parahaemolyticus*,^[13] und andere Untersuchungen ergaben, dass Schwärmen mit der genetischen Hochregulierung des Eisenmetabolismus, der Siderophorproduktion und der Expression von Eisenaufnahmemechanismen in vielen Bakterien einhergeht.^[4c,14] Während Eisen eines der häufigsten Elemente der Erdkruste ist, liegt es hauptsächlich in seiner minimal-löslichen dreiwertigen Form vor. Bei neutralem pH-Wert beträgt die Löslichkeit von Eisen(III)-Ionen ca. 10^{-18} M .^[15] Bakteriell produzierte Siderophore können Eisen(III)-Ionen komplexieren und diese über spezialisierte Rezeptoren in die Zellen zurückführen.

Die meisten Bakterien haben Rezeptoren für Siderophore, die sie nicht selbst produzieren und die ihnen die Piraterie von Eisen (bzw. Siderophoren) ermöglichen. Bakterien befinden sich daher unter selektivem Druck, ständig neue Siderophore zu entwickeln die der Piraterie standhalten.

Die Fähigkeit, durch verschiedene Siderophor-Reperertoires um Eisen(III)-Ionen zu konkurrieren, könnte uns helfen, Strategien für die Behandlung bakterieller Infektionen zu entwickeln, wie es vor kurzem anhand des Stamms *Escherichia coli* Nissle gezeigt wurde, der das Pathogen *Salmonella* durch seine bessere Eisenaufnahme verdrängen kann.^[16]

Die vorliegende Studie zeigt, wie *S. algae* B516 Avaroferrin produziert, um die Eisen-Piraterie von *V. alginolyticus* B522 durch die leichte Abwandlung eines bekannten Strukturtyps zu unterbinden. Die Entdeckung von Avaroferrin gibt auch wichtige Aufschlüsse bezüglich dem Zusammenhang zwischen Eisen und Schwarmverhalten. Der Biosynthesekomplex für die Herstellung von Avaroferrin verbildlicht die entscheidenden Konsequenzen des modularen Aufbaus von Biosynthesewegen vieler kleiner Moleküle, die von Bakterien produziert werden: Sie erleichtern die evolutionäre Rekombination dieser Module, um neue Strukturen mit neuen Funktionen zu erschaffen.^[17]

Eingegangen am 10. Dezember 2013
Online veröffentlicht am 24. Februar 2014

Stichwörter: Eisen · Evolution · Motilität · Naturstoffe · Siderophore

- [1] D. B. Kearns, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 634–644.
- [2] L. McCarter, M. Silverman, *Mol. Microbiol.* **1990**, *4*, 1057–1062.
- [3] M. T. Butler, Q. Wang, R. M. Harshey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 3776–3781.
- [4] a) C. Allison, H. C. Lai, C. Hughes, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 1583–1591; b) C. Allison, L. Emody, N. Coleman, C. Hughes, J.

- Infect. Dis.* **1994**, *169*, 1155–1158; c) Q. Wang, J. G. Frye, M. McClelland, R. M. Harshey, *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 169–187; d) S. Macfarlane, M. J. Hopkins, G. T. Macfarlane, *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 1120–1126.
- [5] K. M. Ledyard, A. Butler, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2*, 93–97.
- [6] a) A. Takahashi, H. Nakamura, T. Kameyama, S. Kurashawa, H. Naganawa, Y. Okami, T. Takeuchi, H. Umezawa, Y. Iitaka, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1671–1676; b) G. Winkelmann, D. G. Schmid, G. Nicholson, G. Jung, D. J. Colquhoun, *Biometals* **2002**, *15*, 153–160.
- [7] a) N. Kadi, S. Arbache, L. Song, D. Oves-Costales, G. L. Challis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10458–10459; b) N. Kadi, L. Song, G. L. Challis, *Chem. Commun.* **2008**, 5119–5121.
- [8] M. J. Fujita, N. Kimura, H. Yokose, M. Otsuka, *Mol. BioSyst.* **2012**, *8*, 482–485.
- [9] R. J. Abergel, A. M. Zawadzka, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2124–2125.
- [10] Z. Hou, K. N. Raymond, B. O'Sullivan, T. W. Esker, T. Nishio, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 6630–6637.
- [11] C. M. Kim, Y. J. Park, S. H. Shin, *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 1537–1545.
- [12] T. Tanabe, T. Funahashi, K. Miyamoto, H. Tsujibo, S. Yamamoto, *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, *34*, 570–574.
- [13] L. McCarter, M. Silverman, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 731–736.
- [14] a) T. Inoue, R. Shingaki, S. Hirose, K. Waki, H. Mori, K. Fukui, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 950–957; b) J. Nogales, A. Dominguez-Ferreras, C. V. Amaya-Gomez, P. van Dillewijn, V. Cuellar, J. Sanjuan, J. Olivares, M. J. Soto, *BMC Genomics* **2010**, *11*, 157.
- [15] J. B. Neilands, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26723–26726.
- [16] E. Deriu, J. Z. Liu, M. Pezeshki, R. A. Edwards, R. J. Ochoa, H. Contreras, S. J. Libby, F. C. Fang, M. Raffatellu, *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 26–37.
- [17] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4601–4608.