

Tomasz BORUTA, Marcin BIZUKOJC, Stanisław LEDAKOWICZ

e-mail: tomaszboruta85@gmail.com

Katedra Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

## Bioinformatyczna analiza przewidywanego klastra genów biosyntezy (+)-geodyny u *Aspergillus terreus*

### Wstęp

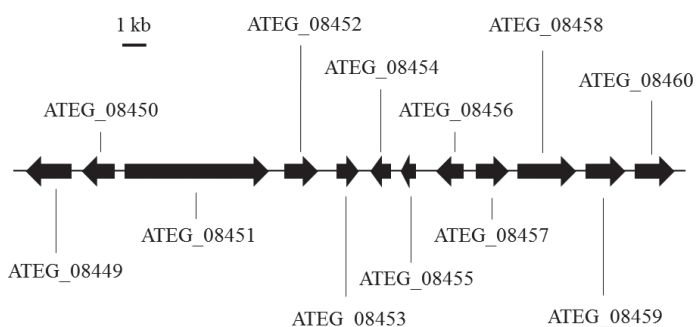
*Aspergillus terreus*, grzyb strzępkowy używany w przemyśle do produkcji lowastatyny i kwasu itakonowego, zdolny jest do biosyntezy związku poliketydowego o nazwie (+)-geodyna. Substancja ta wykazuje aktywność antybakteryjną, a jej potencjalne zastosowanie w medycynie było przedmiotem badań [Sato i in., 2005]. Szlak biosyntezy tego metabolitu nie jest jeszcze w pełni zbadany, a odpowiadający mu cluster genów nie został jeszcze scharakteryzowany.

W niniejszej pracy opisano użycie metod bioinformatyki do zidentyfikowania klastra biosyntezy (+)-geodyny oraz powiązania poszczególnych sekwencji z proponowanym szlakiem metabolicznym. Skorzystano z dostępnych w bazie danych UniProt wyników automatycznej wstępnej anotacji genomu *Aspergillus terreus* NIH2426 [The UniProt Consortium, 2012], gdzie każdemu przewidzianemu i poddanemu translacji genowi przypisana jest sekwencja aminokwasów, unikalny identyfikator zawierający oznaczenie organizmu (w tym przypadku „ATEG”) oraz numer. Liczba sekwencji wyodrębnionych z genomu *A. terreus* NIH2426 wynosi 10406.

### Anotacja funkcjonalna klastra

Granice przewidywanego klastra biosyntezy (+)-geodyny wyznaczono poprzez analizę sekwencji sąsiadujących z genem kodującym syntazę poliketydową (ATEG\_08451). Spodziewano się obecności otwartych ramek odczytu, które można by powiązać z etapami *post-PKS* szlaku metabolicznego prowadzącego od antronu emodyny do (+)-geodyny [Chen i in., 1995]. W genie ATEG\_08448 odnaleziono domeny typowe dla syntazy peptydów nierybosomalnych (NRPS), co wskazuje na obecność innego klastra metabolizmu wtórnego w bezpośrednim sąsiedztwie klastra (+)-geodyny.

Kolejne sekwencje od ATEG\_08461 do ATEG\_08470 nie zostały powiązane z żadną funkcją. Przyjęto zatem, że granice hipotetycznego klastra (+)-geodyny wyznaczone są przez ATEG\_08449 i ATEG\_08460 (Rys. 1).



Rys. 1. Przewidywany cluster genów biosyntezy (+)-geodyny wyodrębniony z genomu *Aspergillus terreus* NIH2426. Cluster zawiera dwanaście otwartych ramek odczytu (kolejno od ATEG\_08449 do ATEG\_08460). Strzałki wskazują kierunek transkrypcji. Długość strzałki jest proporcjonalna do długości genu. 1 kb oznacza tysiąc par zasad (kilo base pairs)

Prawdopodobne funkcje poszczególnych produktów klastra zostały ustalone na podstawie stwierdzonego podobieństwa do białkowych sekwencji, które zdeponowano w bazach danych i które były przedmiotem weryfikacji eksperymentalnej. Odrzucono podobieństwo do produktów czysto hipotetycznych. W analizie nie uwzględniono należącej do klastra syntazy poliketydowej (ATEG\_08451) oraz tioesterazy

(ATEG\_08450), które zostały już wcześniej scharakteryzowane [Awakawa i in., 2009]. Do przeprowadzenia analizy podobieństwa sekwencji użyto program BLASTP [Altschul i in., 1997]. Wyniki przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Wyniki badania podobieństwa sekwencji dla przewidywanego klastra biosyntezy (+)-geodyny u *Aspergillus terreus* NIH2426. Sekwencje porównano przy użyciu programu BLASTP [Altschul i in., 1997]. Zachowano oryginalne nazwy sekwencji. W nawiasach podano nazwy organizmów źródłowych

Szukana sekwencja	Sekwencja podobna	Identyczność/ Podobieństwo [%]	Wartość <i>E</i>
ATEG_08449	Sterigmatocystin 8- <i>O</i> -methyltransferase ( <i>Aspergillus flavus</i> )	28/43	4·10 <sup>-25</sup>
ATEG_08452	AFLJ protein ( <i>Aspergillus parasiticus</i> )	37/54	1·10 <sup>-53</sup>
ATEG_08453	Sterigmatocystin biosynthesis regulatory protein ( <i>Aspergillus nidulans</i> )	59/83	7·10 <sup>-12</sup>
ATEG_08454	Glutathione S-transferase 1 ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )	42/57	5·10 <sup>-45</sup>
ATEG_08455	AflX/ ordB/ monooxygenase/ oxidase ( <i>Aspergillus flavus</i> )	44/62	6·10 <sup>-33</sup>
ATEG_08456	Trans-aconitate 3-methyltransferase ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	26/45	2·10 <sup>-4</sup>
ATEG_08458	Dihydrogeodin oxidase ( <i>Aspergillus terreus</i> )	99/99	0.0
ATEG_08459	HypA ( <i>Aspergillus flavus</i> )	35/52	8·10 <sup>-70</sup>
ATEG_08460	Gsfl ( <i>Penicillium aethiopicum</i> )	48/65	5·10 <sup>-143</sup>

Sekwencje należące do klastra zostały również przeanalizowane pod kątem obecności konserwatywnych domen i motywów białkowych (Tab. 2).

Tab. 2. Domeny konserwatywne w sekwencjach przewidywanego klastra biosyntezy (+)-geodyny u *Aspergillus terreus* NIH2426. Sekwencje porównano przy użyciu programu BLASTP [Altschul i in., 1997]. Podano również identyfikatory domen użyte w bazie danych CDD [Marchler-Bauer i in., 2011]

Szukana sekwencja	Domeny konserwatywne
ATEG_08449	pfam00891: <i>O</i> -methyltransferase ( <i>O</i> -metylotransferaza)
ATEG_08453	cd00067: GAL4-like Zn2Cys6 binuclear cluster DNA-binding domain (domena białka regulatorowego GAL4)
ATEG_08454	cd03048: GST_N_Ure2p_like, cd10293: GST_C_Ure2p (domeny S-transferazy glutationowej)
ATEG_08455	cl09931: NADB_Rossmann (zwinięcie Rossmanna, domena wiążąca NAD(P)+/NAD(P)H)
ATEG_08456	cd02440: AdoMet_MTases (metylotransferaza)
ATEG_08457	cl15807: Dabb, Stress responsive A/B barrel domain (domena mająca związek z odpowiedzią na stres)
ATEG_08458	pfam00394: Cu-oxidase, pfam07731: Cu-oxidase_2, pfam07732: Cu-oxidase_3 (domeny oksydazy zawierającej atomy miedzi)
ATEG_08460	pfam04820: Trp_halogenase (halogenaza tryptofanu), cl09931: NADB_Rossmann (zwinięcie Rossmanna, domena wiążąca NAD(P)+/NAD(P)H)

Stwierdzenie obecności sekwencji charakterystycznych dla dobrze zbadanych i opisanych domen pozwala na sformułowanie hipotez do-

tyczących przewidywanych funkcji białek kodowanych przez analizowane geny.

Sekwencje ATEG\_08449 i ATEG\_08456 zawierają sekwencje domen białkowych świadczące o ich przynależności do metylotransferaz. ATEG\_08449 koduje białko podobne do *O*-metylotransferazy odpowiedzialnej za jeden z etapów biosyntezy sterigmatocystyny u *Aspergillus flavus*, natomiast ATEG\_08456 wykazuje podobieństwo do drożdżowej 3-metylotransferazy *trans*-akonitanu.

ATEG\_08454 jest sekwencją S-transferazy glutationowej. Enzymy tego typu biorą udział w detoksyfikacji komórek [Sato *i in.*, 2009]. Nie można wykluczyć, że S-transferaza glutationowa pełni rolę ochronną i modyfikuje cząsteczki powstałe w wyniku aktywności klastra, aby nie stanowiły zagrożenia dla samego producenta.

Dwie sekwencje odpowiadają białkom regulującym proces transkrypcji. Pierwsza z nich, ATEG\_08453, zawiera motyw typowy dla regulatora GAL4. Podobne białko reguluje biosyntezę sterigmatocystyny u *Aspergillus nidulans*. Druga sekwencja regulująca, ATEG\_08452, wykazuje podobieństwo do AFLJ, białka wpływającego na produkcję aflatoksyny u *Aspergillus parasiticus* poprzez oddziaływanie z GAL4 [Chang, 2003]. Można więc przypuszczać, że te dwa białka regulują wspólnie transkrypcję genów klastra (+)-geodyny podobnie, jak ma to miejsce w przypadku biosyntezy aflatoksyny.

Otwarta ramka odczytu ATEG\_08458 koduje oksydazę dihydrogeodyny (DHGO). Gen został wyizolowany z *A. terreus* i scharakteryzowany [Huang *i in.*, 1995] zanim dokonano sekwencjonowania genomu tego organizmu. Uzyskana eksperymentalnie sekwencja została zdeponowana w bazach danych i jest ona w 99% identyczna do tej przewidywanej na drodze elektronicznej anotacji. Zgodnie z danymi literaturowymi dotyczącymi DHGO, obecne są w sekwencji domeny oksydazy zawierającej atomy miedzi.

ATEG\_08455 zawiera tzw. zwinienie *Rossmanna* (*Rossmann fold*). Jest to motyw strukturalny domeny wiążącej NAD<sup>+</sup>/NADH lub NADP<sup>+</sup>/NADPH, czyli kofaktory uczestniczące w enzymatycznych reakcjach utleniania i redukcji. Sekwencja wykazuje również podobieństwo do AfIX, oksydoreduktazy uczestniczącej w biosyntezie aflatoksyny u *A. flavus* [Cary *i in.*, 2006]. Drugą przewidywaną sekwencją mogącą pełnić podobną funkcję jest ATEG\_08459. W tym przypadku nie stwierdzono obecności domen wiążących kofaktory, jednak istnieje podobieństwo do oksydazy HypA, która uczestniczy w tworzeniu aflatoksyny [Ehrlich *i in.*, 2005].

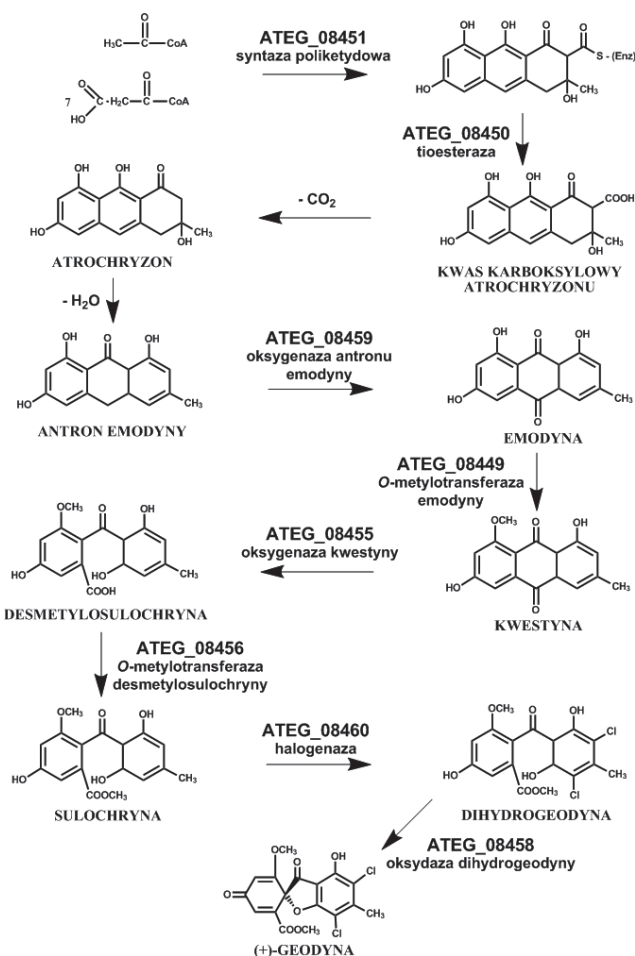
W sekwencji ATEG\_08460 rozpoznano domeny charakterystyczne dla halogenazy tryptofanu. Obecne jest również wspomniane wcześniej zwinienie *Rossmanna*, ponieważ halogenaza tego typu zależna jest od NAD<sup>+</sup>/NADH [van Pee *i Patallo*, 2006]. Stwierdzono również podobieństwo do halogenazy GsfI, która odpowiada za jeden z etapów biosyntezy grzyeofulwiny u *Penicillium aethiopicum* [Chooi *i in.*, 2010].

ATEG\_08457 jest jedyną otwartą ramką odczytu obecną w klastrze, której nie udało się powiązać z żadną przewidywaną funkcją. Odnaleziono fragmenty domeny mającej pewien związek z odpowiedzią na stres komórkowy, jednak funkcja samej domeny nie jest jeszcze znana.

### Powiązanie anotacji klastra ze szlakiem biosyntezy (+)-geodyny

Wyniki elektronicznej anotacji klastra można powiązać z proponowanym szlakiem biosyntezy (+)-geodyny. Zgodnie z obecną wiedzą, powstały w wyniku aktywności syntazy poliketydowej (ATEG\_08451) związek jest uwalniany z enzymu przez tioesterazę kodowaną przez ATEG\_08450 i dekarboksylowany do atrochryzonu (ang. *atrochryson*). Dehydratacja atrochryzonu prowadzi do utworzenia antronu emodyny [Awakawa *i in.*, 2009]. Proponowany szlak modyfikacji antronu emodyny prowadzący do (+)-geodyny zawiera dwie reakcje związane z aktywnością metylotransferaz, dwa etapy katalizowane przez oksygenazy, reakcję wymagającą udziału oksydazy dihydrogeodyny oraz jedną reakcję chlorowania pierścienia aromatycznego [Chen *i in.*, 1995].

W przypadku oksydazy dihydrogeodyny, można automatycznie powiązać sekwencję ATEG\_08458 z reakcją utleniania dihydrogeodyny do (+)-geodyny (Rys. 2).



Rys. 2. Proponowany szlak biosyntezy (+)-geodyny u *Aspergillus terreus*. Sekwencje kodujące zostały przypisane do poszczególnych reakcji metabolicznych. Syntaza poliketydowa ATEG\_08451 oraz tioesteraza ATEG\_08450 odpowiedzialne są za biosyntezę kwasu karboksylowego atrochryzonu [Awakawa *i in.*, 2006]. Szlak metaboliczny od antronu emodyny do (+)-geodyny obejmuje sześć reakcji enzymatycznych [Chen *i in.*, 1995]

Dwie oksygenazy biorące udział w szlaku, oksygenaza antronu emodyny oraz oksygenaza kwestyny, były przedmiotem badań, jednak ich sekwencja jest nieznana. W tym przypadku powiązanie konkretnej sekwencji klastra z reakcją metaboliczną musi być oparte na dostępnych danych biochemicznych.

Oksygenaza antronu emodyny odpowiada za utlenienie antronu emodyny do emodyny. Jest enzymem niezależnym od działania NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H, prawdopodobnie wykorzystującym jony żelaza. W analizie SDS-PAGE widoczny jest jako prążek na wysokości około 50 kDa [Chen *i in.*, 1995]. Spośród dwóch potencjalnych oksygenaz w klastrze, ATEG\_08455 i ATEG\_08459, tylko ATEG\_08459 może być uważana za potencjalną oksygenazę antronu emodyny. Świadczy o tym brak w jej sekwencji domen odpowiedzialnych za wiązanie NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H. Zawiera natomiast fragment bogaty w blisko ułożone obok siebie w strukturze pierwszorzędowej reszty histydyny (H<sub>32</sub>LLQTNH-DEHHMFWRPVAGHN HLTH<sub>56</sub>). Fragmenty tego typu można spotkać w metalooksygenazach oddziałujących na pierścien aromatyczny [Ehrlich *i in.*, 2005]. Dodatkowym argumentem pozwalającym przypisać funkcję oksygenazy antronu emodyny do ATEG\_08459 jest zbliżona masa cząsteczkowa. Dla ATEG\_08459 wynosi ona 49,3 kDa i została obliczona na podstawie sekwencji aminokwasów.

W przypadku oksygenazy kwestyny, odpowiadającej za utlenienie kwestyny do desmetylosulochryny, masa cząsteczkowa nie była zbadana eksperymentalnie, ale stwierdzono zależność enzymu od NADPH [Fujii *i in.*, 1988]. Należący do klastra gen potencjalnej oksydoreduktazy, ATEG\_08455, spełnia to kryterium, ponieważ zawiera sekwencję charakterystyczną dla zwinienia *Rossmanna*, motywu strukturalnego wiążącego NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H.

Dwa etapy biosyntezy (+)-geodiny oparte są na działaniu metylotransferaz (Rys. 2). Brak jest jakichkolwiek danych eksperymentalnych dotyczących *O*-metylotransferazy desmetylosulochryny, natomiast wyizolowano i oczyszczono *O*-metylotransferazę emodyny. Ustalono na drodze filtracji żelowej i elektroforezy w warunkach denaturujących, że enzym ten jest homoheksamerem, a więc zbudowany jest z sześciu jednakowych podjednostek. Masę podjednostki oszacowano na 53,6 kDa [Chen i in., 1992]. Jest to wartość bardzo zbliżona do masy cząsteczkowej obliczonej dla sekwencji potencjalnej *O*-metylotransferazy ATEG\_08449 równej 53,9 kDa. Można przypuszczać, że kodowane przez gen ATEG\_08449 białko tworzy wspomniany wcześniej heksamer zdolny do metylacji emodyny, natomiast druga sekwencja metylotransferazy obecna w klastrze, ATEG\_08456, odpowiada za przekształcenie desmetylosulochryny w sulochrynę.

Ostatni etap biosyntezy (+)-geodiny to przyłączenie dwóch atomów chloru do pierścienia aromatycznego. Jest bardzo prawdopodobne, że enzymem odpowiedzialnym za chlorowanie pierścienia jest halogenaza kodowana przez ATEG\_08460. Sekwencja ta jest w 48% identyczna do obecnej w klastrze biosyntezy grzyeofulwiny sekwencji GsfI, która u *Penicillium aethiopicum* katalizuje podobną reakcję [Chooi i in., 2010]. Jest to istotna informacja, ponieważ grzyeofulwina jest związkiem podobnym strukturalnie do (+)-geodiny i można spodziewać się podobieństwa na poziomie sekwencji.

Klaster biosyntezy grzyeofulwiny zawiera również inne sekwencje o znacznym stopniu podobieństwa do sekwencji klastra (+)-geodiny. Możemy zaobserwować, że syntaza poliketydowa GsfA, białko regulujące transkrypcję genów GsfR2 oraz trzy metylotransferazy mają swoich odpowiedników u *A. terreus* (Tab. 3).

Tab. 3. Porównanie sekwencji klastra (+)-geodiny u *Aspergillus terreus* i sekwencji klastrow grzyeofulwiny i wirydykatoksyny u *Penicillium aethiopicum*. W tabeli zaprezentowane są sekwencje, dla których stopień identyczności przekracza 25%, a wartość oczekiwana *E* jest niższa niż  $10^{-3}$

Szukana sekwencja	Sekwencja z klastra biosyntezy (procent identyczności)		Przewidywana funkcja
	grzyeofulwina	wirydykatoksyna	
ATEG_08449	GsfD (27%) GsfB (28%) GsfC (28%)	–	<i>O</i> -metylotransferaza
ATEG_08450	–	VrtG (50%)	tioesteraza
ATEG_08451	GsfA (43%)	VrtA (46%)	syntaza poliketydowa
ATEG_08453	GsfR2 (42%)	VrtR1 (39%)	białko regulatorowe

Klaster związany z biosyntezą innego związku poliketydowego, wirydykatoksyny (ang. *viridicatumtoxin*) również może być ewolucyjnie powiązany z klastrem (+)-geodiny. Syntaza poliketydowa, jak i białko regulatorowe, są w znacznym stopniu podobne (Tab. 3). Należy zwrócić uwagę na 50% identyczności w sekwencji tioesterazy, co może wskazywać na podobny mechanizm uwalniania produktu od syntazy poliketydowej w przypadku obu związków. Potwierdza to w pewnym stopniu hipotezę dotyczącą udziału tioesterazy w uwalnianiu prekursora wirydykatoksyny [Chooi i in., 2010].

## Wnioski

Analiza sekwencji sąsiadujących z genem syntazy kwasu karboksylowego atochryzonu pozwoliła zidentyfikować hipotetyczny klaster genów odpowiedzialnych za biosyntezę (+)-geodiny u *A. terreus* NIH 2426. Stwierdzono podobieństwo do innych klastrow metabolizmu wtórnego, co wskazuje na pokrewieństwo ewolucyjne tychże klastrow lub ich fragmentów.

Niniejsza praca pokazuje, że narzędzia bioinformatyki dostarczają istotnych wskazówek dla badaczy zajmujących się charakteryzowaniem szlaków metabolicznych. Poprzez porównanie sekwencji można formułować hipotezy dotyczące funkcji badanych białek. Należy jednak podkreślić, że metabolizm wtórny jest stosunkowo słabo poznany i często brak jest w bazach danych zweryfikowanych eksperymentalnie sekwencji, do których można by porównać odkryte geny. Przykładem niech będzie tutaj ATEG\_08457, u której nie odnaleziono podobieństwa do żadnej funkcjonalnie opisanej sekwencji. W niektórych przypadkach

brak eksperymentalnych danych dotyczących danego enzymu uniemożliwiłby powiązanie genów z daną reakcją metaboliczną. Co więcej, analiza *in silico* nie pozwoliła wykluczyć uczestnictwa w biosyntezie (+)-geodiny enzymu kodowanego przez gen leżący poza klastrem. Optymalne efekty daje zatem łączenie metod komputerowych i eksperymentalnych, które razem pozwalają na jednoznaczne zdefiniowanie etapów szlaku metabolicznego i opisanie każdego genu związanego z tymże szlakiem.

## LITERATURA

- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, nr 17, 3389-3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389
- Awakawa T., Yokota K., Funa N., Doi F., Mori N., Watanabe H., Horinouchi S., 2009. Physically discrete beta-lactamase-type thioesterase catalyzes product release in atrochryson synthesis by iterative type I polyketide synthase. *Chemistry & Biology*, 16, nr 6, 613-623. DOI:10.1016/j.chembiol.2009.04.004
- Cary J.W., Ehrlich K.C., Bland J.M., Montalbano B.G., 2006. The aflatoxin biosynthesis cluster gene, *aflX*, encodes an oxidoreductase involved in conversion of versicolorin A to demethylsterigmatocystin. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, nr 2, 1096-1101. DOI:10.1128/AEM.72.2.1096-1101.2006
- Chang P.K., 2003. The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. *Molecular Genetics and Genomics*, 268, nr 6, 711-719. DOI: 10.1007/s00438-003-0809-3
- Chen Z.G., Fujii I., Ebizuka Y., Sankawa U., 1992. Emodin *O*-methyltransferase from *Aspergillus terreus*. *Archives of Microbiology*, 158, nr 1, 29-34. DOI: 10.1007/BF00249062
- Chen Z.G., Fujii I., Ebizuka Y., Sankawa U., 1995. Purification and characterization of emodinanthrone oxygenase from *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry*, 38, nr 2, 299-305. DOI: 10.1016/0031-9422(94)00543-3
- Chooi Y.H., Cacho R., Tang Y., 2010. Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. *Chemistry & Biology*, 17, nr 5, 483-494. DOI 10.1016/j.chembiol.2010.03.015
- Ehrlich K.C., Montalbano B., Boue S.M., Bhatnagar D., 2005. An aflatoxin biosynthesis cluster gene encodes a novel oxidase required for conversion of versicolorin A to sterigmatocystin. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, nr 12, 8963-8965. DOI:10.1128/AEM.71.12.8963-8965.2005
- Fujii I., Ebizuka Y., Sankawa U., 1988. A novel anthraquinone ring cleavage enzyme from *Aspergillus terreus*. *Journal of Biochemistry*, 103, nr 5, 878-883.
- Huang K.X., Fujii I., Ebizuka Y., Gomi K., Sankawa U., 1995. Molecular cloning and heterologous expression of the gene encoding dihydrogeodin oxidase, a multicopper blue enzyme from *Aspergillus terreus*. *Journal of Biological Chemistry*, 270, nr 37, 21495-21502. DOI: 10.1074/jbc.270.37.21495
- Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J.B., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Deweese-Scott C., Fong J.H., Geer L.Y., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Lu F., Marchler G.H., Mullokkandov M., Omelchenko M.V., Robertson C.L., Song J.S., Thanki N., Yamashita R.A., Zhang D., Zhang N., Zheng C., Bryant S.H., 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39, suppl 1, D225-D229. DOI: 10.1093/nar/gkq1189
- Sato I., Shimizu M., Hoshino T., Takaya N., 2009. The glutathione system of *Aspergillus nidulans* involves a fungus-specific glutathione S-transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 284, nr 12, 8042-8053. DOI: 10.1074/jbc.M80771200
- Sato S., Okusa N., Ogawa A., Ikenoue T., Seki T., Tsuji T., 2005. Identification and preliminary SAR studies of (+)-geodin as a glucose uptake stimulator for rat adipocytes. *Journal of Antibiotics*, 58, nr 9, 583-589. DOI:10.1038/ja.2005.79
- The UniProt Consortium, 2012. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 40, D1, D71-D75. DOI:10.1093/nar/gkr981
- van Pee K.H., Patallo E.P., 2006. Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, nr 6, 631-641. DOI: 10.1007/s00253-005-0232-2