

Πρωτεϊνική Μηχανική

Παραδείγματα πρωτεϊνικής μηχανικής από τη βιβλιογραφία

Ιωάννης Παυλίδης
Τμήμα Χημείας | Πανεπιστήμιο Κρήτης

E-mail: ipavlidis@uoc.gr

Τηλ.: +30 2810 54-5130 | Γραφείο Γ211

ΕΠΙΣΗΜΗ ΣΕΛΙΔΑ: [HTTP://WWW.CHEMISTRY.UOC.GR/PAVLIDIS/](http://www.chemistry.uoc.gr/pavlidis/)

Ινσουλίνη

- ❖ Σημαντική πρωτεΐνη του μεταβολισμού
- ❖ *Diabetes mellitus*
- ❖ Τύπου I: Δεν παράγεται καθόλου ινσουλίνη
γενετικό υπόβαθρο, ιογενής, ή αυτοάνοσο
- ❖ Τύπου II: Μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης ή πλήρης έλλειψη
Συνήθης στο σύγχρονο πολιτισμό, λόγω έλλειψης άσκησης και κακής διατροφής
- ❖ Στατιστικά:
- ❖ 2014: 422 εκ. άνθρωποι πάσχουν από διαβήτη - περίπου 90 % τύπου II

Ινσουλίνη

1921: Ο Banding και ο Best ανακάλυψαν την ινσουλίνη (στο γκρουπ του J. Macleod)

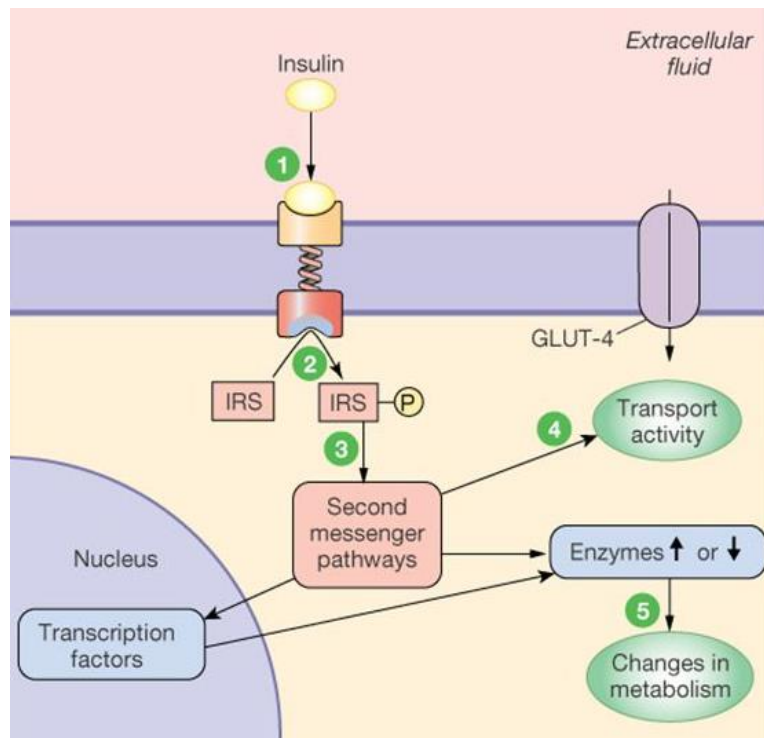
1923: Πρώτη δοκιμή σε διαβητικό (εφαρμογή από το 1928)



Frederick Banding



Charles Best



1 Insulin binds to tyrosine kinase receptor.

2 Receptor phosphorylates insulin-receptor substrates (IRS).

3 Second messenger pathways alter protein synthesis and existing proteins.

4 Membrane transport is modified.

5 Cell metabolism is changed.

Σύνθεση γλυκογόνου

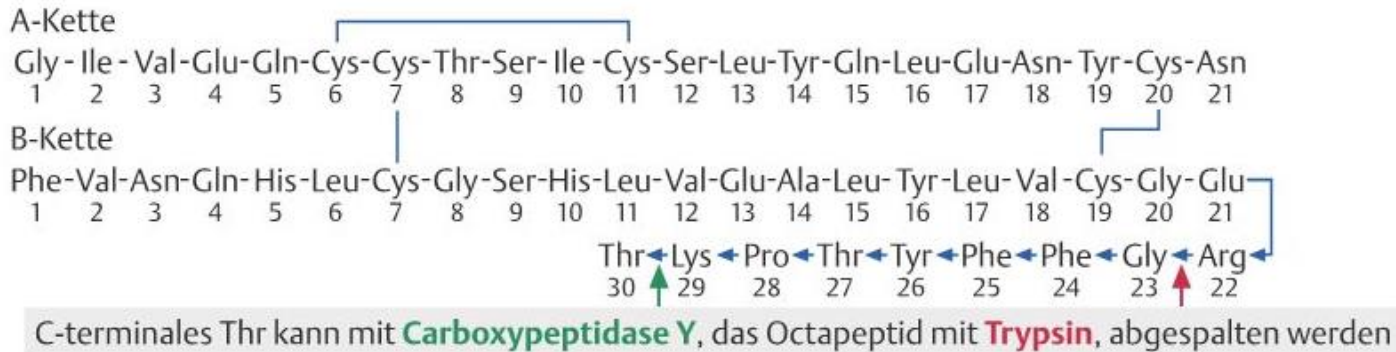
Γλυκόλυση

Ρύθμιση λιπολυτικών μονοπατιών

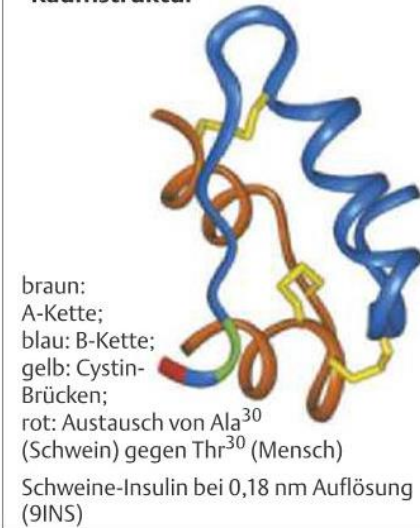
Παραγωγή τριγλυκεριδίων

Ινσουλίνη

Primärstruktur von Humaninsulin



Raumstruktur



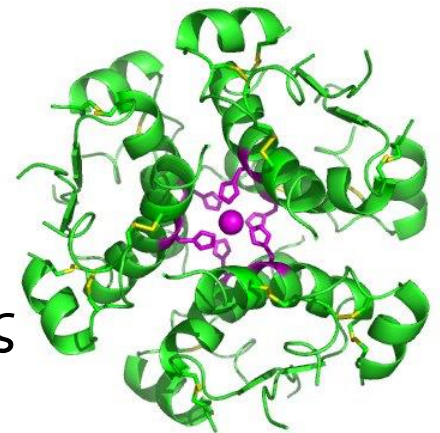
Η ινσουλίνη βρίσκεται ως μονο-, δι- και εξαμερές.

pH, ιοντική κατάσταση και συγκέντρωση επιρεάζουν την κατάσταση στην οποία βρίσκεται

Παράγεται στο πάγκρεας ως εξαμερές

Πρώτες εφαρμογές με ινσουλίνη από χοίρους και αγελάδες

Παρόμοια δράση, αλλά πιθανότητα ανοσοαπόκρισης



Βιοσύνθεση ινσουλίνης

β-κύτταρα στο πάγκρεας

Έκκριση στο ενδοπλασματικό

δίκτυο μέσω αναγνώρισης πεπτιδίου σήμανσης (24 AA)

Προϊνσουλίνη αποθηκεύεται στο σύμπλεγμα Golgi

Όταν κοπεί η C-αλυσίδα έχουμε την
ώριμη ινσουλίνη

Δύσκολο προϊόν για να παραχθεί άμεσα στα βακτήρια

Παγκόσμια απαίτηση: 5-6 τόνοι/χρόνο

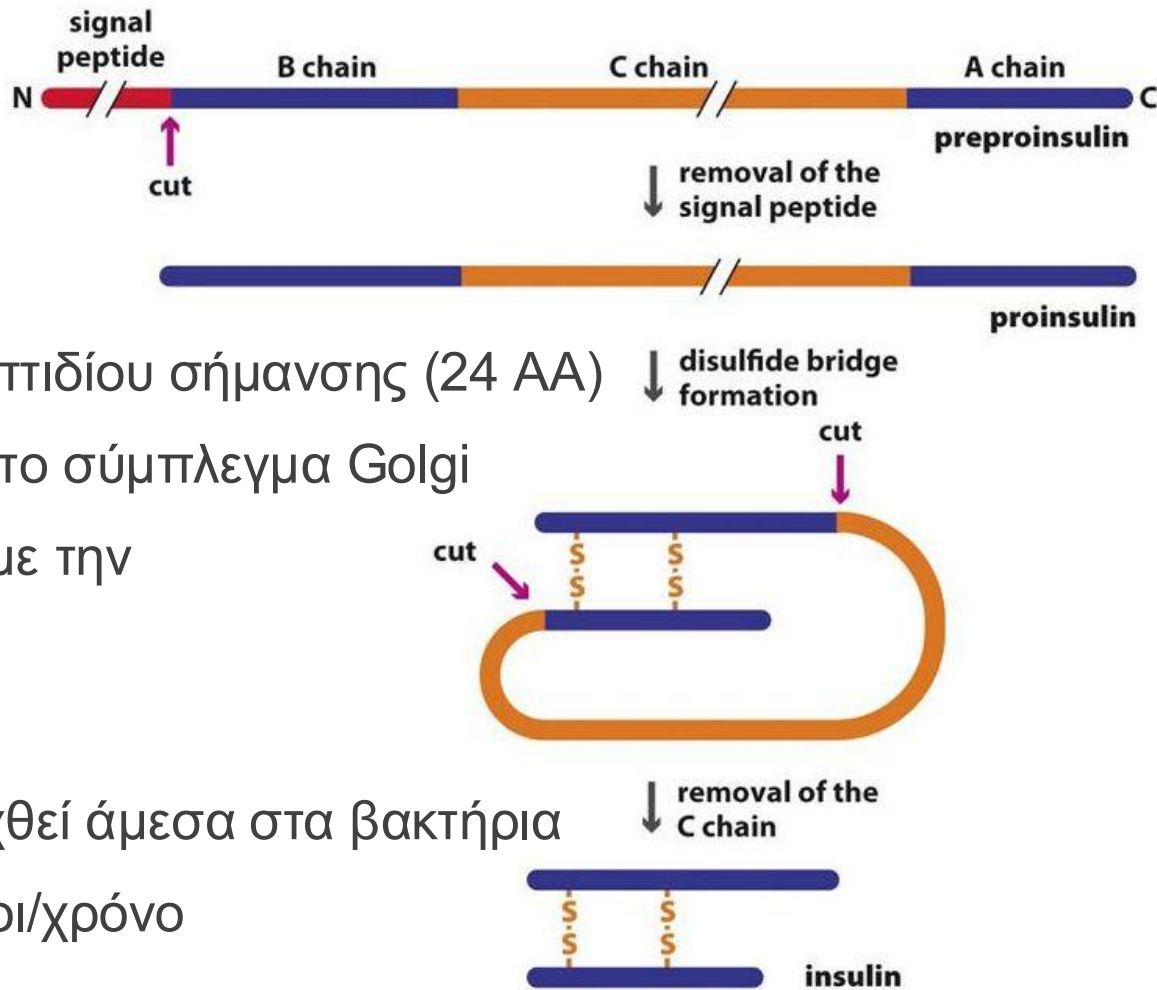
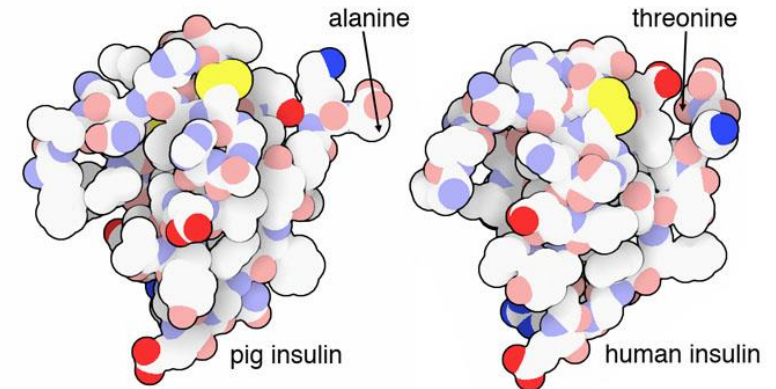
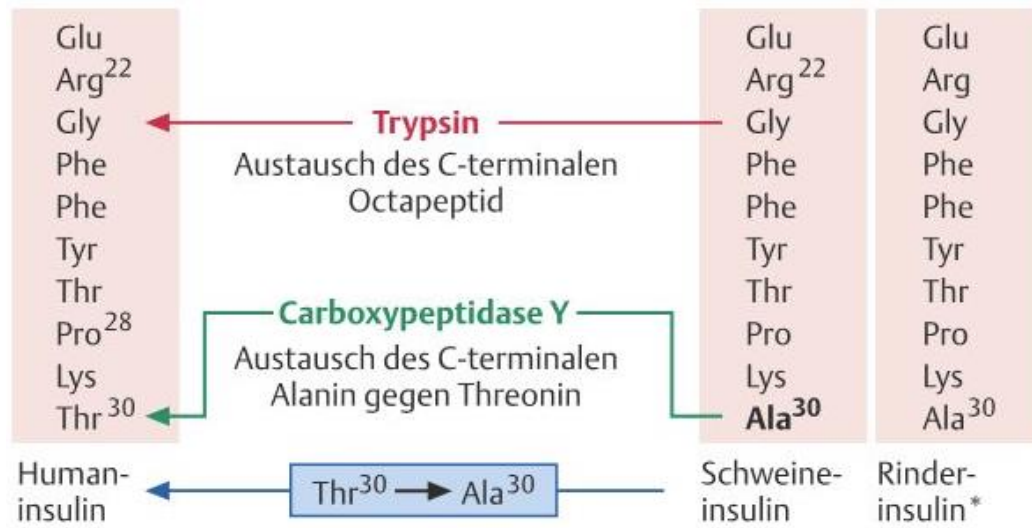


Figure 8.24 Introduction to Genetics (© Garland Science 2012)

1^η μέθοδος



*zusätzlicher Austausch von 2 Aminosäuren in der A-Kette

Η βόεια ινσουλίνη είναι πιο δύσκολη να μετατραπεί

Μεγαλύτερη διαθεσιμότητα χοιρινής ινσουλίνης

1) Πέψη με θρυψίνη

2) Μετεστεροποίηση με καρβοξυλπεπτιδάση Υ σε 55% DMF με βουτυλεστέρα θρεονίνης

2nd μέθοδος

Lilly

Απαίτηση γενετικής μηχανικής

Ξεχωριστή έκφραση των αλυσίδων A και B

Βελτιστοποιημένα κωδικόνια για έκφραση σε *E. coli*

Έκφραση ως πρωτεΐνη fusion

Χημική αφαίρεση “ξένων αμινοξέων” (CNBr)

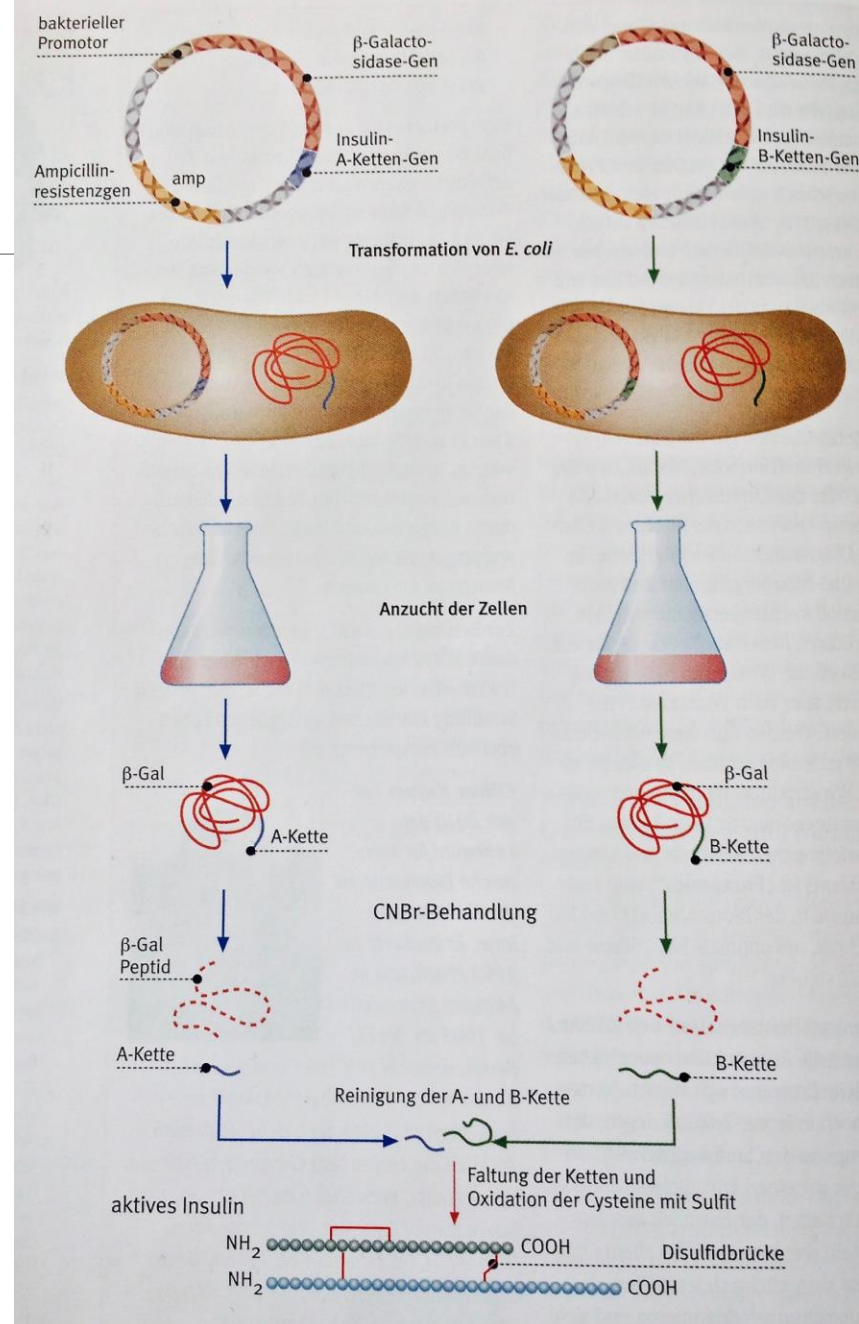
Οξειδωτική λύση δισουλφιδικών

Ανάμειξη των αλυσίδων

Δισουλφιδικοί δεσμοί (O_2 , pH 10.6)

Προκλήσεις:

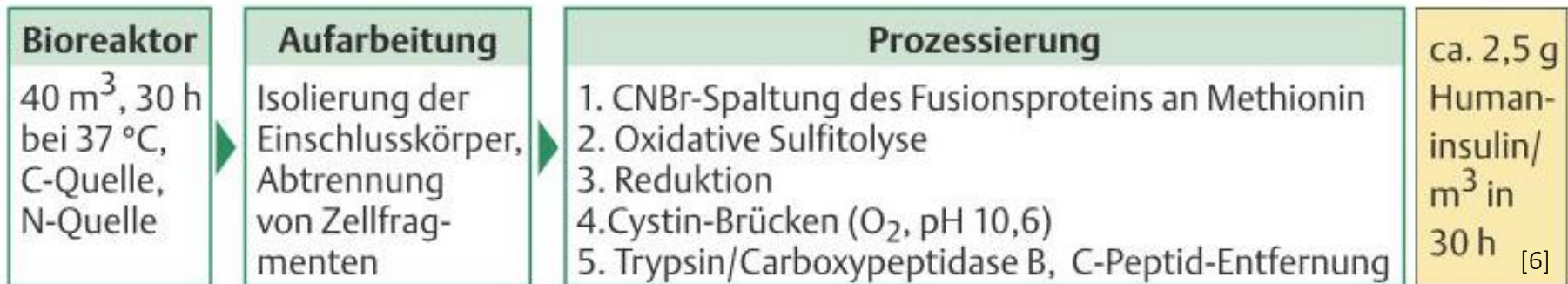
- Λάθος δισουλφιδικοί δεσμοί
- Ελάχιστη ενεργή ινσουλίνη



3rd μέθοδος



1. Έκφραση προΐνσουλίνης (B-C-A) σε *E. coli* (παραγωγή ως συσσωματώματα πρωτεϊνών - *inclusion bodies*)
 2. Οξειδωτική λύση δισουλφιδικών δεσμών
 3. Οξείδωση με οξυγόνο σε pH 10.6
 4. Δημιουργούνται σωστοί δεσμοί καθώς η προΐνσουλίνη έχει σωστή δομή
 5. Αφαίρεση της αλυσίδας C με καρβοξυλπεπτιδάση B και θρυψίνη.
- ❖ **Πλεονέκτημα:** Υψηλή απόδοση, καθαρό προϊόν



4th μέθοδος



Έκφραση μίας “μίνι” προϊνσουλίνης σε *S. cerevisiae* (η αλυσίδα C μόνο 3 AA)

Πεπτίδιο για έκκριση

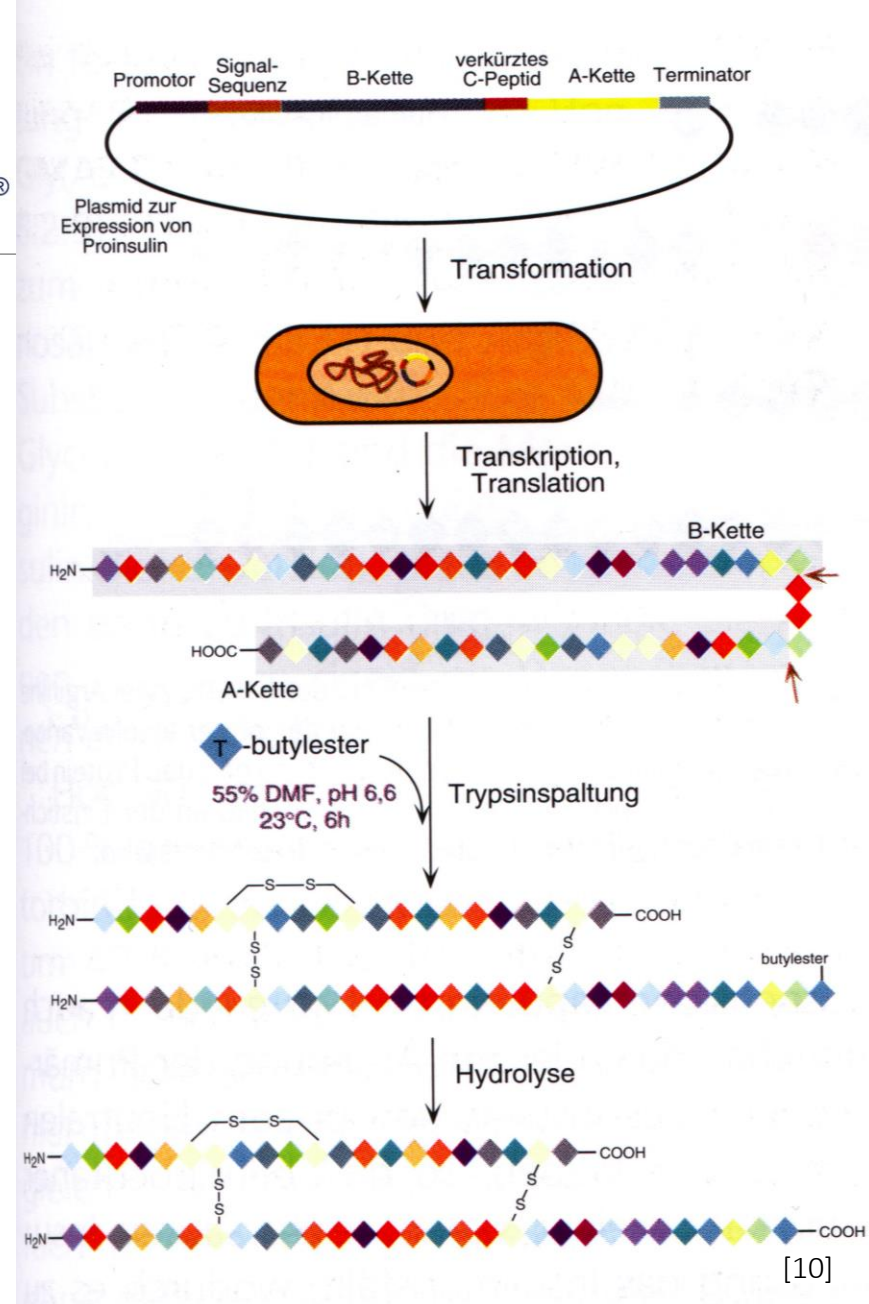
Βελτιστοποίηση κωδικονίων για έκφραση σε ζύμη

Πέψη με θρυψίνη

Προσθήκη με την θρυψίνη της Thr

Πλεονεκτήματα:

- Οι πρωτεάσες ζυμών δε κόβουν το πεπτίδιο
- Η ζύμη μπορεί να κάνει δισουλφιδικούς δεσμούς
- Η έκκριση βοηθά τον καθαρισμό



Παράγωγα ινσουλίνης

Στόχος: παράγωγα ινσουλίνης με διαφορετικό προφίλ ενεργότητας
Οι διαβητικοί έχουν διαφορετικές ανάγκες

Ινσουλίνη αργής δράσης:

Καθίζηση με ψευδάργυρο ή πρωταμίνη

Αλλαγή της αλληλουχίας σε $pl=7$ (ινσουλίνη φυσικού τύπου $pl=5.5$)

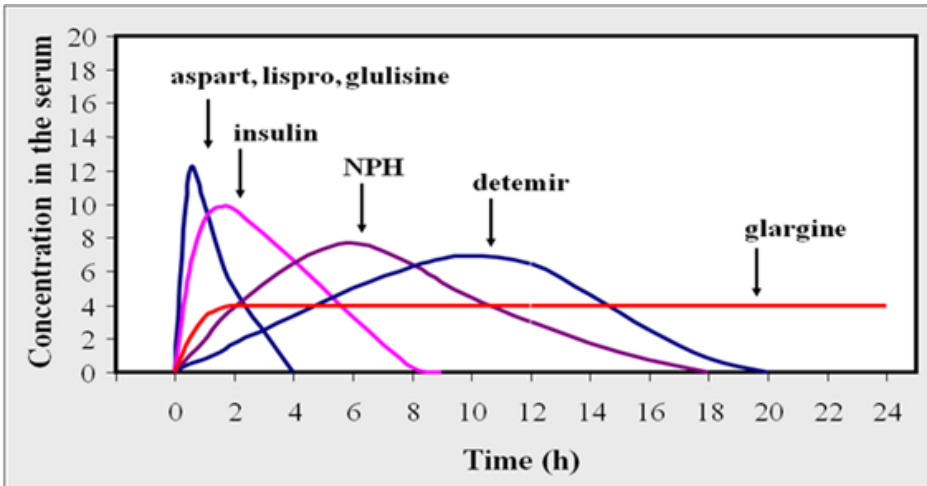
Αλλαγή της ινσουλίνης για μείωση της διαλυτότητας

Ινσουλίνη γρήγορης δράσης:

Lispro από Lilly; Aspart από Novo

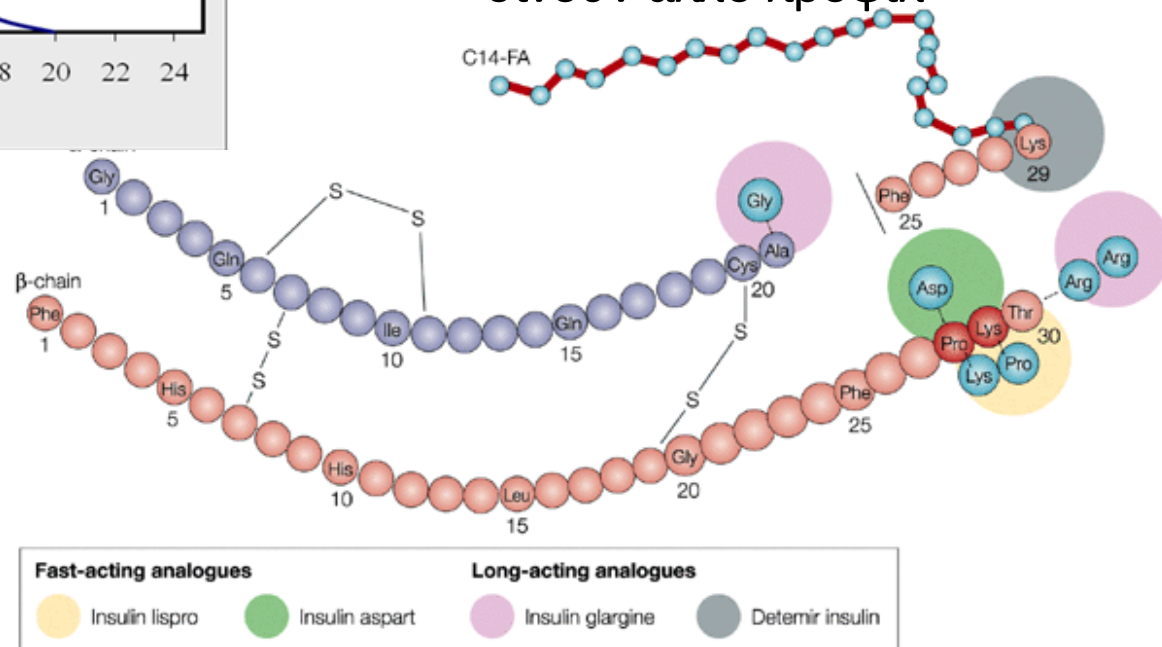
Αλλαγές στην αλληλουχία μειώνουν την πιθανότητα των διμερών και εξαμερών

Παράγωγα ινσουλίνης



Συγκεκριμένες θέσεις επηρεάζουν τον διμερισμό

Διαφορετικές μεταλλάξεις στην ίδια θέση δίνουν άλλο προφίλ



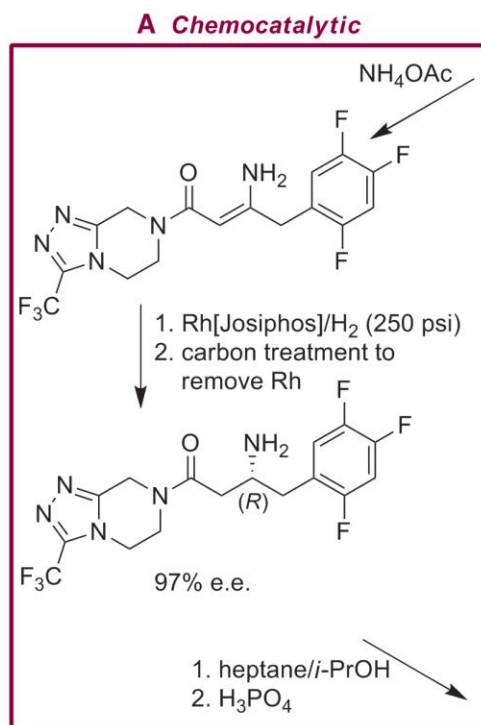
Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture

Christopher K. Savile,^{1*} Jacob M. Janey,^{2*} Emily C. Mundorff,¹ Jeffrey C. Moore,² Sarena Tam,¹ William R. Jarvis,¹ Jeffrey C. Colbeck,¹ Anke Krebber,¹ Fred J. Fleitz,² Jos Brands,² Paul N. Devine,² Gjalb W. Huisman,¹ Gregory J. Hughes²

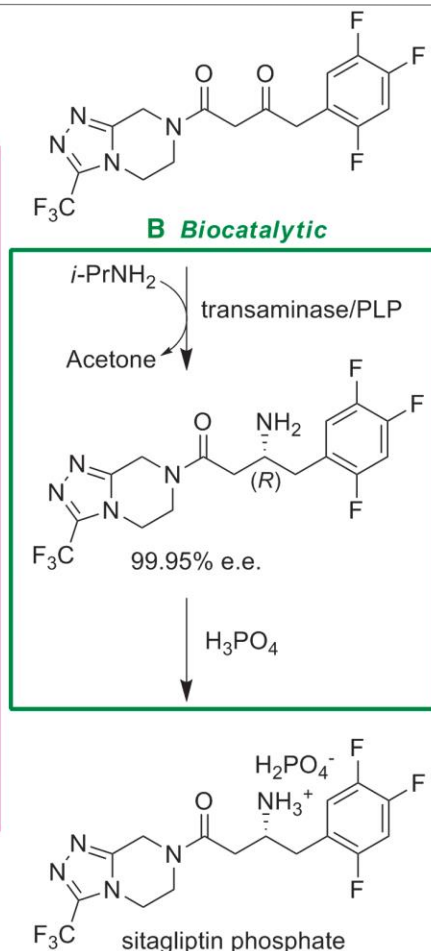
SCIENCE VOL 329 16 JULY 2010

305

Παραγωγή σιταγλιπτίνης



i-Pr = isopropyl



Αντιυπεργλυκαιμικό
Αναστολέας της διπεπτιδυλ
πεπτιδάσης-4

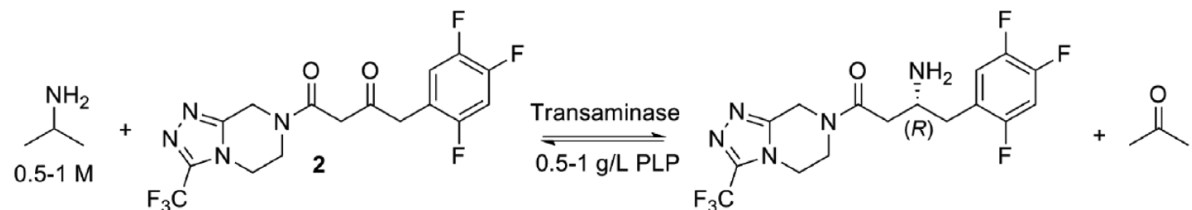
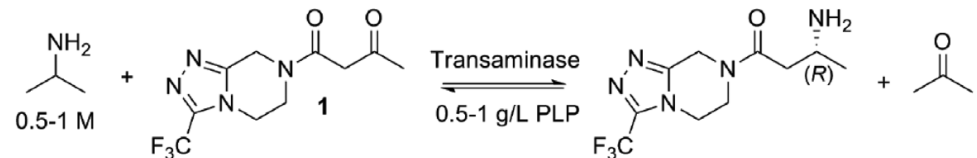
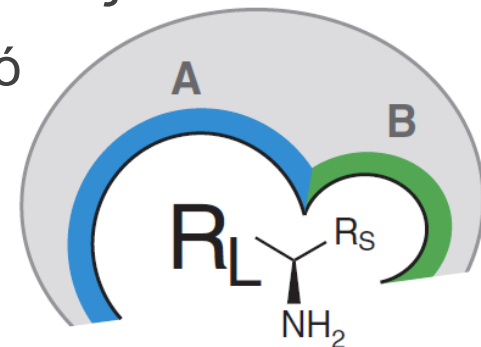
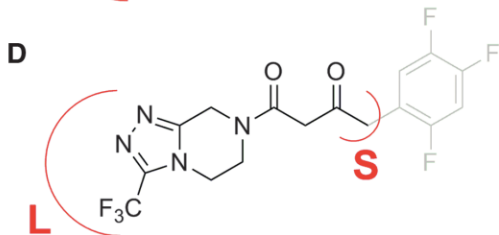
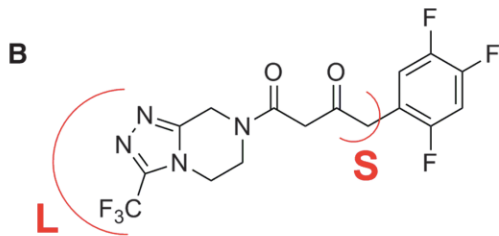
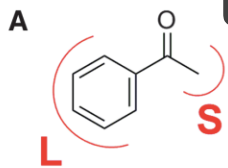


Savile et al. (2010) *Science* 329, 305-309

Desai (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 1974-1976

Παραγωγή σιταγλιπτίνης

- ❖ Οι τρανσαμινάσες δέχονται μόνο μεθυλομάδες στη μικρή θέση πρόσδεσης υποστρώματος
- ❖ Ανέπτυξαν ένα ένζυμο που να δέχεται πρώτα το μεγάλο υποκαταστάτη με χρήση περικομμένου υποστρώματος
- ❖ Σε δεύτερο βήμα, κάναν την εξέλιξη με το κανονικό υπόστρωμα

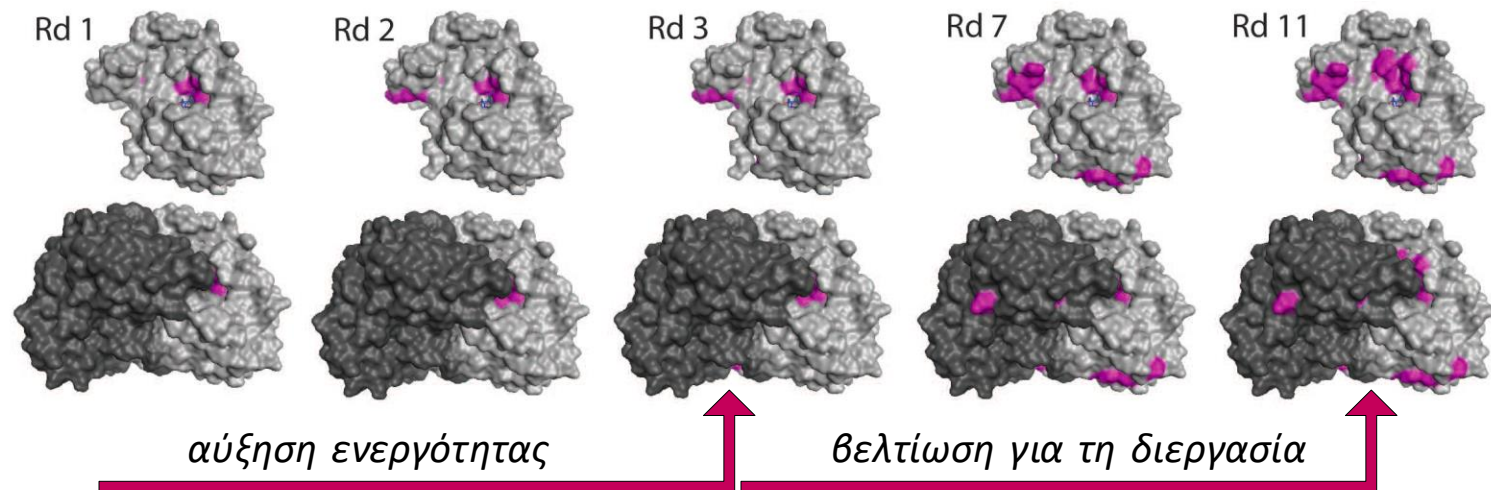


Εξέλιξη του ενζύμου

Substrate	Added Mutations*	[Substrate] in g/l	Assay changes	Round identified	Improvement over parent†
1	ATA-117	2		–	N/A
1	G136Y	2		1a	6
1	S223P	2		1a	11
2	S223P	2		1a	Not active
2	Y26H;† V65A;† V69G; F122I; A284G	2		1b	first active
2	H62T; G136Y; E137I; V199I; A209L; T282S	2		2	75
2	S8P; H26Y; G69C; M94I; I137T; G215C	5	5% DMSO to 5% MeOH; RT to 30°C	3	9
2	L61Y; C69T; Y136F; T137E	10	0.5 to 1 M iPrNH ₂ ; pH 7.5 to pH 8.5	4	4
2	D81G; I94L; I96L; T178S; L269P; P297S; S321P	40	5 to 10% MeOH; 30 to 45°C	5	1.4
2	Y60F; L94I; A169L; S178T; G217N; L273Y	100	10 to 20% MeOH	6	1.6
2	S124H	100	20% MeOH to 25% DMSO	7	1.1
2	I122M; H124N	100		8	1.1
2	Q329H	100		9	1.9
2	N124T; Y150S; V152C; H329Q	50	25 to 50% DMSO; 0.5% acetone	10	2
2	S126T	50		11	1.4

Στατιστικά εξέλιξης - 27 μεταλλάξεις

- 4: ορθολογικός σχεδιασμός μικρής περιοχής δέσμευσης
- 6: Μεταλλαξιγένεση κορεσμού θέσης στην θέση πρόσδεσης
- 2: Μεταλλαξιγένεση κορεσμού θέσης σε άλλες θέσεις
- 10: από βιβλιοθήκες ομολογίας (περίεργο, αλλά γιατί;)
- 5: τυχαία μεταλλαξιγένεση

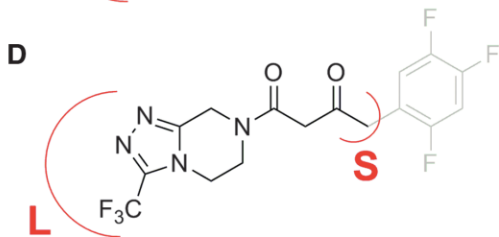
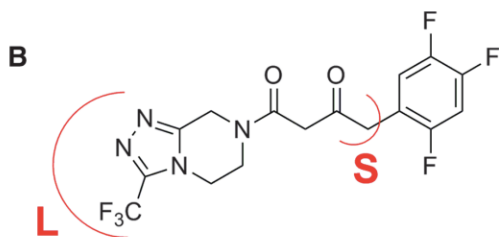
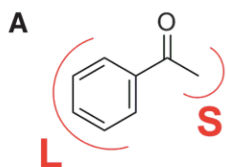


Διάφορες μεθοδολογίες

Library type	Rounds Utilized	Variants Screened
Homology	3,5,11	4536
Random Mutagenesis	3,4,5,10,11	7476
ProSAR	3,4,5,6,7,8,9,10,11	11088
Rational design	5,8,9,11	1536
Site saturation mutagenesis	3,4,5,6,7,8,9,11	11844
Total		36480

Χρονολόγιο μεταλλάξεων

Substrate	Added Mutations*	[Substrate] in g/l	Assay changes	Round identified	Improvement over parent [†]
1	ATA-117	2		–	N/A
1	G136Y	2		1a	6
1	S223P	2		1a	11
2	S223P	2		1a	Not active



Για την μετάλλαξη S223P:

This mutation could be either increasing the hydrophobic interaction with the THTP group and/or stabilizing a loop in the binding pocket. The next most improved variant from these libraries, G136Y, appears to be increasing the hydrophobic interaction with the THTP group.

Substrate	Added Mutations [*]	[Substrate] in g/l	Assay changes	Round identified	Improvement over parent [†]
2	Y26H, [‡] V65A, [‡] V69G; F122I; A284G	2		1b	first active

*The variant identified with activity toward pro-sitagliptin ketone was from a **small pocket combinatorial library designed to expand the small pocket** and accommodate the trifluorophenyl group. This variant had **three programmed mutations (V69G, F122I, and A284G)** as well as **two random mutations (Y26H and V65A)**. The three programmed mutations appear to be creating sufficient space to accommodate the trifluorophenyl group. The random mutation Y26H was in an unmodeled portion of the enzyme and V65A was at the dimer interface.*

Substrate	Added Mutations [*]	[Substrate] in g/l	Assay changes	Round identified	Improvement over parent [†]
2	H62T; G136Y; E137I; V199I; A209L; T282S	2		2	75

*The next library **combined all beneficial mutations from the large pocket site-saturation mutagenesis libraries with beneficial mutations from the small pocket combinatorial library.** The most active variant from this library added an additional small pocket mutation, T282S, as well as five mutations in the large pocket: H62T, G136Y, E137I, V199I, and A209L. The mutations G136Y, E137I, V199I, and A209L all appear to be **increasing the hydrophobic interactions with the THTP moiety.***

Substrate	Added Mutations*	[Substrate] in g/l	Assay changes	Round identified	Improvement over parent [†]
2	S8P; H26Y; G69C; M94I; I137T; G215C	5	5% DMSO to 5% MeOH; RT to 20°C	3	9

The entire binding pocket was subjected to **saturation mutagenesis** in round 3. **At position 69, mutations TAS and C were improved over G.** This is interesting in two aspects. First, V69A was an option in the small pocket combinatorial library, but was less beneficial than **V69G**. [...]

Random mutagenesis generated two of the mutations in the round 3 variant: **S8P** and **G215C**. **S8P** was shown to increase expression and **G215C** is a surface exposed mutation which may be important for **stability**. Mutations identified from **homologous enzymes identified M94I** in the dimer interface as a beneficial mutation.

Substrate	Added Mutations*	[Substrate] in g/l	Assay changes	Round identified	Improvement over parent [†]
2	D81G; I94L; I96L; T178S; L269P; P297S; S321P	40	5 to 10% MeOH; 30 to 45°C	5	1.4
2	Y60F; L94I; A169L; S178T; G217N; L273Y	100	10 to 20% MeOH	6	1.6

Rounds 5-6:

I94L, I96L, L269P, S321P, Y60F (highly conserved in homologous enzymes)

Substrate	Added Mutations*	[Substrate] in g/l	Assay changes	Round identified	Improvement over parent [†]
2	Q329H	100		9	1.9
2	N124T; Y150S; V152C; H329Q	50	25 to 50% DMSO; 0.5% acetone	10	2

Rounds 9-10:

Random mutation, Q329H, provided a significant performance increase in round 9, but was found to be deleterious in round 10 when screened in 50% DMSO

Άλλα θέματα για την εξέλιξη

pH:

Το pH αυξήθηκε από 7.5 σε 8.5 και έδωσε 2.5 φορές καλύτερη δραστητικότητα

Θερμοκρασία:

Αν και τα ένζυμα είναι σταθερά και πάνω από 60°C, το προϊόν αποσυντίθεται σε θερμοκρασίες πάνω από 50°C.

Διαλύτης:

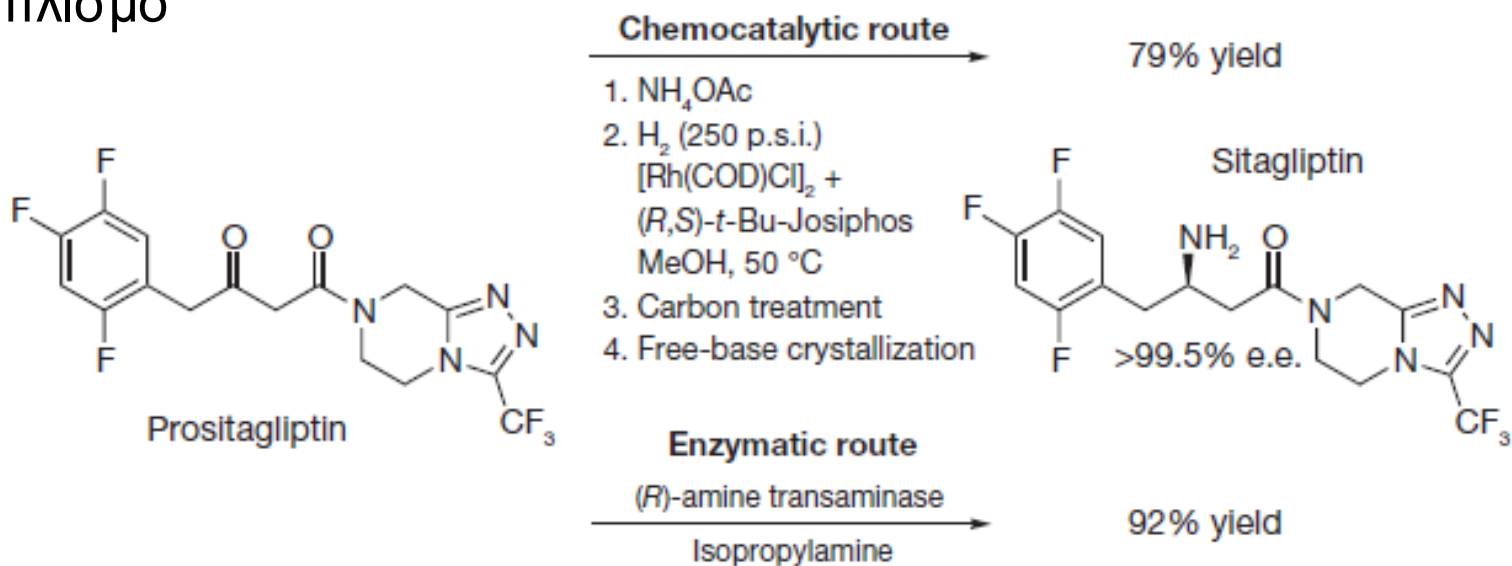
DMSO και μεθανόλη βρέθηκαν οι καλύτεροι διαλύτες, αλλά στη μεθανόλη δεν μπορούσε να διαλυτοποιηθεί μεγάλη ποσότητα υποστρώματος

Παραγωγή σιταγλιπτίνης

Περίληψη βελτίωσης – Παραγωγικότητα: **275 g / L**

11 γύροι εξέλιξης σε 9 μήνες (36,480 ένζυμα μελετήθηκαν με HPLC)

19% μείωση στα συνολικά απόβλητα, απόρριψη όλων των βαρέων μετάλλων, μείωση του συνολικού κόστους παραγωγής, δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό



Olefin Cyclopropanation via Carbene Transfer Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 Enzymes

Pedro S. Coelho,^{1*} Eric M. Brustad,^{2*} Arvind Kannan,¹ Frances H. Arnold^{1†}

SCIENCE VOL 339 18 JANUARY 2013

307

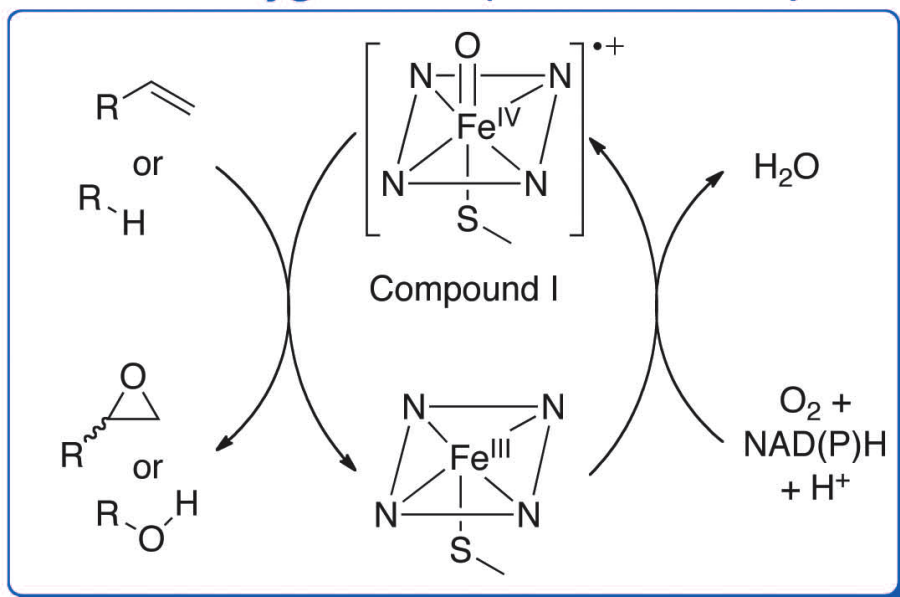
Ανάπτυξη νέας “βιοχημείας”

Ανάπτυξη ενζύμου που καταλύει αντιδράσεις κυκλοπροπανίωσης
κατά προτίμηση ασύμμετρα

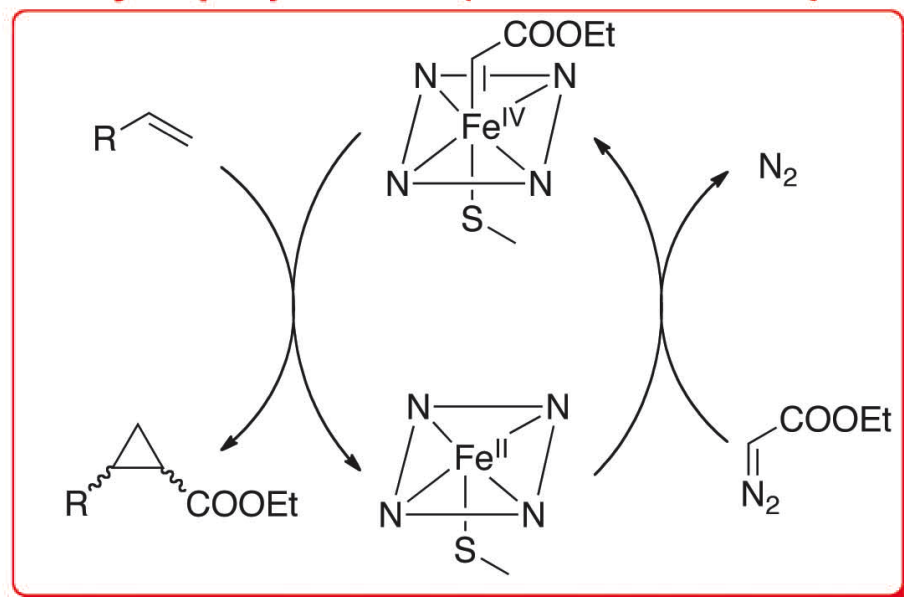
(στη φύση μέσω προσθήκης ολεφίνης στο μεθυλοκατιόν του SAM
ή κυκλοποίησης διμεθυλοαλλυλο πυροφωσφορικού)

Μετατροπή P450 ώστε να μεταφέρει καρβένιο

Monooxygenation (oxene transfer)

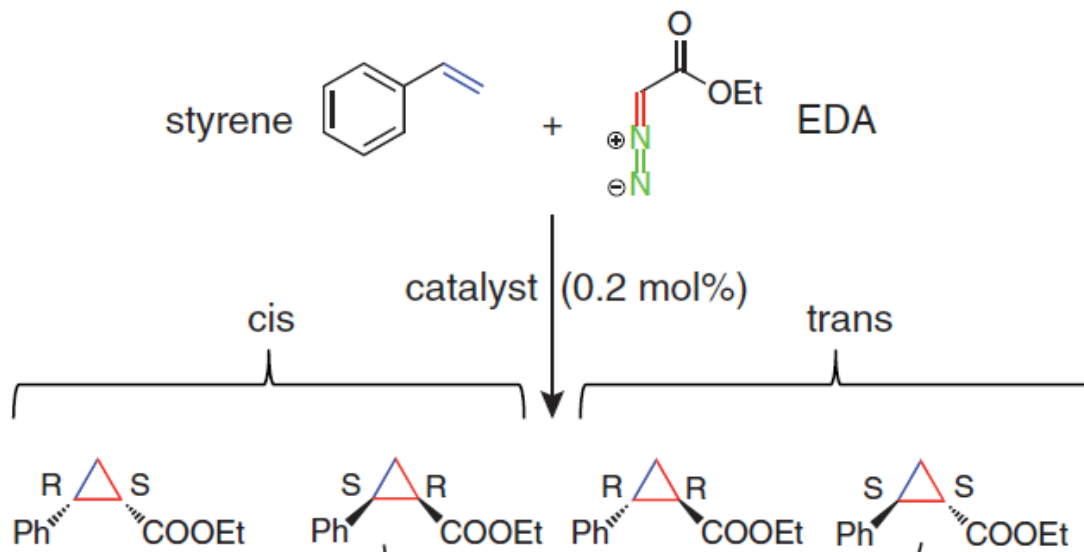


Cyclopropanation (carbene transfer)

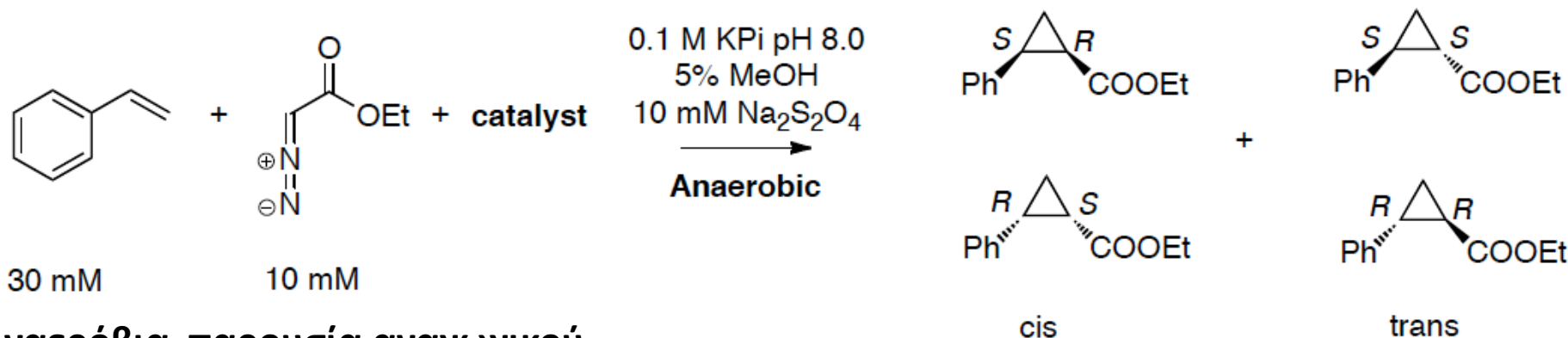


Ποια η λογική της εξέλιξης;

- Πορφυρίνες με σίδηρο (ως οργανοκαταλύτες) μπορούν να καταλύσουν κυκλοπροπανιώσεις με μεταφορά καρβενίου
- Διαλογή πρωτεϊνών αίμης που μπορούν να καταλύσουν αντίστοιχη αντίδραση σε νερό (με 5% μεθανόλη).
- Στυρένιο και αιθυλεστέρας του διαζωξικού οξέος



Αποτελέσματα διαλογής ενζύμων



Αναερόβια, παρουσία αναγωγικού

catalyst	axial ligand	cat. loading (% mol eq)	TTN	cis : trans*	%ee cis [†]	%ee trans [‡]
catalase	O-Tyr	0.16	0	-	-	-
CPO [§]	S-Cys	0.40	0	-	-	-
HRP	N-His	1.00	9	7 : 93	8	-7
cyt c	N-His, S-Met	1.00	19	6 : 94	0	12
Mb	N-His	1.00	43	6 : 94	-1	2
P450 _{BM3}	S-Cys	0.20	5	37 : 63	-27	-2
hemin	-	0.20	73	6 : 94	-1	0

Αερόβια, απουσία αναγωγικού (μόνο ενεργό)

P450 _{BM3}	S-Cys	0.20	0.4	46 : 54	-46	36
---------------------	-------	------	-----	---------	-----	----

Διαλογή μεταλλαγμάτων

Θερμική αποδιάταξη - προφίλ σαν της ελεύθερης αιμίνης

P450	% yield*	TTN	cis : trans [†]	%ee cis [‡]	%ee trans [§]
WT	1	5	37 : 63	-10	-9
WTF87A	1.2	6	37 : 63	26	-6
H2A10	33.4	167	60 : 40	-95	-78
H2-4-D4	41.2	206	53 : 47	-79	-33
H2-5-F10	58.8	294	16 : 84	-41	-63
C2C12R1	1.6	8	36 : 64	45	1
C3E4R1	1.6	8	43 : 57	51	-7
X7R1	2.4	12	33 : 67	23	-4
12 R1	6.2	31	17 : 83	9	-2
C2E6 R1	4.6	23	27 : 73	25	-6
C2G9 R1	48	240	9 : 91	10	-2
7-11D	32	160	35 : 65	-22	-18

3-5 Åla στο ενεργό κέντρο

16 μεταλλάξεις

Ρόλος των Ala

P450 (Holo)	L75A	M177A	L181A	I263A	T268A	L437A	TTN	cis : trans*	%ee cis [†]	%ee trans [‡]	T ₅₀ (°C)
9-10A TS F87V	No	No	No	No	No	No	7	35 : 65	-41	-8	59.5
9-10A TS F87V L75A	Yes	No	No	No	No	No	5	42 : 58	-59	-11	52.3
9-10ATS F87V L181A	No	No	Yes	No	No	No	5	41 : 59	-27	-7	53.3
9-10A TS F87V I263A	No	No	No	Yes	No	No	8	29 : 71	-31	-39	55.4
9-10A TS F87V T268A (BM3-CIS)	No	No	No	No	Yes	No	199	71 : 29	-94	-91	55.2
BM3-CIS I263A	No	No	No	Yes	Yes	No	190	19 : 81	-62	-91	54.0
BM3-CIS L181A	No	No	Yes	No	Yes	No	159	56 : 44	-92	-94	50.8
H2A10	Yes	No	Yes	No	Yes	No	167	60 : 40	-95	-78	48.9
BM3-CIS L181A I263A	No	No	Yes	Yes	Yes	No	203	14 : 86	-46	-95	50.9
BM3-CIS L181A L437A	No	No	Yes	No	Yes	Yes	180	27 : 73	-74	-98	48.4
BM3-CIS L181A I263A L437A	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	218	9 : 91	-55	-96	48.2
4H5	Yes	Yes	Yes	No	No	No	7	32 : 68	-9	0	49.4
BM3-CIS I263A L437A	No	No	No	Yes	Yes	Yes	267	16 : 84	-59	-89	50.4
H2-5-F10	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	294	16 : 84	-41	-63	47.5
H2-4-D4	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	206	53 : 47	-79	-33	46.4



Site-saturation mutagenesis

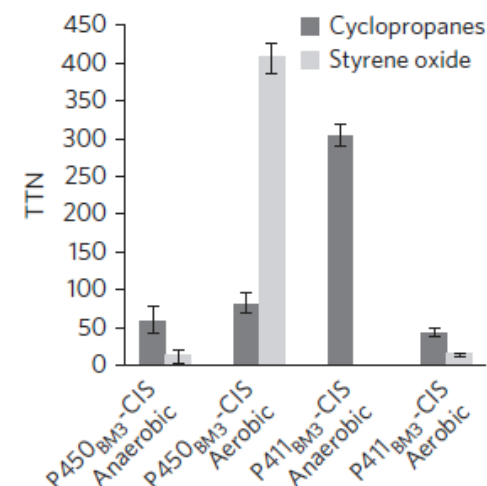
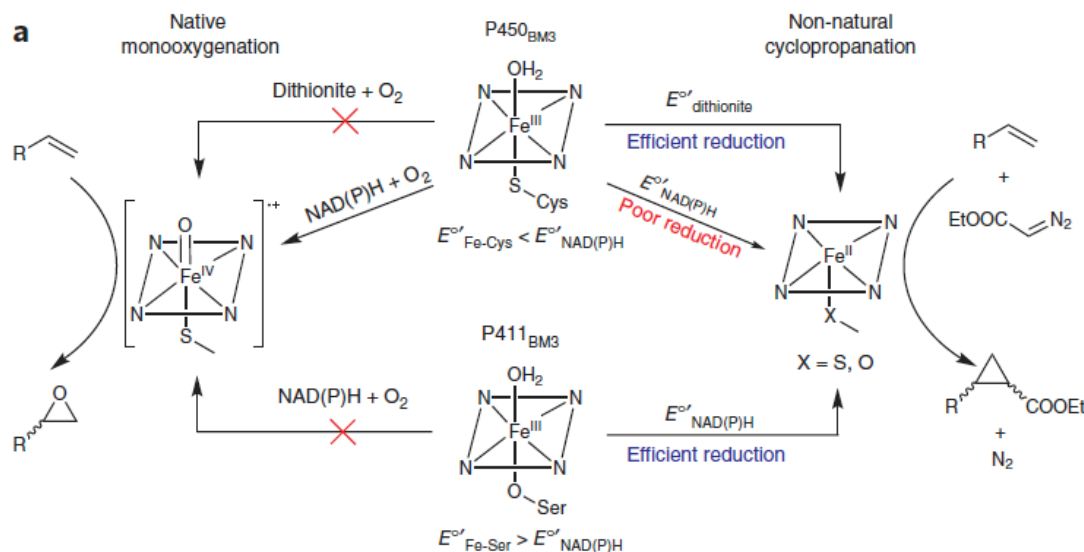
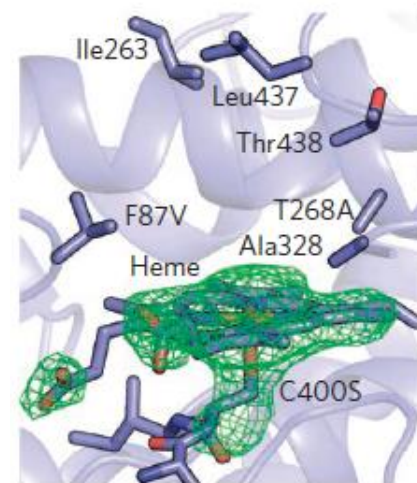
Σε 5 θέσεις ενεργού κέντρου: L181, I263, A328, L437, T438

P450 _{heme}	yield (%)*	TTN	cis : trans [†]	%ee cis [‡]	%ee trans [§]
BM3-CIS	57	286	71 : 29	-92	-88
BM3-CIS-L181G	47	234	59 : 41	-89	-90
BM3-CIS-A328G	37	186	83 : 17	52	-45
BM3-CIS-L437F	53	265	53 : 47	-82	-85
BM3-CIS-L437Q	30	148	53 : 47	-73	-87
BM3-CIS-L437G	58	290	54 : 46	-88	-91
BM3-CIS-L437A	39	194	38 : 62	-84	-11
BM3-CIS-T438A	54	273	91 : 9	-92	-75
BM3-CIS-T438G	15	78	73 : 27	-87	-59
BM3-CIS-T438S	59	293	92 : 8	-97	-66
BM3-CIS-T438Q	41	206	38 : 62	67	70
BM3-CIS-T438P	32	161	90 : 10	-91	-50

Ανάπτυξη “νέας βιοχημείας”

Στόχος η αντίδραση κυκλοπροτανίωσης χωρίς
παράπλευρες αντιδράσεις

Μετάλλαξη C400S



Catalytic Promiscuity of Ancestral Esterases and Hydroxynitrile Lyases

Titu Devamani,^{†,∇} Alissa M. Rauwerdink,^{†,∇} Mark Lunzer,[‡] Bryan J. Jones,[†] Joanna L. Mooney,[†]
Maximilien Alaric O. Tan,[§] Zhi-Jun Zhang,^{||} Jian-He Xu,^{||} Antony M. Dean,^{*,‡,⊥}
and Romas J. Kazlauskas^{*,†}

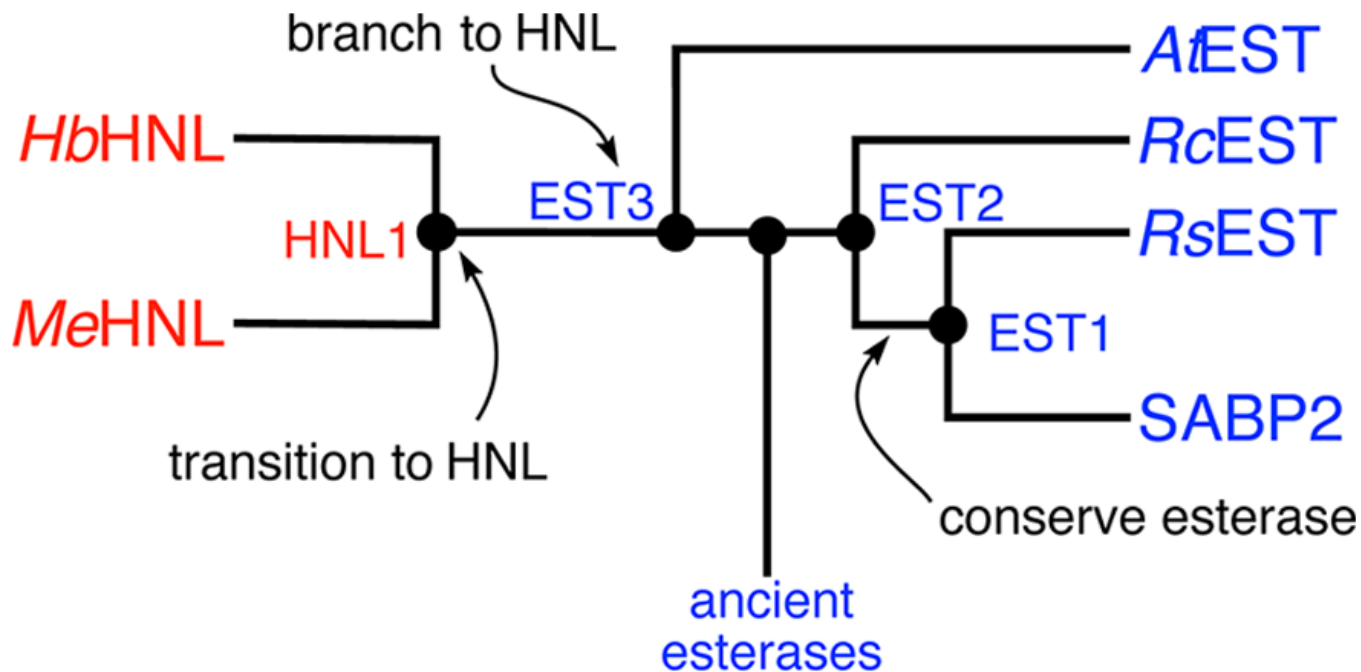
DOI: 10.1021/jacs.5b12209
J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 1046–1056

Catalytic promiscuity

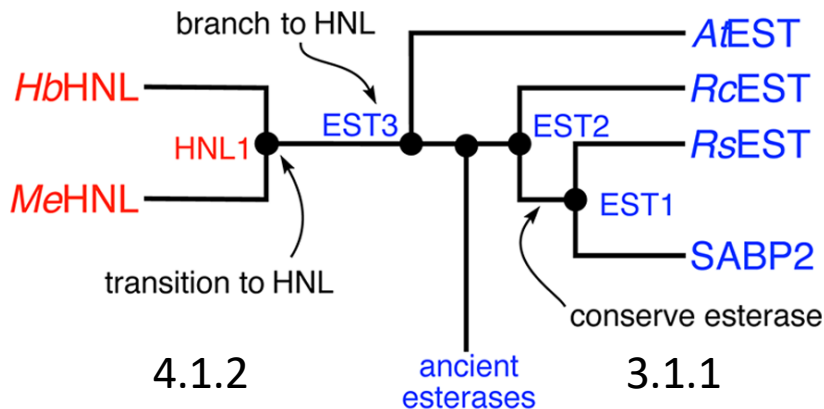
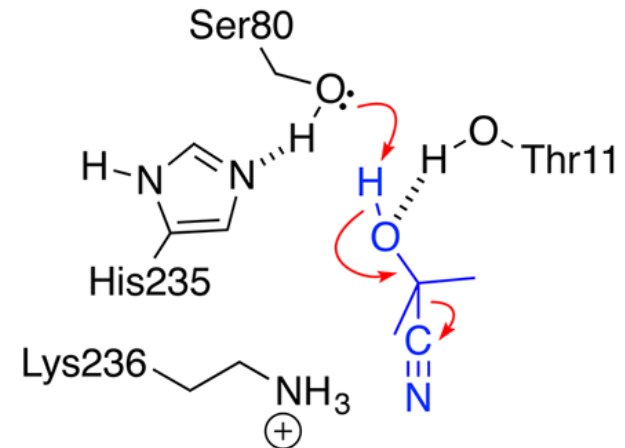
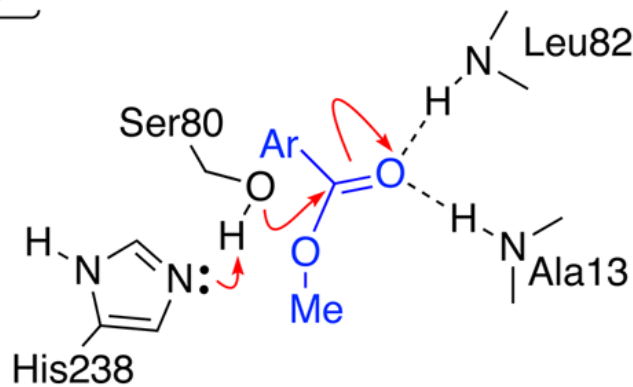
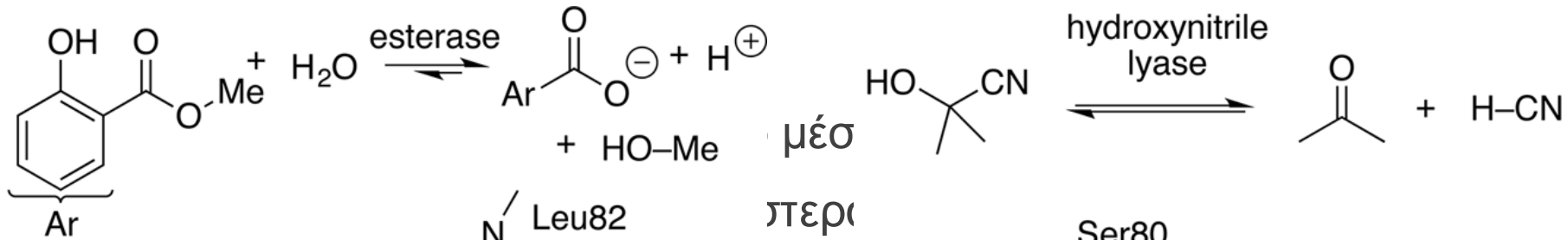
Βασική έρευνα:

πως εξελίσσονται οι πρωτεΐνες;

πως δημιουργήθηκαν τόσες κατηγορίες ενζύμων;



Κατηγορίες ενδιαφέροντος



Μηχανισμός

Διαφορετικός μηχανισμός στα δύο ένζυμα, παρά την παρόμοια δομή (α/β υδρολάσης):

Εστεράσες: ακυλο-ένζυμο ενδιάμεσο, τυπική υδρόλυση με σερίνη

HNL: μηχανισμός οξέος-βάσης χωρίς ενδιάμεσο

Διαφορετική διευθέτηση υποστρώματος στο ενεργό κέντρο

Πως προήλθαν οι HNL από τις εστεράσες;

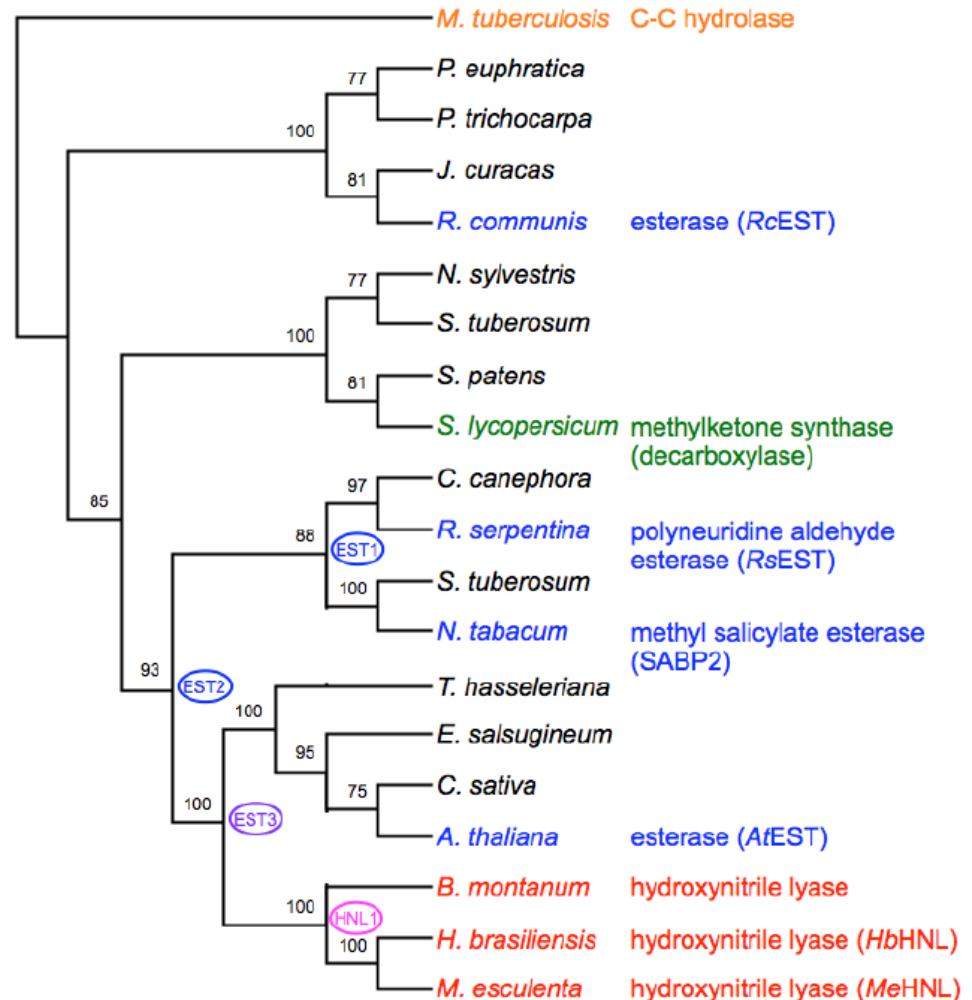
Εξελικτικό δέντρο

Εστίαση στις α/β υδρολάσες:
Πάνω από 60.000 πρωτεΐνες

Οι HNL ομοιάζουν με φυτικές
εστεράσες (>40% ομολογία)

Η εστεράση από *A. thaliana* έχει
και δραστηριότητα HNL, παρότι
δεν δημιουργεί τέτοιες ενώσεις.

Πρόβλεψη 4 “προγόνων”



Ομοιότητα αλληλουχιών

enzyme	construct origin ^b	% ID to HbHNL	% ID to SABP2
HbHNL	<i>Hevea brasiliensis</i>	100	44
MeHNL	<i>Manihot esculenta</i>	76	41
HNL1	max parsimony and likelihood	79	49
HNL1-ML	maximum likelihood	75	51
HNL1-NJ	neighbor joining	79	50
EST3	max parsimony and likelihood	67	55
EST3-ML	maximum likelihood	58	60
EST3-NJ	neighbor joining	56	59
EST2	max parsimony and likelihood	48	71
EST1	max parsimony and likelihood	49	70
AtEST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	47	50
RcEST	<i>Ricinus communis</i>	21	28
RsEST	<i>Rauvolfia serpentina</i>	41	56
SABP2	<i>Nicotinia tabacum</i>	44	100

Καταλυτικό προφίλ ενζύμων

