Genomprojekte und die Kartierung des menschlichen Genoms

Peter N. Robinson

Institut für medizinische Genetik Charité Universitätsmedizin Berlin

2. Juni 2008

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

1/1

Vergleichende Genomics

Derzeit > 980 Genome in NCBI-Datenbanken

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Bildquelle: http://www.bork.embl.de/tree_of_life/

E. coli

- 4,9 Mb
- Ein Chromosom

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

4/1

Saccharomyces cerevisiae-Genom

- Knospungshefe
- 16 Chromosomen, Mitochondrion

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- 4691 ORFs, 70.99%
- 1104 ORFs, 16.71%
- 813 ORFs, 12.30%

Bildquelle: http://www.yeastgenome.org/

Homologe Gene

Organismus	Gene mit homologen Ge-	% Gene im
	nen bei H.sapiens	Organismus
E. coli	412	9%
Hefe	1785	30%
C. elegans	5019	25%
Drosophila	6057	44%

Quelle: euGenes (Vorsicht: Zahlen nur ungefähr!)

Peter N. Robinson (Charité)

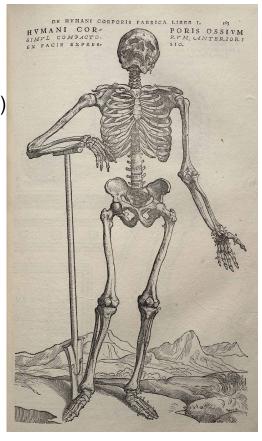
Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

6/1

Vesalius

- Andreas Vesalius
- De Humanis Corporis Fabrica (1543)
- Anfang der modernen Anatomie
- Grundlage für zahlreiche Entdeckungen



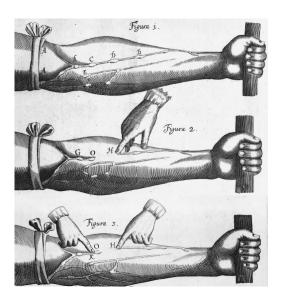
Von Galen zu Harvey



Galenos von Pergamon, 129-216 n. Chr.

Das Blut wird in der Leber erzeugt,

von hier aus fließt es in nur einer Richtung



William Harvey (1578 - 1657)

De motu cordis (1628).

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

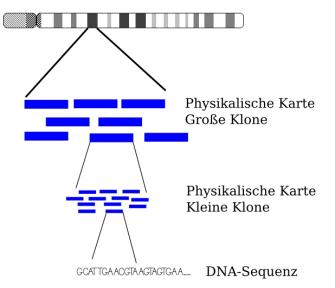
9/1

Medizinische Ziele des HPO

- Genidentifikation bei Erbkrankheiten
- Besseres Verständnis von Genstruktur und -funktion: Grundlage einer modernen, molekularen Medizin
- Personalisiertes Medizin: Vorhersage von Krankheitsrisiken bzw. von individuellen Nebenwirkungen auf Medikamente durch Bestimmung von genetischen Varianten (Polamorphismen)
- Die Genomsequenz dürfte wie der Atlas von Vesalius Ausgangspunkt zahlreicher Entdeckungen werden

Grundlagen: Genetische Karte

- Eine genetische Karte zeigt die relativen Abstände von Markern auf einem Chromosom zueinander
- Voraussetzung/Grundlage, um eine detaillierte Karte bzw. die komplette Sequenz eines Genoms zu erstellen, d.h., "Gerüst"



Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

11 / 1

Grundlagen: Genetische Marker

- Ein Marker ist ein beliebiges mendelndes Merkmal, mit desseh Hilfe man einen Chromosomenabschnitt in einem Stammbaum verfolgen kann.
- Weitere mathematische Einzelheiten (lod-score, θ) in späteren Vorlesungen
- Im folgenden soll gezeigt werden, welche Merkmale als Marker dienen können.

Marker im Zeitalter vor der DNA-Sequenzierung

- Schleutermann, Bias, Murdoch, McKusick (1969) Linkage of the Loci for the Nail-Patella Syndrome and Adenylate Kinase Am J Hum Genet. 21: 606–630.
- Nail-Patella-Syndrome: Autosomal dominante Vererbung
- Kopplung mit ABO-Locus 1955 gezeigt
- Schleutermann et al. zeigten eine strikte Kosegregation zwischen dem klinischen Merkmal Nail-Patella-Syndrom und dem biochemischen Merkmal einer Adenylate-Kinase-Isoform

Peter N. Robinson (Charité)

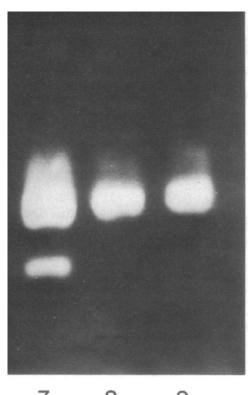
Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

13 / 1

Adenylat-Kinase

- Adenylatkinase: 2 ADP \rightarrow ATP + AMP
- Unterschiedliche Isoformen, die sich elektrophoretisch trennen lassen



7

8

9

Nagel-Patella-Syndrom

- Nail patella syndrome
- Autosomal dominant
- Klinische Diagnose einfach

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

15 / 1

Kopplung

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

- Die betroffenen (schwarze Symbole) erben immer die AK1-Isoform 1 vom betroffenen Elternteil
- 1-1: AK1-Isoform 1 (homozygot)
- 2-1: AK1-Isoform 1/Isoform 2

AK1 und Chromosom 9

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt Westerveld A (1976) Assignment of the AK1:Np:ABO linkage group to human chromosome 9. Proc.

Nat. Acad. Sci. USA 73: 895-899

- Später konnte durch Hamster-Mensch Hybdridzelllinien mit jeweils einem menschlichen Chromosome gezeigt werden, dass das Gen für AK1 auf Chromosome 9 gelegen ist
- Enthielt der Hybrid ein Chromosom 9, beobachtete man AK1-Aktivität
- Enthielt der Hybrid ein anderes menschliches Chromosom, beobachtete man keine AK1-AKtivität

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

17 / 1

DNA-Polymorphismen

- Blutgruppen, Mobilitätsvarianten von Serumenzyme u.ä. sind ab 1910 als Marker eingesetzt worden
- Preis, Aufwand jedoch sehr hoch, ein relativ kleiner Teil der genetischen Karte wurde bis 1980 erschlossen
- Durchbruch: Erkenntnis dass DNA-Polymorphismen als genetische Marker eingesetzt werden können



Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

19/1



Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt



RFLP, Southern-Blot

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

21 / 1

RFLP

- ca. 10⁵ im menschlichen Genom
- Zwei Markerallele, maximale Heterozygotie 0,5
- Nachweis mittels Southern-Blotting, neuerdings PCR
- Relativ aufwändig



- Variable Number of Tandem Repeats
- 10-100b

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

23 / 1

VNTR

• Hochinformativ, da viele Allele

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Bildquelle: www.biology.arizona.edu



 Aufwändiger Nachweisverfahren (Southern-Blotting nach Restriktionsanalyse)

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Bildquelle: www.biology.arizona.edu

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

25 / 1

VNTR

- VNTR (auch Minisatellit genannt)
- Viele Allele, hoch informativ
- geschätzt 10⁴ im menschlichen Genom
- Nachweis: Southern-Blot, radioaktive Sonden (aufwändig)
- Ungleiche Verteilung im Genom
- Daher sind Minisatelliten nicht gut geeignet für Hochdurchsatzkartierung



- VNTR-Mikrosatelliten (2-10nt) sind mittels PCR leicht nachzuweisen
- Meist (CA)_n repeats

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Bildquelle: Zentrale für Unterrichtsmedien im Internet e.V.

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

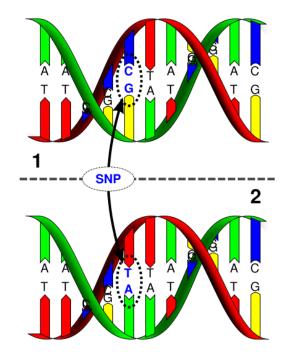
27 / 1

Mikrosatelliten

- Hochinformativ, da viele Allele
- ca. 10⁵ im menschlichen Genom
- Bestimmung durch PCR, auch automatisierte Muiltiplex-PCR

SNPs

- Single Nucleotide Polymorphism
- Variationen von einzelnen Basenpaaren



Bildquelle: Wikipedia commons

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

29 / 1

SNPs

• G/T-SNP von oben nach unten T/T, G/T und G/G.

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt



• Bestimmung durch automatisierte Verfahren im großen Maßstab möglich

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Bildquelle: www.ikmb.uni-kiel.de

Peter N. Robinson (Charité)

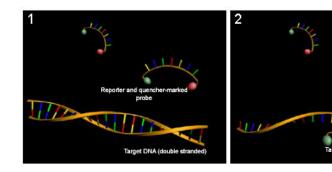
Kartierung des menschlichen Genoms

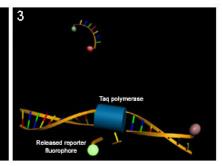
2. Juni 2008

31 / 1

SNPs

• Nachweis der beiden Allele z.B. durch Taqman-Sonden





Bildquelle: Wikipedia Commons

SNPs

- Neuerdings Nachweis auch mittels Mikroarray
- Hier genomweiter Satz von 550000 SNP Markern (Illumina)

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

www.sanger.ac.uk

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

33 / 1

SNPs

Bemerke...

- RFLPs ⊂ SNPs
- Die meisten SNPs erzeugen/zerstören jedoch keine Restriktionsschnittstelle und sind daher keine RFLPs
- Der große Vorteil der SNPs besteht in der Möglichkeit, mit den o.g. Hochdurchsatzverfahren eine hohe Dichte an Markern zu effizient und günstig bestimmen zu können.

Kartierung

Im folgenden soll nun gezeigt werden, wie man mittels der o.g. Marker das menschliche Genom kartiert hat

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

35 / 1

DNA-Restriktionskarte

- Eine Karte der Restriktionsstellen in einer DNA-Sequenz
- Falls die DNA-Sequenz bekannt ist, so ist die Karte trivial zu erstellen

```
Taq I
Cla I Alu I
Alu I BspD I Mse I
HinD III
    Nla III
                                                                                  Nla IV
      #Tthlll II
teteatgtttgaeagettateategataagetttaatgeggtagtttateaeagttaaattgetaaegeagteaggeaeegtgtatgaaatetaaeaat
                              29
                                                                                  76
                         Mae III
                           #Hph I
                                                                              Hae III
                                                                           ScrF I
Sau96 I
               Sec Nla IV
                              BsaJ #SfaN I
                                                                    10 I Nci I#Mnl IAci
Rsa I Bcn IBsl I
                  Ban I
cqcqaqtaqcaqtaqqaqccqtqqcaqtqqqacctacqacatccqtatccqaaccaatacqqccatqacqqcccqqaqaacqccctataqcaqqtaaqqc
                                                                160
101
                               130
                                                                           170
                                                                                 175 181
               115 119
                               129
                                   134
                                                                             172
             112
                               129133
                                                                 161
                                                                            170
```

Restriktionskartierung einer unbekannten DNA-Sequenz

- Ein wesentlich schwierigeres Problem
- DNA-Klon wird mit Enzym verdaut → N Fragmente
- Fragmente werden durch Elektrophorese nach Fragmentlänge getrennt

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Bildquelle: . Edelstein et al 2000

Peter N. Robinson (Charité)

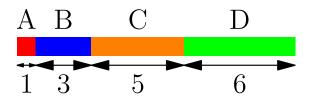
Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

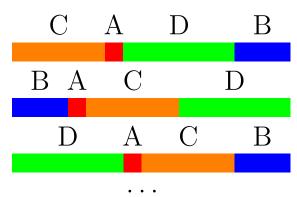
37 / 1

Restriktionskartierung

• Was lernen wir von einem einfachen Restriktionsverdau?



N! Permutationen:

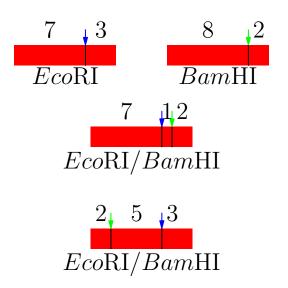


Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

Restriktionskartierung

- Doppelverdau (Beispiel: Fragment der Länge 10 kb)
 - Verdau mit EcoRI
 - Verdau mit BamHI
 - Verdau mit beiden Enzymen
- Reihenfolge der Schnittstellen anhand des Musters bestimmen



Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

39 / 1

Doppelverdau-Problem

- Gegeben seien ein DNA-Segment, das jeweils mit Enzym A, Enzym B bzw. beiden Enzymen verdaut wird:
 - dA: Fragmentlängen nach Verdau durch Enzym A
 - dB: Fragmentlängen nach Verdau durch Enzym B
 - dX: Fragmentlängen nach Doppelverdau A/B
- Ziel:
 - Positionen der Schnittstellen für Enzym A
 - Positionen der Schnittstellen für Enzym B

Doppelverdau-Problem

Permutationen einer Menge [A, B, C, D]

```
 [A, B, C, D] \quad [A, B, D, C] \quad [A, C, B, D]   [A, C, D, B] \quad [A, D, B, C] \quad [A, D, C, B]   [B, A, C, D] \quad [B, A, D, C] \quad [B, C, A, D]   [B, C, D, A] \quad [B, D, A, C] \quad [B, D, C, A]   [C, A, B, D] \quad [C, A, D, B] \quad [C, B, A, D]   [C, B, D, A] \quad [C, D, A, B] \quad [C, D, B, A]   [D, A, B, C] \quad [D, A, C, B] \quad [D, B, A, C]   [D, B, C, A] \quad [D, C, A, B] \quad [D, C, B, A]
```

• 1. Wahl: n, 2. Wahl n-1, 3. Wahl n-2,...: $\longrightarrow n!$

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

41 / 1

Doppelverdau-Problem

Eine Lösung durch "Brachialgewalt"

- A: Menge aller Permutationen nach Verdau durch A
- \mathscr{AB} : Menge aller Permutationen vom Doppelverdau

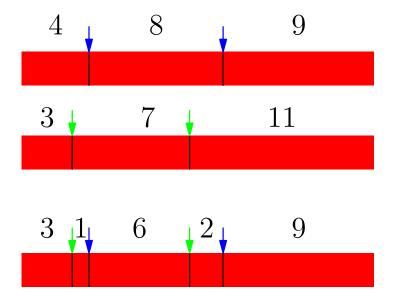
Doppelverdau-Problem: matlab/octave

- Wir wollen die folgende Karte berechnen
- Unsere Beobachtung:

Verdau mit A: 9,8,4

Verdau mit B: 11,7,3

Doppelverdau: 9,6,3,2,1



Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

43 / 1

Doppelverdau-Problem: matlab/octave

```
A=[9 8 4 ];
B=[11 7 3];
AB=[9 6 3 2 1];
[a,b,ab]=doubledigest(A,B,AB);
```

- Vereinbare Vektoren A,B und AB
- Funktionsaufruf liefert a,b und ab (korrekte Reihenfolge der Fragmente) zurück

Doppelverdau-Problem: matlab/octave

```
function [a,b,ab] = doubledigest(A,B,AB)
%function doubledigest(A,B,AB)
```

- matlab/octave-Funktionen werden in m-Datei gespeichert
- Name der Funktion stimmt mit Dateinamen überein
- Erste Zeile der Datei enthält Funktionssignatur
- %: Kommentar

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

45 / 1

Doppelverdau-Problem: matlab/octave

```
pA=perms(A);
pB=perms(B);
pAB=perms(AB);
```

- perms: Eingebaute Funktion
- perms (x): liefert alle Permutationen des Vektors x zurück.

```
octave:2>A=[123];
octave:2> perms(A)
ans =
   1
       2
           3
   2
       1
           3
   1
       3
           2
   2
       3
           1
   3
       1
           2
   3
       2
           1
```

Doppelverdau-Problem: matlab/octave

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

47 / 1

Doppelverdau-Problem: matlab/octave

```
function c = compatible(x,ab)
cAB=cumsum(ab);
cX=cumsum(x);
mem=ismember(cX,cAB);
c = sum(mem)==length(mem);
return;
```

- AB, korrekte Reihenfolge: 3 − 1 − 6 − 2 − 9
- Kumulative Summe : 3 − 4 − 10 − 12 − 21
- A korrekte Reihenfolge: 4 − 8 − 9
- A, kumulative Summe: 4 − 12 − 21
- ismem (A, AB) liefert Vektor zurück dessen Einträge angeben, ob A(i)
 Mitglied von AB ist
- Falls Reihenfolge von A mit der von AB übereinstimmt, enthält mem nur
 '1'
- c wird dann auf 1 (wahr) gesetzt

Doppelverdau-Problem

- Code auf http://compbio.charite.de
- Nicht geeignet für realistische Probleme
- Das Doppelverdau-Problem ist NP-schwierig

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

49 / 1

Restriktionskartierung: Beispiel

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Petit et al. (1990) Long-range restriction map of the terminal part of the short arm of the human X chromosome.

Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol. 87, pp. 3680-3684.

Hybridzellkartierung

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt Bildquelle: Stra-

chan & Reed

- Fusion von Zellen von verschiedenen Spezies in Kultur
- stabile Hybridzellen enthalten nur wenige Chromosomen
- Auch monochromosomale Hybridzellen

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

51 / 1

Bestrahlungshybridzellen

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Bildquelle: Todd Scheetz

Bestrahlungshybridzellen

- Fragmente werden durch Bestrahlung von menschlichen Donorzellen erzeugt
- Es kommt dadurch zu Chromosomenbrüchen
- Nach Bestrahlung werden die Donorzellen mit Rezipientenzellen der Maus fusioniert.
- Eine Kohorte (Panel) von Hybridzellen wird mit einer Kombination von menschlichen DNA-Markern getestet.
- Ein bestimmter Marker ist in einigen Zellen vorhanden, in anderen nicht.
- Je näher sich zwei DNA-Marker auf einem Chromosome sind, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch eine zufällig auftretende Bruchstelle getrennt werden.
- Diese Häufigkeit, θ, variiert zwischen 0 (Marker werden nie getrennt) und
 1 (Marker werden immer getrennt).

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

53 / 1

Minimum Obligate Breaks Criterion

- Im folgenden wollen wir die Anwendung der RH-Methode auf die Kartierung von 8 Markern auf Chromosom 21 untersuchen.
- Es wurde ein Panel von 71 RH-Zellen erzeugt und auf die Marker APP, D21S1,D21S4,D21S8,D21S11,D21S16,D21S111 und SOD1 untersucht (2 Gene und 6 anonyme Marker)¹
- Retention der Fragment in den 71 Zell-Linien von 0,4 bis 0,54

¹s. Bishop and Crockford, Comparisons of radiation hybdrid mapping and linkage mapping, Cytogenet Cell Genet 59:93–95 (1992)

Minimum Obligate Breaks Criterion

- "Das Kriterion der kleinsten Anzahl zwingender Brüche"
- Wir können verschiedene Reihenfolgen hinblicklich der Anzahl der Brüche in einem Klon vergleichen
 - (0,0,1,1,0,0,0,0): (Mindestens) 2 Brüche
 - (0,1,0,0,1,0,0,0): (Mindestens) 4 Brüche
 - (0,?,0,0,1,0,0,0): (Mindestens) 2 Brüche (2. Marker nicht ausgewertet)
- Die Anzahl der Brüche pro Klon wird über alle Zell-Linien summiert
- Ziel: Finde die Reihenfolge (Permutation) mit der geringsten Anzahl von Brüchen. Dies ist die "richtige" Permutation

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

55 / 1

Minimum Obligate Breaks Criterion

- Betrachten wir m Loci in ihrer korrekten Anordnung 1,..., m entlang einem Chromosom.
- Wir haben n Zell-Linien, die jeweils ein Locus mit Retentionswahrscheinlichkeit r enthalten.
- Sei σ eine Permutation der Loci
- ullet $B_i(\sigma)$ ist die minimale Anzahl von Brüchen in Klon i für die Permutation σ
- Beispiel: Drei Loci A,B,C. Zell-Linie 1 enthält A und C, Zell-Linie 2 enthält B und C
 - Tür $\sigma = C, B, A$ haben wir für Zell-Linie A (1,0,1) 2 Brüche, für Zell-Linie 2 (1,1,0) 1 Bruch
 - 2 Für $\sigma = C, A, B$ haben wir für Zell-Linie A (1,1,0) 1 Bruch, für Zell-Linie 2 (1,0,1) 2 Brüche

Minimum Obligate Breaks Criterion

- Betrachten wir zwei Loci i und i + 1
- Ein obligater Bruch zwischen i und i + 1 manifestiert sich genau dann, wenn ein Bruch zwischen den Loci aufgetreten ist und ein Locus behalten wird und der andere nicht:

$$2r(1-r)\theta_{i,i+1}$$

 Für die korrekte Anordnung id haben wir dann für die minimale Anzahl von Brüchen B für alle m Marker

$$B(id) = 2r(1-r)\sum_{i=1}^{m-1} \theta_{i,i+1}$$

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

57 / 1

Minimum Obligate Breaks Criterion

Betrachten wir nun eine Permutation, z.B.

$$\sigma = (\sigma(1), \sigma(2), \sigma(3), \dots, \sigma(m)) = (2, 7, m, \dots, 3)$$

- Für ein beliebiges Intervall $I_{\sigma(i)} = {\sigma(i), \sigma(i+1)}$:
 - ▶ Falls $I_{\sigma(i)} = \{k, k+1\}$ für ein bestimmtes k, dann gilt $\theta_{\sigma(i), \sigma(i+1)} = \theta_{k, k+1}$
 - Falls $I_{\sigma(i)}$ mehrere Intervalle enthält (z.B. 2–7), dann gilt $\theta_{\sigma(i),\sigma(i+1)} > \theta_{k,k+1}$ weil die Entfernung größer ist als bei der richtigen Anordnung.
 - Falls $\theta_{\sigma(i),\sigma(i+1)} = \theta_{k,k+1} \quad \forall I_{\sigma(i)}$, dann gilt $\sigma = id$.

Minimum Obligate Breaks Criterion

Find Order(RH-data) minbreaks = MAX_INT order foreach permutation σ $b = \sum_{i=1}^{m} B_i(\sigma)$ (Sum of min. obligate breaks) if $b < \min$ minbreaks minbreaks = border = σ end if return order;

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

59 / 1

Minimum Obligate Breaks Criterion

- matlab/octave-Code auf http://compbio.charite.de
- Berechnungen von Bishop and Crockford, Comparisons of radiation hybdrid mapping and linkage mapping, Cytogenet Cell Genet 59:93–95 (1992)
- Einfacher Algorithmus, jedoch O(N!) und nicht praktisch für viele Marker
- Andere Algorithmen (Maximum likelihood, maximum posterior probability, u.a)

STS-Marker und Bestrahlungshybridzellen

- STS: Sequence-tagged site (sequenzmarkierte Stellen)
- Nicht polymorph, einmalig vorkommende Sequenz
- Mit PCR nachzuweisen
- Spezifität durch 2 Primer bzw. Größe des Amplifikats

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

61 / 1

STS-Marker und Bestrahlungshybridzellen

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt

STS-Marker und Bestrahlungshybridzellen

- Hudson et al. (1995) An STS-based map of the human genome. Science.
 270:1945–54.
- 15.086 STSs
- RH Karte mit 6103 Loci wurde erstellt und mit einer genetischen Karte mit 5264 Loci kombiniert
- Durchschnittlicher Abstand von 199 kb
- Gerüst für Hochdurchsatzsequenzierung des menschlichen Genoms

Peter N. Robinson (Charité)

Kartierung des menschlichen Genoms

2. Juni 2008

63 / 1

Sequenzierung

Urheberrechtlich geschütztes Bild entfernt