

3.5 Physikalische Kartierung nichtpolymorpher Proteinspots von 2DE-Gelen

3.5.1 Vorgehensweise

Fünf identifizierte Proteinspots eines 2D-Gels der cytosolischen Fraktion des Gehirns von B6 wurden als Modellproteine für die exemplarische, physikalische Kartierung nicht-polymorpher Proteine eingesetzt. Für die identifizierten Proteinsequenzen oder deren DNA-Sequenz wurden Homologievergleiche mit der Datenbank dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/> und Boguski et al. 1993) durchgeführt, um eine EST-Sequenz (expressed sequence tag) zu erhalten. EST-Klone wurden im Rahmen des I.M.A.G.E Konsortiums der Allgemeinheit zugänglich gemacht und sind über vier Verteiler weltweit erhältlich (Lennon et al. 1996). Die Kartierung der Protein-spezifischen EST-Klone erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die EST-Sequenzen radioaktiv markiert und gegen eine Maus BAC-Klonbank hybridisiert, die 8 Genomäquivalenten entspricht. Im zweiten Schritt wurden die BAC-Klone als Substrat für IRS-PCR eingesetzt. Die erhaltenen Produkte wurden gegen YAC-Filter hybridisiert, die IRS-PCR Amplifikate mehrerer YAC-Klonbanken enthielten. Diese YAC-Klonbanken wurden zur Erstellung einer physikalischen Karte des Mausgenoms verwendet (Nusbaum et al. 1999; Schalkwyk et al., eingereicht bei Genome Research und <http://www.molgen.mpg.de/~rodent/>). Identifizierte YAC-Klone, die bereits einer chromosomalen Region oder einem YAC-Kontig zugeordnet worden waren, ergeben sehr genaue Kartierungspositionen für die cDNA und damit den Proteinspot des 2DE-Gels.

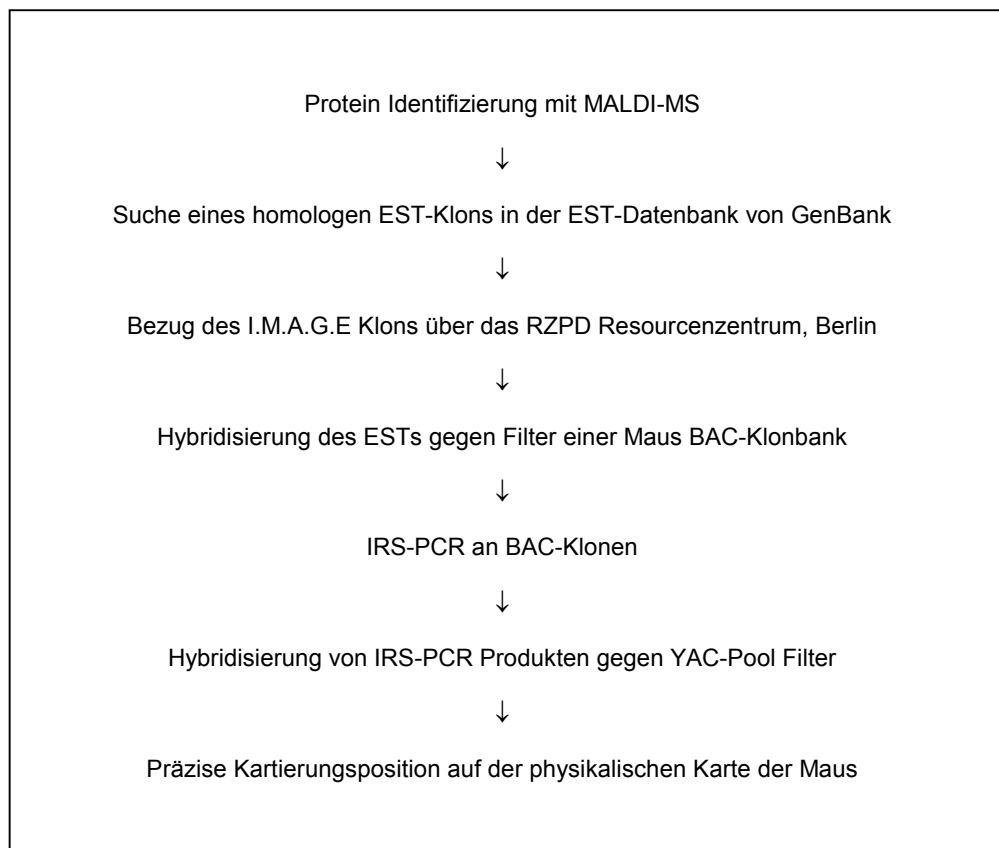


Abb.3.5.1: Strategie zur physikalischen Kartierung von EST-Sequenzen, die mit MALDI-MS identifizierten 2D-Spots korrespondierten.

3.5.2 Proteinidentifizierung und Identifizierung eines entsprechenden cDNA-Klons

Für fünf identifizierte Proteinspots (Gauss et al. 1999) wurden mit den Programmen 'blast' und 'tblastn' (URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) in der Datenbank dbEST des NCBI die homologen cDNA-Klone, I.M.A.G.E. Klone 554173, 735764, 1226504, 735764 und 905204, identifiziert. Diese wurden vom RZPD, Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenom-Projektes, Berlin, unter den Bezeichnungen bezogen und zur Kontrolle sequenziert. Die DNA-Sequenzen der ESTs 1 und 2 zeigten der 2D-Gelspots A4_199 und B2_017 auf Aminosäuresequenzebene 98% bzw 95% Homologie zum identifizierten Protein Albumin bzw. Neurofilament Triplet L Protein. Drei weitere I.M.A.G.E Klone (1226504, 735764 und 905204) erwiesen sich nach Sequenzierung ebenfalls als Sequenzen, die dem identifizierten Proteinspot angehörten (Tab.3.5.2).

Tab.3.5.2: Proteinspot, Identifizierung und korrespondierender cDNA / I.M.A.G.E Klon

Protein Spot des 2DE Gels	MALDI Identifizierung	Suche nach einer homologen cDNA-Sequenz des I.M.A.G.E. Konsortiums / Kontrollsequenzierung zur Bestätigung der korrekten Identität des I.M.A.G.E Klons
A4_199 mv83 Chr5	ALBU_MOUSE P027724 Albumin	GenBank Est division: gb AA103180 <i>Mus musculus</i> cDNA I.M.A.G.E. Klon 554173 (Länge 588bp) Sequenzierung: 549 translatierte Nukleotide zeigen 98% Identität zu Albumin Maus Genom Datenbank: MGI:87991, <i>Alb1</i>
B2_017 mv147 Chr9	NFL_MOUSE P08551 Neurofilament triplet L Protein	GenBank Est division: gb AA269839 <i>Mus musculus</i> cDNA I.M.A.G.E. Klon 735764 (Länge 511bp) Sequenzierung: 309 translatierte Nukleotide zeigen 95% Identität zu Neurofilament triplet L Protein Maus Genom Datenbank: MGI:97313, <i>Nfl</i>
(Standardnr?) mv8 Chr14	GMF-beta Glia maturation factor RAT Z11558	GenBank Est division: gb M86492 <i>Mus musculus</i> cDNA I.M.A.G.E. Klon 1226504 Die Sequenzierung bestätigt die Identität des I.M.A.G.E Klons Maus Genom Datenbank: MGI:1927133, <i>Gmfb</i>
C5_151 mv138 Chr3	CAH2_MOUSE P00920 Carbonic Anhydrase II	GenBank Est division: gb T97140 <i>Mus musculus</i> cDNA I.M.A.G.E. Klon 735764 Die Sequenzierung bestätigt die Identität des I.M.A.G.E Klons Maus Genom Datenbank: MGI:88269, <i>Car2</i>
C6_072 mv142 Chr16	DHCA_MOUSE P48758 Carbonyl reductase I	GenBank Est division: gb AA521837 <i>Mus musculus</i> cDNA I.M.A.G.E. Klon 905204 Die Sequenzierung bestätigt die Identität des I.M.A.G.E Klons Maus Genom Datenbank: MGI:88284, <i>Cbr1</i>

3.5.3 Kartierung von I.M.A.G.E cDNA-Klonen mittels IRS-PCR auf YAC-Klonen

Identifizierung von genomischen BAC-DNA-Klonen für IRS-PCR

Der direkte Weg der Hybridisierung eines EST-cDNA-Klons gegen YAC-Klonbanken wurde nicht besprochen, denn bei Aufbringen von YAC-Klon-DNA auf Nylonmembranen wird nur eine geringe Menge der YAC-klonierten, genomischen DNA auf dem Filter gebunden. Diese reicht als Substrat für die Hybridisierung der radioaktiv markierten cDNA kaum aus.

Stattdessen wurden die cDNAs gegen ein Filterset einer Maus-BAC-Klonbank hybridisiert. Das Filterset bestand aus 7 Filtern der Grösse 22 x 22 cm, die jeweils ca. 27000 BAC-Klone der Platten 1-504 enthielten, entsprechend 8 Genomäquivalenten genomischer DNA. BAC-Kolonien enthalten mehr Zellen pro Kolonie als YAC-Kolonien und daher wesentlich mehr klonierte, genomische DNA als YAC-Kolonien. Ausserdem lassen sich die Bakterienzellen nach Aufbringen auf die Nylonmembran leichter lysieren als die Hefezellen. BACs ergeben daher bei Hybridisierung mit einer cDNA deutliche Hybridisierungssignale.

Die cDNA des Locus *Alb1* hybridisierte mit folgenden 12 BAC-Klonen: mbacr63i2, mbacr154b6, mbacr198g5, mbacr224c23, mbacr239i6, mbacr239h3, mbacr302o18, mbacr295n4, mbacr466j18, mbacr480o20, mbacr476b16 und mbacr482k11.

Die cDNA des *Nfl*-Locus hybridisierte mit den folgenden 7 BAC-Klonen: mbacr28e7, mbacr21k15, mbacr77g3, mbacr75m22, mbacr296n3, mbacr406k22 und mbacr405d17.



Abb.3.5.3.a) Koloniefilter-Hybridisierung. Hybridisierung einer cDNA gegen BAC-Klon-Filter: das radioaktiv markierte EST des Albumin Locus hybridisiert mit 3 BAC-DNAs eines BAC-Filters, der 27000 BAC-Klone enthält. Jede BAC-DNA ist doppelt aufgetragen, damit Signale von Hintergrundverunreinigungen besser zu unterscheiden sind. (Jeweils ein dritter schwarzer Punkt stammt von der Auswertung und stellt kein Hybridisierungssignal dar).

BAC-Klone wurden der Klonbank entnommen und auf Agarplatten ausgestrichen. Da Klonbanken Kontaminationen oder mehrere Klone pro Loch enthalten können, wurde DNA von einer BAC-Einzelkolonien isoliert. Die BAC-DNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, damit sie auf einem Agarosegel getrennt werden und auf eine Nylonmembran übertragen werden konnte. Die Hybridisierung des Southern-Blots mit der radioaktiv markierten cDNA ergab nur für etwa jeweils die Hälfte der BAC-Klone eine Bestätigung der erwarteten Identität.

Für den Albumin Locus konnten von den 12 oben genannten BAC-Klonen die fünf folgenden Klone bestätigt werden: mbacr154b6, mbacr198g5, mbacr239h3, mbacr295n4, mbacr466j18; für den *Nfl*-Locus von 7 Klonen fünf: mbacr28e7, mbacr77g3, mbacr75m22, mbacr296n3, mbacr406k22; für den Locus *Car2* von 15 Klonen sechs: mbacr131d8, mbacr131g6, mbacr393i10, mbacr484k10, mbacr469l14, mbacr482d14; für den Locus *Cbr1* von 18 Klonen 15: mbacr34i8, mbacr6e1, mbacr6e3, mbacr36h11, mbacr97l18, mbacr125j10, mbacr197o16, mbacr197c7, mbacr279h8, mbacr255e9, mbacr356l15, mbacr405p6, mbacr363a5, mbacr484i7, mbacr488g9; für den Locus *Gmfb* von 9 Klonen fünf: mbacr90n15, mbacr329b12, mbacr336k13, mbacr369d12 mbacr452k8.

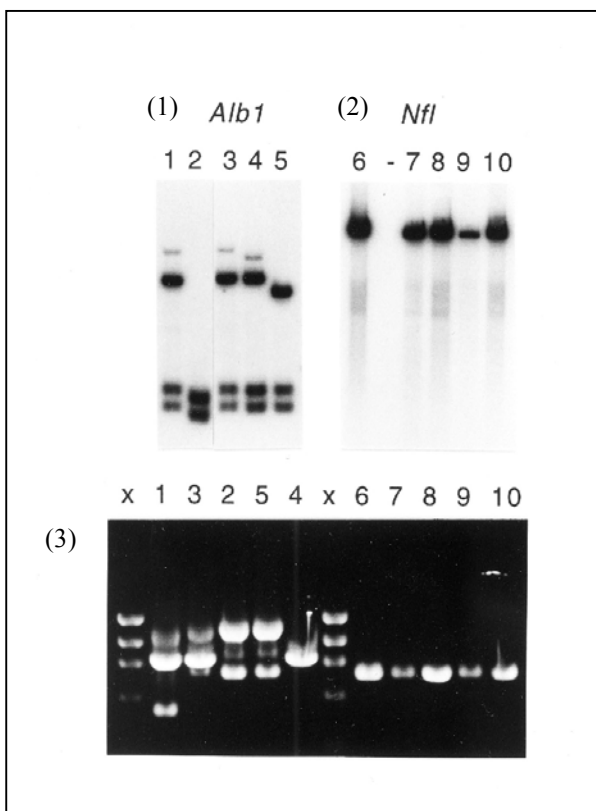


Abb.3.5.3.b) Southernblot-Hybridisierung.

(1) und (2): Hybridisierung von restriktionsverdauten, geblohteten BAC-Klonen mit der entsprechenden, radioaktiv markierten cDNA. Das Restriktionsfragmentmuster der BAC-Klone ist für alle Klone ähnlich und weist darauf hin, dass die Klone der gleichen Region des Genoms angehören. Die cDNA des Albumin Locus hybridisierte mit fünf BAC-Klonen, die cDNA des *Nfl*-Locus hybridisiert mit dem gleichen Restriktionsfragment von ebenfalls fünf BAC-Klonen.

(3) IRS-PCR-Produkte der in (1) und (2) gezeigten BAC-Klone. Die BAC-Klone des Albumin Locus können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Klon 1, 3 und 4 zeigen ein 900bp IRS-Produkt und Klone 2 und 5 zeigen ein 800bp und ein 1200bp Produkt. Alle IRS-Produkte wurden für Hybridisierungen gegen YAC-Bibliotheken eingesetzt. Die BAC-Klone des *Nfl*-Locus zeigen ein einziges 700bp-IRS-Produkt.

Herstellung der IRS-PCR Produkte von genomischen BAC-DNA Klonen

Die direkte Hybridisierung von radioaktiv markierter BAC-DNA gegen YAC-Koloniefilter wurde durchgeführt, stellte sich jedoch als schwierig heraus und erforderte eine sehr lange Expositionszeit des Filters von 14 Tagen bei -80°C (nicht gezeigt). Eine weitere Limitierung dieser Vorgehensweise stellten die zur Verfügung stehenden YAC-Koloniefilter dar. Ein YAC-Koloniefilter kann nach der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde nicht dehybridisiert werden, da zuviel YAC-DNA abgewaschen würde. Eine Wiederverwendung für eine weitere Hybridisierung kann deshalb erst nach einigen Wochen erfolgen, wenn das radioaktive ^{32}P der zuvor verwendeten Hybridisierungsprobe zerfallen ist. YAC-Koloniefilter sind aufwendig in der Herstellung und deshalb nicht in grosser Stückzahl vom RZPD Ressourcenzentrum, Berlin, erhältlich.

Eine wesentlich effektivere Möglichkeit, identifizierte BAC-Klone den physikalisch kartierten YAC-Klonen zuzuordnen, bestand darin, mit dem Primer B1R in einer PCR-Reaktion Teile des BAC-Klons zu amplifizieren und diese IRS-PCR Produkte gegen IRS-PCR Amplifikate von YAC-Klonen zu hybridisieren. Von 80% der BAC-Klone konnten ein oder mehrere IRS-PCR Produkte amplifiziert werden.

Von BAC-Klonen des Locus Albumin konnten IRS-PCR Fragmente der Länge 900 bp, 500bp, 800 bp und 1200 bp amplifiziert werden.

Alle 5 BAC-Klone des Locus *Nfl* zeigten ein einziges IRS-PCR Produkt von 700 bp.

Der Locus *Car2* wurde repräsentiert durch ein IRS-Produkt von ca 1000bp, das in 6 BAC-Klonen vorhanden war sowie durch eine Doppelbande der Grösse 1100bp/1200 bp eines 7. BAC-Klons.

Für den Locus *Cbr1* fanden sich 15 bestätigte BAC-Klone: von 14 BACs konnte ein charakteristisches IRS-PCR Produkt von 1500bp Länge amplifiziert werden, ein weiteres charakteristisches das 500-300bp lange Fragment (8 Klone) und ein 700-300bp langes in 3 Klone; ein 1000bp langes trat gekoppelt mit einem 1500bp langen in einem Klon auf und wurde ebenfalls zum Screening der YAC-Bibliotheken verwendet. BAC-Klone, die den Locus *Gmfb* repräsentieren, zeigten alle 7 ein 800bp langes IRS-PCR Produkt, einer der Klone ein zusätzliches 1300bp-Produkt.

Hybridisierung von IRS-PCR Produkten der BACs gegen YAC-Klonbanken

Alle IRS-PCR Produkte, die von BAC-Klonen eines Locus amplifiziert werden konnten, wurden radioaktiv markiert und gegen IRS-PCR amplifizierte YAC-Klone hybridisiert. Hybridisierungsfiler (<http://www.molgen.mpg.de/~rodent/> und Schalkwyk et al, eingereicht bei Genome Research) enthielten auf einer Fläche von 7 x 11 cm IRS-PCR Amplifikate von YAC-Pools (Mischungen) der YAC-Klonbanken 910, 917 sowie der Klonbanken 902 und 903 (siehe Material und Methoden). Die Vorgehensweise, YAC-Klone aus Mikrotiterplatten einer Klonbank nach einem dreidimensionalen Schema zu vereinigen (siehe Kap.2.1.3 und Hunter et al. 1994), erlaubt es, die 61 000 der vier Klonbanken zu 2243 Klonmischungen

zusammenzufassen und deren PCR-Produkte auf einen Filter der Grösse 7 x 11 cm aufzubringen. Da die Klonmischungen in drei räumlichen Dimensionen hergestellt wurden, sind für die Identifizierung eines YAC-Klons durch eine Hybridisierungsprobe drei Hybridisierungssignale notwendig (Kap.2.1.3).

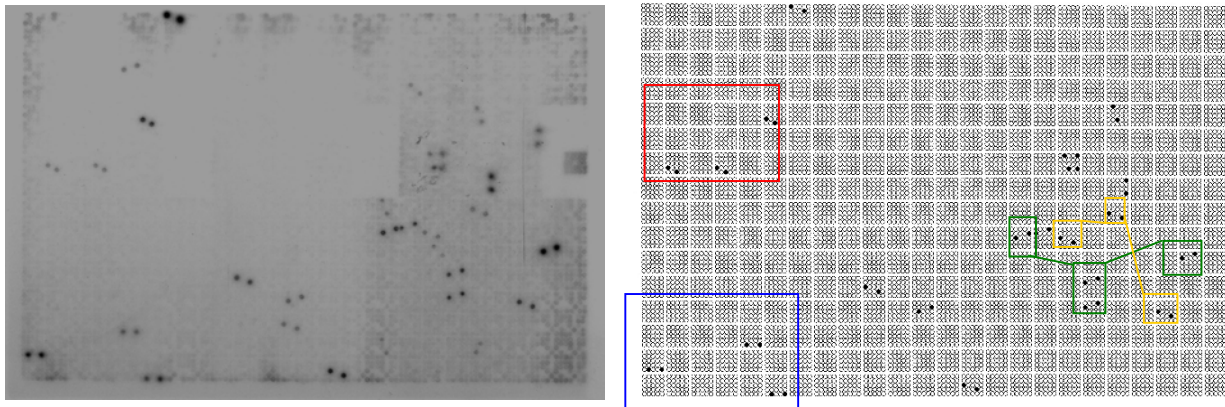


Abb.3.5.3.c) Autoradiogramm der Hybridisierung eines radioaktiv markierten IRS-PCR-Produkts gegen einen YAC-Filter. Das IRS-PCR-Produkt stammt vom BAC-Klon mbacr28e7, der den *Nfl*-Locus repräsentiert. Die rechte Abbildung zeigt die Signale nach Auswertung und Dateneingabe in eine Vorlage: je drei (oder vier) Signale identifizieren einen YAC-Klon. Auf diesem Filter konnten vier YAC-Klone identifiziert werden (farbige Kästen).

Das 900bp grosse IRS-PCR Produkt des **Locus *Alb1*** hybridisierte mit den folgenden 13 YAC-Klonen: whtII81h1, whtII208h10, whtII231d7, whtII308c7, whtII393d1, whtII434h3 ICRFy90252f7, ICRFy90257h8, ICRFy902118e10, ICRFy902122h9, ICRFy902132a6 WHTy91095e2, WHTy91096g2.

Drei dieser YAC-Klone - whtII308c7, whtII393d1, whtII434h3 - gehören dem Kontig WC5.38 auf Mauschromosom 5 an (<http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/mouse/index>) und enthalten den Mikrosatellitenlocus D5Mit361. Im Bericht des Komitees für Mauschromosom 5 (Chromosome Committee Reports, siehe <http://www.informatics.jax.org/bin/ccr/index>) werden für der Mikrosatellitenlocus D5Mit361 und der Locus Alb1 die Positionierung auf Maus Chr 5 bei 50cM angegeben (Abb.5.3.5.d)(1)). Unser Kartierungsergebnis stimmt mit den existierenden Kartierungspositionen überein (<http://www.informatics.jax.org/bin/ccr>). Die Hybridisierungen der YAC-Filter mit den weiteren IRS-PCR-Produkten von 500bp, 800bp und 1200bp Länge ergeben insgesamt 26 positive YAC-Klone. Diese gehören den unterschiedlichsten Kontigs an (Chr1,3,5,10,12,13,14,15,16,19).

Das 700bp grosse Fragment des ***Nfl*-Locus** detektierte folgende 11 YAC-Klone: ICRFy902138e9, ICRFy90253c8, ICRFy90347d6, ICRFy90347h6, WHTy91011d11, WHTy91011e11, WHTy910145e10, whtII270f8, whtII276a5, whtII380g10, whtII417g5.

Nur ein einziger YAC-Klon war bereits charakterisiert und liegt im Kontig WC14.25 auf Chromosom 14. 5 weitere YACs der insgesamt 11 YAC-Klone wurden jedoch durch Hybridisierung von YAC-abgeleiteten IRS-PCR Produkten YAC-Klonen aus Kontig WC14.25 zugeordnet (Abb.3.5.3.d)(2)). Diese Daten stammen aus dem Mausgenom-Kartierungsprojekt des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik (L. Schalkwyk und H. Himmelbauer unveröffentlicht, und <http://www.molgen.mpg.de/~rodent>). Kontig WC14.25 ist über die Kartierung des Mikrosatellitenlocus D14Mit28 auf der genetischen Karte der Maus verankert. D14Mit28 sowie der Locus *Nfl* liegen auf der Maus Konsensuskarte (<http://www.informatics.jax.org/bin/ccr>) auf Chromosom 14 bei 28,5 cM.

Das 1000bp Produkt des **Locus *Car2*** trifft 3 YACs (WHTy91034a12, WHTy91086f8, WHTy9102a12), das 1100/1200 bp trifft 12 YACs (einschliesslich der drei durch das 1000bp Fragment identifizierten. Wie beim *Nfl*-Locus trifft das 1000bp Fragment nur YACs der Whitehead Klonbank 910, die keinem Kontig angehören und nicht mit Mikrosatellitenmarkern typisiert wurden. Da jedoch zwei der drei YAC-Klone (WHTy91086f8, WHTy9102a12) von Hybridisierungsproben der beiden YAC-Klone whtII141f3 und whtII165d10 getroffen werden, die beide dem Kontig WC3.4 zugehören, kann man annehmen, dass der Locus *Car2* auf YAC-Klonen des Kontigs WC3.4 liegt. YACs des Kontigs 3.4 sind über den Mikrosatellitenmarker D3Mit237 bei 4,4 cM auf der Konsensuskarte der Maus lokalisiert. Dies stimmt gut mit unserer genetischen Kartierung des varianten Proteinspots (siehe Anhang Chromosomenkarten) bei Marker D3Mit61 (CCR 2,2cM) überein. Die Konsensuskarte der Maus (CCR) positioniert *Car2* hingegen bei 10,5 cM.

Der **Locus *Cbr1*** wird durch das 1500bp IRS-Fragment des BAC-Klons MBAC488g9 repräsentiert. Die Hybridisierung mit dem IRS-Fragment identifizierte 4 verschiedene YAC-Klone, einer davon gehörte Kontig 16.32 an, während drei weitere im Rahmen der Erstellung einer physikalischen Karte (Schalkwyk und Himmelbauer) über Hybridisierungsexperimente sekundäre YACs identifizierten die ebenfalls alle dem Kontig 16.32 angehörten. Zwei davon zeigen auch Zugehörigkeit zu Kontig 8.7. Die Lokalisation der cDNA des Locus *Cbr1* in Kontig 16.32, das über D16Mit128 und D16Mit95 bei 66,3 cM auf der Maus Konsensuskarte verankert ist, entspricht der im CCR angegebenen bei 67cM. Das 1000 bp IRS-Fragment ergab gleiche Hybridisierungsergebnisse, während mit dem 300-700bp und dem 300-500bp grossen Fragment keine Ergebnisse erzielt wurden.

Das 800bp IRS-Produkt der ***Gmfb***-spezifischen BAC-Klone hybridisiert mit drei YAC-Klonen, zwei davon (WHTy910185h8 und WHTy910185h9) stammen aus der gleichen Mikrotiterplatte und nebeneinanderliegenden Löchern und sind daher nicht als unabhängige Klone, sondern Kreuzkontamination zu betrachten. WHTy910177h8 und WHTy910185h8 wurde von Himmelbauer auf Chromosom 14 bzw. auf Chromosom 10 kartiert. Beide Klone sind zu jeweils 5 YACs gekoppelt, die zu

Kontig 14.14 gehören. Kontig WC14.14 ist über die Mikrosatellitenmarker D14Mit134, D14Mit4 und andere bei 19,5 bzw. 16,5 cM auf der Maus-Konsensuskarte lokalisiert. Unsere genetische Kartierung des varianten Proteinspots mV8 schlägt in Bezug auf den Ankermarker D14Mit45 (12,5cM) den Bereich von 18-27 cM vor und stimmt daher mit der Lokalisation des Kontigs überein. Die beiden primären YACs, die direkt ein Kontig identifizieren, werden von sehr vielen gemeinsamen IRS-Proben getroffen und es ist nicht ganz klar, ob es sich nicht doch um identische oder bei der PCR vermischte Proben handelt.

Zusammenfassend wurden die folgenden Regeln angewendet, um Lokalisationen von cDNAs auf YAC-Kontigs zu erhalten:

Da 50% der YAC-Klone genomische DNA aus verschiedenen Regionen des Genoms enthalten (man nennt sie chimärisch) und deshalb mehreren YAC-Gruppen (Kontigs) zugeordnet sind lässt sich eine cDNA nur dann einem bestimmten Kontig zuordnen, wenn

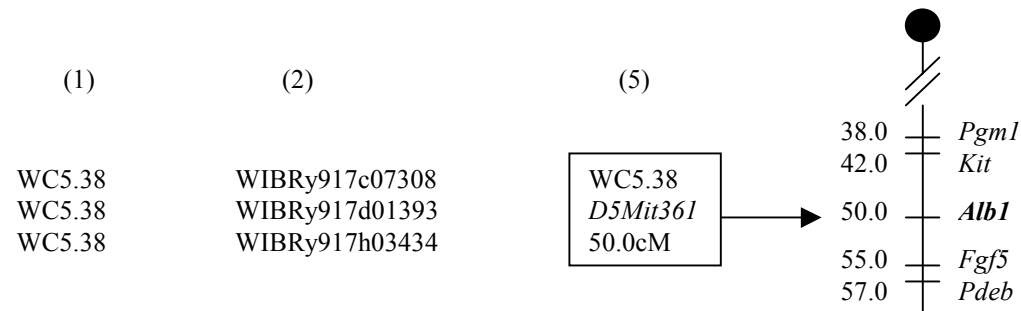
- a) über den BAC-Klon mindestens zwei YAC-Klone identifiziert werden, die gleiche Anteile genomischer DNA enthalten und deshalb in dasselbe Kontig fallen (Bsp. Albumin) (Identifizierung über zwei 'primäre' YAC-Klone)
- b) zwei YAC-Klone identifiziert werden, die über IRS-PCR Produkte jeweils einen weiteren YAC identifizierten, und die beiden 'sekundären' YAC-Klone demselben Kontig angehören (siehe Abb. *Car2*) (Identifizierung über zwei sekundäre YAC-Klone)
- c) wenn ein primärer und ein sekundärer YAC demselben Kontig angehören (z.B. *Nfl*).

Abb.3.5.3.d) cDNA-Kartierungen:

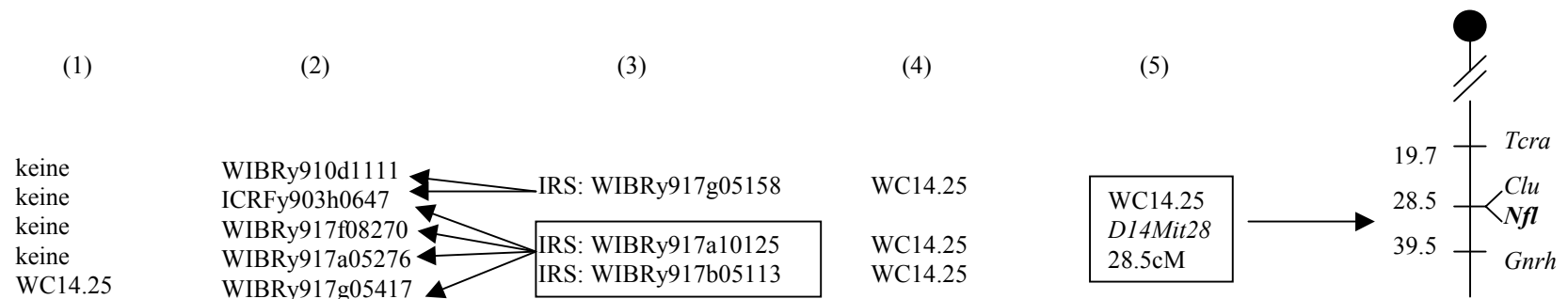
Kartierung von *Alb1* auf Maus Chromosom 5 und *Nfl* auf Maus Chromosom 14. Als locuspezifische Hybridisierungssonden dienten die angegebenen, von BAC-Klonen amplifizierte IRS-PCR Produkte. (2) YAC-Klone, mit denen das jeweilige locuspezifische BAC-IRS Produkt hybridisierte. (1) Angabe des Kontigs für YAC-Klons aus (2) aus der Whitehead Institute Datenbank (URL:<http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/mouse/index>). Unter (3) sind YAC-Klone aufgelistet, die mit YAC-Klonen aus (2) überlappen und daher demselben Kontig zugeordnet werden können. Diese Daten sind unpublizierte Daten des Max-Planck Instituts für Molekulare Genetik, Berlin. Sie basieren auf Kreuzhybridisierung von IRS-PCR Produkten, die von YAC-DNA amplifiziert wurden. (4) Physikalisch Kartierungsposition der YAC-Klone aus (3) entsprechend der Whitehead Institute Datenbank. (5) Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse. Angabe des Kontigs und eines genetisch kartierten Markers, der das Kontig an die genetische Karte der Maus anschliesst. Genetische Abstände in (cM) entsprechen den Angaben in den Berichten der Komitees für die jeweiligen Mauschromosomen (<http://www.informatics.jax.org/bin/ccr/>), wie im Chromosome Committee Report - der Konsenskarte der Maus (<http://www.informatics.jax.org/bin/ccr/>)

(1) *Alb1*

Hybridisierungssonde: MBAC239h3-900

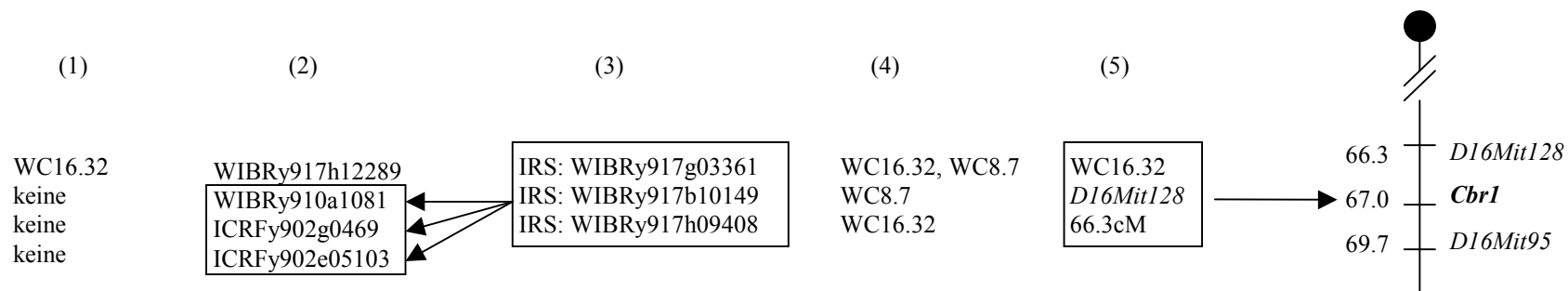
(2) *Nfl*

Hybridisierungssonde: MBAC28e7-700



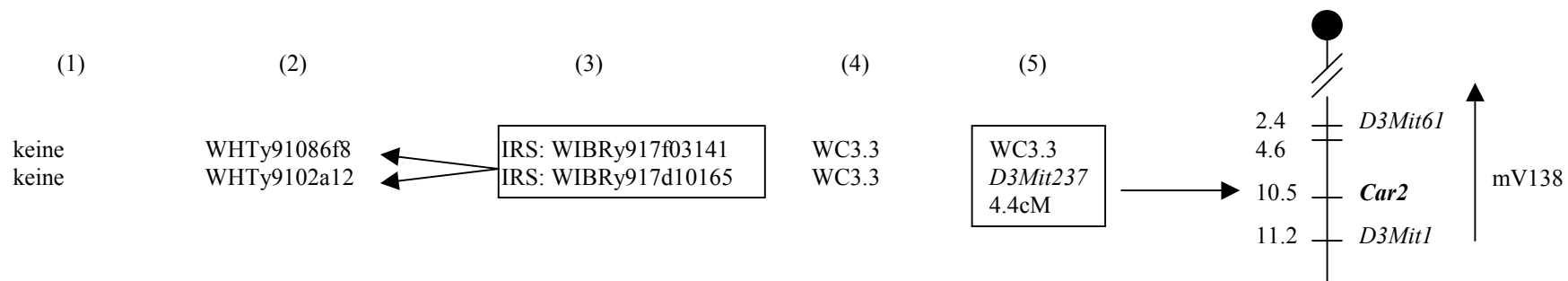
(3) *Cbr1*

Hybridisierungssonde: MBAC488g9-1500



(4) *Car2*

Hybridisierungssonde: MBAC484k10-1000



(5) *Gmfb*

Hybridisierungssonde: MBAC434j5_800

