

Texte

**27**  
**05**

ISSN  
0722-186X

**Entwicklung und Validierung eines  
*Caenorhabditis elegans*  
Biomonitor-Tests auf DNA-Ebene  
(Transkriptionsebene) zur Prüfung  
von Arzneimitteln, Bioziden  
und anderen Umweltchemikalien**

**Umwelt  
Bundes  
Amt** 

Für Mensch und Umwelt

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES  
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,  
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 201 67 428  
UBA-FB 000671



**Entwicklung und Validierung  
eines *Caenorhabditis elegans*  
Biomonitor-Tests auf DNA-  
Ebene (Transkriptionsebene)  
zur Prüfung von Arzneimitteln,  
Bioziden und anderen  
Umweltchemikalien**

von

**Dr. Ralph Menzel und  
Kerstin Reichert**

Institut für Biologie  
AG Ökotoxikologie & Biochemie der Freien Universität Berlin

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter <http://www.umweltbundesamt.de> verfügbar.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung Rechte Dritter.  
Die in der Studie geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt  
Postfach 14 06  
06813 Dessau  
Tel.: 0340/2103-0  
Telefax: 0340/2103 2285  
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet IV 2.3

Dessau, Dezember 2005

### Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB 000671/1	2.	3.
4. Titel des Berichts Entwicklung und Validierung eines <i>Caenorhabditis elegans</i> Biomonitor-Tests auf DNA-Ebene (Transkriptionsebene) zur Prüfung von Arzneimittel, Bioziden und anderen Umweltchemikalien		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Dr. Menzel, Ralph Reichert, Kerstin 6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Freie Universität Berlin Institut für Biologie - Ökotoxikologie & Biochemie Ehrenbergstraße 26-28 14195 Berlin	8. Abschlussdatum 15.02.2004	9. Veröffentlichungsdatum
	10. UFOPLAN-Nr. 201 67 428	11. Seitenzahl 158
	12. Literaturangaben 69	13. Tabellen und Diagramme 22
	14. Abbildungen 24	
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt Postfach 33 00 22 14191 Berlin	15. Zusätzliche Angaben -	
16. Zusammenfassung Ziel des vorgestellten Projektes war die Entwicklung eines Biomonitor-Tests auf Transkriptionsebene mit dem Nematoden <i>Caenorhabditis elegans</i> zur Prüfung von Arzneimittel, Bioziden und anderen Umweltchemikalien im subletalen Konzentrationsbereich. Dabei sollte geprüft werden, ob Veränderungen im Genexpressionsmuster durch die eingesetzten Testsubstanzen hervorgerufen werden und inwiefern signifikante Effektschwellen früher als in einem klassischen Biotest überschritten werden. Für die Erfassung der schadstoffbedingten Veränderungen in den Genexpressionsmustern wurden drei molekularbiologische Testsysteme entwickelt: eine semiquantitative Single worm RT-PCR, ein transgener GFP-Reporter Nematodenstamm und ein low density DNA Array, der „Celegans Toxchip“. Die Entwicklung und Validitätsprüfung des Celegans Toxchip stand dabei im Mittelpunkt der Arbeiten. Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden für eine stärkere Aussagekraft von Reproduktionstests im Flüssigmedium und im Boden begleitet. Die Reprotests wurden optimiert und für bis zu neun verschiedene Testsubstanzen standardisiert durchgeführt. Dabei zeigte sich für alle Testsubstanzen eine Konzentrations-Effekt-Beziehung. Dadurch wird die Eignung des Nematoden <i>C. elegans</i> als ökotoxikologischer Testorganismus bestätigt. Basierend auf gesamtgenomischen Analysen gelang erstmalig die Identifikation von 64 potenziell schadstoffinduzierbaren <i>C. elegans</i> Genen, die Amplifikation bzw. Klonierung von entsprechenden cDNA Fragmenten und deren Reinigung. Mit Hilfe dieser Fragmente und einer Reihe von Kontrollproben wurde anschließend der Celegans Toxchip als ein low density DNA Array durch Besspotten von poly-L-Lysin beschichteten Glas-Slides hergestellt und unter Einbeziehung von sieben Testsubstanzen intensiv getestet. Parallel dazu wurde die Expression von vier Cytochrom P450 Genen mittels RT-PCR quantifiziert und die Fluoreszenzemission eines transgenen Nematodenstammes gemessen, welcher unter Kontrolle eines Cytochrom P450 Promotors das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert. Dabei folgten die Hauptexperimente immer einem einheitlichen Schema: Die Nematoden wurden in An- und Abwesenheit der jeweiligen Testsubstanz inkubiert, anschließend geerntet, (die Fluoreszenz vermessen) ihre RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die jeweilige Quantifizierung der induzierten Genexpression zeigte, dass signifikante Effekte bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen auftraten als in den herkömmlichen Reproduktionstests. Insbesondere der GFP Test und die RT-PCR Untersuchungen zeigten eine signifikante und reproduzierbare Konzentrations-Effekt Abhängigkeit. Die verwendeten Untersuchungssysteme erwiesen sich als hochempfindliche und schnell einsetzbare Biomonitor-Test und bestätigten die hohe Nützlichkeit des Faktors der schadstoffinduzierten Genexpression als funktionalen Endpunkt in ökotoxikologischen Tests.		
17. Schlagwörter	Ökotoxikologie, Xenobiotika, Reproduktionstest, <i>Caenorhabditis elegans</i> Biomonitor-Test, Biomarker, Genexpression, Nematoden, DNA-Array	
18. Preis	19.	20.

### Report Cover Sheet

1. Report No. UBA-FB 000671/1	2.	3.
4. Report Title Development and validation of a <i>Caenorhabditis elegans</i> biomonitor system on the DNA level (transcription) to test drugs, biocides, and other pollutants		
5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s) Dr. Menzel, Ralph Reichert, Kerstin	8. Report Date February 15, 2004	9. Publication Date
	6. Performing Organisation (Name, Address) Free University Berlin Institute for Biology - Ecotoxicology & Biochemistry - Ehrenbergstraße 26-28 14195 Berlin Germany	
7. Funding Agency (Name, Address) Umweltbundesamt (Federal Environmental Agency) Postfach 33 00 22, 14191 Berlin	10. UFOPLAN-Ref. No. 201 67 428	11. No. of Pages 158
	12. No. of Reference 69	13. No. of Tables, Diagrams 22
	14. No. of Figures 24	
15. Supplementary Notes		
16. Abstract The aim of this project was the development of a <i>Caenorhabditis elegans</i> biomonitor test on the transcriptional level to test drugs, biocides, and other pollutants using sublethal concentrations. It should be test, whether the used xenobiotics are able to induce changes in the gene expression pattern and how far significant effect levels were reached earlier then in case of classical biotests. To examine xenobiotically induced gene expression pattern three molecular biological test assays were developed: A semi-quantitative single worm RT-PCR, a transgenic GFP reporter strain and in particular a low density DNA array, the "Celegans Toxchip". The development and examination of the Celegans Toxchip was the main topic of this work. To compare the molecular biological methods with a classical biotest two types of reproduction assays, one in liquid medium and one in the soil, were added in addition. The reproduction assays were optimized and systematically performed with up to nine different xenobiotic substances. Typical concentration-effect dependencies were obtained in all experiments confirming the nematode <i>C. elegans</i> as an excellent ecotoxicological test organism. Based on the whole genomic analysis 64 individual genes were identified as potential xenobiotically induced. Derived cDNA fragments of these genes were amplified, cloned and purified. Using these fragment and couple of control samples the low density DNA array was created by spotting poly-L-lysin coated glass slides. The Celegans Toxchip assay was performed using seven different xenobiotic substances. In parallel expression of four different cytochrome P450 genes (CYP) were quantified using a semi-quantitative RT-PCR assay. In addition GFP fluorescence of a transgenic strain expressing GFP under control of CYP promoter was determined as a response to the presence of xenobiotics in the medium. All experiments followed the same protocol: The nematodes were cultivated in the presence and absence of the xenobiotic substance, harvested, (the fluorescence was measured), their RNA was isolated and reverse transcribed to cDNA. The quantification of the gene expression using the described three methods resulted in significant effects with much lower concentration of xenobiotics as in case of the reproduction assays. In particular the GFP and the RT-PCR assay showed a clear cut and reproducible concentration effect dependency. The used test methods has been proved as high sensitive and fast usable biomonitoring test systems and confirm the xenobiotically induced gene expression as a functional endpoint in ecotoxicological test systems.		
17. Keywords ecotoxicology, xenobiotica, biomonitor test, biomarker, gene expression, nematoda, DNA-array reproduction assay, <i>Caenorhabditis elegans</i>		
18. Price	19.	20.

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Inhaltsverzeichnis	4
Übersicht über die Abbildungen und Tabellen	7
Erläuterung der Abkürzungen, Maßeinheiten und Symbole	10
Glossar molekularbiologischer Begriffe	11
<b>1. Einleitung</b>	<b>15</b>
1.1. Aufgabenstellung	16
1.2. Voraussetzungen für das Vorhaben	17
1.3. Planung und Ablauf des Vorhabens	18
1.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand	20
1.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	21
<b>2. Hauptteil</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Methodik der Untersuchungen</b>	<b>22</b>
2.1.1. Nematoden und Bakterien	22
2.1.2. Medien	23
2.1.3. Eingesetzte Testsubstanzen	24
2.1.4. <i>Canorhabditis elegans</i> Reproduktionstest in Flüssigmedium	24
2.1.4.1. Durchführung des Reproduktionstestes	24
2.1.4.2. Auswertung der Daten	27
2.1.5. <i>Canorhabditis elegans</i> Reproduktionstest im Boden	28
2.1.5.1. Durchführung des Reproduktionstestes	29
2.1.5.2. Auswertung der Daten	31
2.1.6. Biomonitor-Test auf DNA-Ebene	32
2.1.6.1. Durchführung und Ernte einer <i>C. elegans</i> Synchron-Flüssigkultur	32
2.1.6.2. Gesamt-RNA Präparation	33
2.1.6.3. mRNA Präparation	34

2.1.6.4. Gesamtgenomischer DNA Microarray von <i>C. elegans</i>	35
2.1.6.4.1. Reverse Transkription und Hybridisierung	35
2.1.6.4.2. Datengewinnung und Auswertung	38
2.1.6.4.3. Der Celegans Toxchips	39
2.1.6.5.1. Die Produktion der Genfragmente für den Celegans Toxchip	39
2.1.6.5.2. Herstellung des Celegans Toxchips	45
2.1.6.5.3. Reverse Transkription und Hybridisierung	47
2.1.6.5.4. Datengewinnung und Auswertung	49
2.1.6.5. Single worm RT-PCR	50
2.1.6.6. Erfassung der Fluoreszenzemission des GFP produzierenden C. elegans Stammes	51
<b>2.2. Ergebnisse</b>	54
2.2.1. <i>Canorhabditis elegans</i> Reproduktionstest in Flüssigmedium	54
2.2.1.1. Voruntersuchungen zur Menge der Bakterienzugabe	54
2.2.1.2. Voruntersuchungen zum Einfluss des Lösungsmittels	55
2.2.1.3. Ergebnisse des Reproduktionstests für neun Chemikalien	56
2.2.2. <i>Canorhabditis elegans</i> Reproduktionstest im Boden	62
2.2.2.1. Untersuchungen zur maximalen Wasserhaltekapazität	62
2.2.2.2 Ergebnisse der Reproduktionstests im Boden für sechs Chemikalien	63
2.2.3. Biomonitor-Test auf DNA-Ebene	67
2.2.3.1. Gesamtgenomischer DNA-Microarray von <i>C. elegans</i>	67
2.2.3.2. Genauswahl für den Celegans Toxchip	74
2.2.3.3. Daten des Celegans Toxchips	77
2.2.3.3.1. $\beta$ -Naphthoflavon	79
2.2.3.3.2. Atrazin	80
2.2.3.3.3. Endosulfan	81
2.2.3.3.4. Fluoranthren	82
2.2.3.3.5. Clofibrat	84
2.2.3.3.6. Diethylstilbestrol (DES)	85

2.2.3.3.7. Tributylzinnchlorid (TBT)	85
2.2.4. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens der eigenen AG	86
2.2.4.1. Single worm RT-PCR zur Erfassung der Genexpression	87
2.2.4.2. GFP produzierender <i>C. elegans</i> Stamm als Biomonitor	90
<b>2.3. Diskussion</b>	<b>92</b>
2.3.1. <i>Canorhabditis elegans</i> Reproduktionstests	92
2.3.2. Gesamtgenomischer DNA Microarray	95
2.3.3. Biomonitor-Tests mit dem <i>C. elegans</i> Toxchip	95
2.3.4. Genexpressionstests mittels RT-PCR und GFP Reporterkonstrukt	106
2.3.5. Vergleich zwischen Reproduktions- und Genexpressionstests und Verwertbarkeit der Ergebnisse	107
<b>2.4. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens von dritter Seite</b>	<b>111</b>
<b>2.5. Veröffentlichungen der Ergebnisse</b>	<b>112</b>
<b>3. Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>4. Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>5. Anhang</b>	<b>121</b>



## ÜBERSICHT ÜBER DIE ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Tab. I	Zeitliche Aufgliederung der vier Teilvorhaben	20
Tab. II	Aufstellung der im Projekt eingesetzten Substanzen	25
Tab. III	Überblick der chemischen und physikalischen Parameter von LUFA 2.2 sowie der Konzentrationen verschiedener Schwermetalle und PAKs	28
Abb. 1	Hybridisierungskammer	37
Tab. IV	Zusammensetzung der Waschpuffer	38
Tab. V	Hybridisierungskontrollen auf dem Celegans Toxchip	40
Abb. 2	Spottingroboter MicroGrid II von BioRobotics	46
Abb. 3	Typisches Gelfoto isolierter RNA-Proben	48
Tab. VI	Zusammensetzung der Waschpuffer des Celegans Toxchip	49
Abb. 4	Agilent Microarray Scanner	50
Abb. 5	Nematodenreproduktion in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration	54
Abb. 6	Nematodenreproduktion in Abhängigkeit von der DMSO Konzentration im Medium	55
Abb. 7	Inhibierung der Nematodenreproduktion in Abhängigkeit von der gewählten Chemikalienkonzentration im Medium	57
Abb. 8	Inhibierung der Nematodenreproduktion in Abhängigkeit von der gewählten Chemikalienkonzentration im Medium	58
Tab. VII	Effektkonzentrationen für die Reproduktion von <i>C. elegans</i> inkubiert mit neun verschiedenen Chemikalien	58
Abb. 9	Reproduktion von <i>C. elegans</i> nach 96 h bei verschiedenen maximalen Wasserhaltekapazitäten des Bodens LUFA 2.2.	63
Abb. 10	Inhibierung der Nematodenreproduktion im Boden in Abhängigkeit von der gewählten Chemikalienkonzentration	64
Tab. VIII	Effektkonzentrationen für die Reproduktion von <i>C. elegans</i> im Boden inkubiert mit sechs verschiedenen Chemikalien	65

Tab. IX	Induktionsfaktoren der Cytochrom P450/ b5, GSTs, Carboxylesterasen und UDPGTs	68
Tab. X	Induktionsfaktoren von Genen mit unterschiedlicher Funktion	69
Tab. XI	Induktionsfaktoren für Gene unbekannter Funktion, die durch mehr als eine eingesetzte Testsubstanz induzierbar waren	70
Tab. XII	Induktionsfaktoren von Kollagen und C-type Lectin Genen	71
Tab. XIII	Repressionsfaktoren für Gene mit bekannter Funktion, die durch die eingesetzten Testsubstanzen reprimiert wurden	73
Tab. XIV	Genauswahl für den Celegans Toxchip	74
Abb. 11	Gelfotos der eingesetzten Genfragmente	76
Abb. 12	Restriktionsanalyse des Gens K09D9.2	77
Abb. 13	Zuordnung der Gen-IDs zu den Spots der Scannerfotos	78
Abb. 14	Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für $\beta$ -Naphthoflavon	79
Tab. XV	Zusammenfassung der durch $\beta$ -Naphthoflavon induzierten Gene des Celegans Toxchip	80
Abb. 15	Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für Atrazin	81
Tab. XVI	Zusammenfassung der durch Atrazin induzierten Gene des Celegans Toxchip	81
Abb. 16	Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für Endosulfan	82
Tab. XVII	Zusammenfassung der durch Endosulfan induzierten Gene des Celegans Toxchip	82
Abb. 17	Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für Fluoranthen	83
Tab. XVIII	Zusammenfassung der durch Fluoranthen induzierten Gene des Celegans Toxchip	83
Abb. 18	Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für Clofibrat	84

Tab. XIX	Zusammenfassung der durch Clofibrat induzierten Gene des Celegans Toxchip	84
Abb. 19	Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für DES	85
Tab. XX	Zusammenfassung der durch DES induzierten Gene des Celegans Toxchip	85
Abb. 20	Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für TBT	86
Tab. XXI	Zusammenfassung der durch TBT induzierten Gene des Celegans Toxchip	86
Abb. 21	Bestimmung der Expression von CYP35 Genen mittels semiquantitativer RT-PCR	88
Abb. 22	Graphische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR für die Gene CYP35A1, A2, A5 und C1	89
Abb. 23	Induktion der GFP Produktion in Abhängigkeit der gewählten Testsubstanz-Konzentration im Medium im Vergleich zur Kontrolle	91
Tab. XXII	Vergleichende Effektkonzentrationen für weitere Invertebraten	94
Abb. 24	Vergleichende Konzentrations-Effekt Plots aufgenommen für die Reproduktion und die induzierbare Genexpression von vier CYP35 Genen im Flüssigmedium	109

## ERLÄUTERUNG DER ABKÜRZUNGEN, MASSEINHEITEN UND SYMBOLE

A.bidest:	bidestilliertes Wasser
β -NF:	β-Naphthoflavon
bp:	Basenpaare
cDNA:	copy DNA
CYP:	Cytochrom P450 Gene
DEPC:	Diethyl Pyrocarbonat
DES:	Diethylstilbestrol
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DNA-Konz.:	DNA-Konzentration
dNTPs:	Desoxyribonukleotide
g:	gravity
Gen-ID:	interne Gen-Identitätsnummer
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GST:	Glutathion S-transferase
HSP:	Hitzeschock Protein
Konz.:	Konzentration
lfd. Nr.:	laufende Nummer
mRNA:	Boten Ribonukleinsäure
MT:	Metallothionin
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NGM:	Nutrition growth medium
OD:	optische Dichte
PAK:	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCB:	Polychlorierte Biphenyle
PCR:	Polymerase Kettenreaktion
RNA:	Ribonukleinsäure
RNAi:	RNA-Interferenz
rpm:	rounds per minute
RT:	Reverse Transkription
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
SEM:	Standardfehler des Mittelwertes
TBT:	Tributylzinnchlorid
UDPGT:	UDP-Glucuronosyltransferase
UV:	ultaviolett
Verd.:	Verdünnung
VTG:	Vitellogenin

## GLOSSAR MOLEKULARBIOLOGISCHER BEGRIFFE

**Arrays:** Vorlage, welche benutzt wird, um biologisches Material wie z.B. Nukleinsäuren, Peptide oder Proteine in hoher Dichte aufzutragen und zu binden. Arrays bestehen aus oder beinhalten eine feste Trägersubstanz die es erlaubt, große Mengen an Proben in geregelten Abständen aufzubringen, sodass diese für parallele Experimente genutzt werden können.

**Basenpaar (bp):** Zwei miteinander verbundene komplementäre Nukleotide einer Nukleinsäuresequenz. Zueinander komplementäre Basenpaare sind: Adenin und Thymin, sowie Guanin und Cytosin.

**Biochips:** siehe Arrays.

**cDNA:** siehe komplementäre DNA.

**Cy3:** In der Molekularbiologie häufig benutzter Fluoreszenzfarbstoff, der bei einer Doppelfärbung meist in Kombination mit Cy5 benutzt wird.

**Cy5:** In der Molekularbiologie häufig benutzter Fluoreszenzfarbstoff, der bei einer Doppelfärbung meist in Kombination mit Cy3 benutzt wird.

**DNA:** Desoxyribonukleinsäure, Molekül, welches den genetischen Bauplan enthält und als Vorlage zur Synthese von Proteinen dient.

**DNA-Array:** siehe **Array** bzw. **Microarray**

**Denaturieren:** Zerstörung der natürlichen dreidimensionalen Struktur großer biologischer Moleküle (Proteine oder DNA), z. B. durch Hitze. Bei der DNA bedeutet Denaturierung vor allem die Auflösung des Doppelstranges in Einzelstränge

**Expression:** Umsetzung genetischer Informationen in entsprechende Genprodukte.

**Expressionsanalyse:** Erstellung einer qualitativen und quantitativen Aussage über die Umsetzung genetischer Informationen in entsprechende Genprodukte. Erstellung von Expressionsmustern

**Fluoreszenzmarkierung:** Markierung von Molekülen mit Fluorophoren

**Gelelektrophorese:** Durch ein elektrisches Feld bewirkte Auftrennung von zumeist Biomolekülen (meist DNA, RNA oder Proteine) durch eine gelartige feste Phase. Auf diese Weise erfolgt eine Trennung anhand physikalischer oder chemischer Eigenschaften.

**Gen:** Die kleinste funktionelle Einheit der Vererbung. Ein Gen ist ein Abschnitt der DNA, der Informationen zur Synthese von einem oder mehreren Proteinen enthält. Die Gene stellen die Grundeinheit für die Weitergabe von Erbinformationen dar.

**GFP:** Grün Floreszierendes Protein, ursprünglich isoliert aus der Qualle *Aequorea victoria*: in der Molekularbiologie oft als Reporterprotein eingesetzt, um die Expression eines Ziel-Gens anzuzeigen oder die Lokalisierung bzw. den Weg eines Ziel-Proteins aufzufinden bzw. besser verfolgen zu können.

**Hybridisierung:** Ereignis, bei dem zwei zueinander invers komplementäre Einzelstränge aus RNA oder DNA ein doppelsträngiges Molekül bilden.

**High Density:** Der Begriff High Density wird in Zusammenhang mit Arrays benutzt, welche eine hohe Dichte an verschiedenen Nukleinsäureproben aufweisen und somit eine Vielzahl an Fragestellungen beantworten können. High Density-Chips beinhalten eine Probenanzahl von über 1.000 verschiedenen Nukleinsäuren.

**Hybridisierungskammer:** Gerätschaft, welche für eine gleichmäßige und leichtere Hybridisierung von Microarrays sorgt.

**Komplementäre DNA (cDNA):** copy-DNA bzw. complementary DNA. Entsteht durch die Synthese von DNA an messenger-RNA ( mRNA) als Vorlage. Während die Gene in der DNA höherer Organismen meist nicht übersetzte Einschübe (sog. Introns) enthalten, sind diese Einschübe in der cDNA nicht mehr vorhanden. Diese werden im Rahmen der Transkription bei der Abschrift der DNA in mRNA entfernt

**Laserscanner:** Gerät zur Anregung und Detektion von fluoreszenzmarkierten Substraten, welche mit auf Microarrays immobilisierten Nukleinsäuren hybridisiert haben. Durch dieses Gerät werden die Ergebnisse einer Hybridisierung von Microarrays erstellt.

**Low Density:** Der Begriff Low Density wird in Zusammenhang mit Arrays benutzt, welche eine geringe Dichte an verschiedenen Nukleinsäureproben aufweisen und somit eine schnelle Beantwortung spezifischer Fragestellungen

ermöglichen. Low Density-Chips beinhalten eine Probenanzahl von bis zu 150 verschiedenen Nukleinsäuren.

**mRNA (Messenger-RNA):** Bei der Transkription eines Gens entstehendes Molekül, welches als Vorlage zur Synthese von Proteinen dient. Seltener ist auch die mRNA das finale Genprodukt und damit in der Lage, funktionelle Aufgaben zu erfüllen.

**Microarray:** Vorlage, welche benutzt wird, um biologisches Material wie z.B. Nukleinsäuren, Peptide oder Proteine in hoher Dichte aufzutragen und zu binden. Microarrays bestehen aus oder beinhalten eine feste Trägersubstanz die es erlaubt, große Mengen an Proben in geregelten Abständen aufzubringen, sodass diese für parallele Experimente genutzt werden können.

**Nukleinsäure:** Zusammengehörende Gruppe von Molekülen, welche die Bausteine der DNA- und RNA-Moleküle darstellen.

**Nukleotide:** Einzelbausteine der DNA und RNA.

**Oligonukleotid:** Synthetisches Molekül, welches aus einer geringen Anzahl von Nukleotiden besteht.

**PCR:** Polymerase Chain Reaction. Polymerase Kettenreaktion. Von Kary Mullis Ende der 80er Jahre initiierte Methode aus kleinsten Mengen vorgegebener DNA eine spezifische Region beliebig zu vermehren, sofern flankierende Sequenzinformationen zur Synthese von Oligonukleotiden zur Verfügung stehen. Häufig benutzte Methodik um selektiv Nukleinsäuresequenzen zu vermehren.

**PCR-Produkte:** Durch die PCR vermehrte Nukleinsäuresequenzen.

**Primer:** Ein Oligonukleotid, an dem die Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges ansetzt. Wird von allen natürlichen DNA-Polymerasen einschließlich der reversen Transkriptase benötigt, also sowohl bei der PCR oder bei der Synthese von cDNA.

**Protein:** Aus Aminosäuren aufgebautes großes und komplexes Molekül, welches eine spezifische Funktion im Organismus erfüllen soll.

**Restriktionsanalyse:** molekularbiologische Analysentechnik. Sie beruht darauf, dass Restriktionsenzyme unterschiedliche Abschnitte auf der DNA erkennen. Aufgrund der unterschiedlich langen Nukleotidsequenzen zwischen den einzelnen Erkennungsstellen entstehen verschieden große Fragmente.

Die Fragmente können anhand ihrer unterschiedlichen Länge innerhalb einer Elektrophorese voneinander unterschieden werden.

**Reverse Transkriptase:** Enzym (Polymerase), das mit RNA als Vorlage die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diesen Vorgang nennt man **Reverse Transkription**. Die Reverse Transkriptase wurde ursprünglich aus Retroviren isoliert und wird in der Gentechnologie zur Herstellung von cDNA aus RNA benutzt.

**RNA:** Ribonukleinsäure, Moleküle, welche bei der Dekodierung der DNA gebildet und als Matrize zur Synthese von Proteinen benötigt werden oder selbst funktionelle Aufgaben übernehmen.

**RNAi** RNA Interferenz steht für einen Signalweg in der Zelle, dabei wird dsRNA (doppelsträngige RNA) durch ein Enzym („Dicer“) in viele kleinere Fragmente von ca. 22 Nukleotiden Länge zerteilt (die siRNA's) und in einen weiteren Enzymkomplex (RISC, RNA-induced silencing complex) eingebaut. Mithilfe der inkorporierten RNA-Fragmente bindet RISC komplementär an DNA, z.B. Genbereiche, oder mRNA und kann diese damit "abschalten". siRNA's werden aktuell intensivst auf ihre Beteiligung an verschiedenen Zellvorgängen und Krankheiten erforscht

**Sonde:** Einzelsträngiges DNA- oder RNA-Molekül, welches durch seine spezifischen Basensequenz benutzt werden kann, komplementäre Basensequenzen durch Hybridisierung nachzuweisen. Dabei müssen Substrate für ihre Detektion radioaktiv oder chemisch markiert sein.

**Spotten:** Automatisiertes Auftragen von Probenmaterial auf einen Array.

**Spotter:** Roboter, welcher dazu benutzt wird, große Anzahlen an unterschiedlichen Probenmaterialien auf einen Array zu übertragen (zu spotten).

**Target:** Zielsequenz, welche durch Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde nachgewiesen werden kann.



## 1. Einleitung

Die Schädigung von Einzelorganismen, Populationen und Biozönosen durch Chemikalien in umweltrelevanten Konzentrationen ist durch klassische Biotests, wie z.B. Mortalitäts- und Reproduktionstests, nur schwer bzw. gar nicht zu erfassen und zu quantifizieren. Ökotoxikologische Testsysteme, die schädigende Ereignisse auf zellulärer und subzellulärer Ebene erfassen und zusätzlich quantitativ abbilden können, helfen potenzielle Gefährdungen durch bestimmte Chemikalien frühzeitig zu erkennen. Im Unterschied zu den klassischen ökotoxikologischen Tests wird die Genexpression von z.B. Nematoden bereits im subletalen, subakuten Konzentrationsbereich induziert und kann somit als eine Art Frühwarnsystem von schädigenden Umwelteinflüssen auf Organismen genutzt werden. Schon bekannte molekularbiologische Tests sind die Erfassung der DNA-Schäden, des Vitellogeninspiegels (mRNA- und Proteinlevel) und die Expression von Hitzeschock-Proteinen. Der Genexpressionstest erfasst die Antwort des Organismus schon auf der Transkriptionsebene und gibt ein quantitatives Ergebnis. Dadurch wird der Chemikalieneinfluss frühzeitig und quantitativ auf der ersten Wirkungsebene erfasst.

Als Testorganismus für das Vorhaben wurde mit *Caenorhabditis elegans* ein Fadenwurm (Nematode) gewählt. Nematoden stellen in ihren aquatischen und terrestrischen Lebensräumen die häufigste Organismengruppe der Metazoen dar. Sie weisen eine hohe Artenzahl und Abundanz auf und sind daher gut geeignet für ökologische und ökotoxikologische Untersuchungen (Traunspurger et al. 1995; Niemann & Debus, 1996; Bierkens et al. 1998). Durch ihre Cuticula stehen sie in direktem Kontakt mit dem Porenwasser und den darin gelösten Substanzen. Als permanente Bewohner ihres Lebensraumes können sie bei einem Schadstoffeintrag nicht flüchten. Sie sind leicht und routinemäßig zu jeder Jahreszeit zu sammeln und zu isolieren. Die Probenentnahme ist für die zu untersuchende Lokalität ein relativer geringer Eingriff bzw. eine geringe Störung des Ökosystems.

*Caenorhabditis elegans* lebt als Saprobiont im Boden und Wasser und gilt als das einfachste mehrzellige Tier mit dem Status eines Labormodells. Seine leichte Züchtbarkeit und Handhabbarkeit, kurze Generationszeiten, das Vorhandensein einer Vielfalt von Mutantenstämmen sowie die Entschlüsselung seiner gesamten Erbinformation lassen *C. elegans* als Testorganismus besonders geeignet erscheinen.

Schon seit längerem wird *C. elegans* für klassische Biotests, wie Mortalitäts- und Reproduktionstest mit Erfolg eingesetzt (Bierkens et al. 1998). So wurden Untersuchungen mit verschiedenen Schwermetallen in Böden und Seesand zur Mortalität von *C. elegans* durchgeführt (Donkin & Dusenbery, 1993; Peredney & Williams, 2000), Traunsburger et al. (1996) untersuchten den Einfluss von Cadmium auf die Reproduktion von *C. elegans* in Flüssigkultur und die Wirkung von Flusssedimenten auf Eizahl und Körperlänge. In einer anderen Studie untersuchten Dhawan et al. (1999) den Effekt von Ethanol auf Mortalität, Reproduktion und Verhalten von *C. elegans*. Weiterhin diente *C. elegans* als Testorganismus für Mortalitätsuntersuchungen mit industriellen und städtischen Abwässern (Hitchcock et al., 1997)

### **1.1. Aufgabenstellung**

Das Ziel des Projektes war die Entwicklung eines neuen ökotoxikologischen Testsystems das eine Chemikalien-induzierten Genexpression erfasst. Als Testorganismus diente der Bodennematode *Caenorhabditis elegans*. Bevorzugte Targetgene waren insbesondere Phase I und II Gene der Biotransformation. Darüber hinaus wurden jedoch noch weitere Gene mit einem hohen, Chemikalien-spezifischen, Induktionspotential (z.B. kodierend für Hitzeschockproteine oder Vitellogenine) eingesetzt. Als Nachweissystem sollte ein eigens zu entwickelnder DNA-Array (ursprünglich „Ökotox-Genchips“, neue Bezeichnung „Celegans Toxchip“) mit einer Fluoreszenzmarkierung eingesetzt werden. Damit wird die Aufnahme von differentiellen Genexpressionsprofilen in Abhängigkeit der eingesetzten Chemikalie möglich. Die Sensitivität des neuen

Testsystems sollte mit Ergebnissen aus *C. elegans* Reproduktionstests im Flüssigmedium und im Boden verglichen und abgesichert werden, um die biologische Relevanz und Plausibilität unmittelbar zu überprüfen. Das letztendliche Ziel des Projektes ist die Etablierung der Chemikalien-induzierbaren Genexpression als einen neuen funktionalen Endpunkt in der Ökotoxikologie.

## **1.2. Voraussetzungen für das Vorhaben**

Der Projektleiter Dr. Ralph Menzel verfügt über jahrelange Erfahrungen auf den Gebieten der Gentechnik und Molekularbiologie mit besonderer Orientierung auf die Enzymgruppe der Cytochrome P450. Die Arbeiten mit dem Nematoden *C. elegans* als Testorganismus wurden 1999 begonnen und konzentrieren sich auf die Xenobiotika induzierte Genexpression von Phase I und II Enzymen des Biotransformationssystems und der beteiligten Signaltransduktionsketten. So konnte zum Beispiel ein auf Nylonmembran basierender Genfilter entwickelt werden, dessen Nutzung zur Identifizierung von über zehn verschiedenen, durch Xenobiotika induzierbaren P450 Genen des Nematoden führte (Menzel et al. 2001).

An unserem Institut waren sowohl die notwendigen personellen als auch technischen Kapazitäten für eine ordnungsgemäße Durchführung des Projektes vorhanden. Die vom Antragsteller geleitete Arbeitsgruppe "Cytochrom P450" verfügt über drei Laborräume (davon einer klimatisiert) mit einer Grundfläche von insgesamt 75 m<sup>2</sup> und vier Nebenräumen mit einer Fläche von 68 m<sup>2</sup>. Integriert sind dabei sowohl ein Isotopenlabor als auch eine gentechnische Anlage der Sicherheitsstufe 2 (S1 Arbeiten). Unsere Laborräume beherbergen dabei eine komplette technische Ausstattung, welche für die Kultivierung der Nematoden als auch für die gentechnischen bzw. molekularbiologischen Arbeiten notwendig waren.

Für die vorgesehenen Reproduktionstests konnte auf die zu dieser Zeit am Institut in Entwicklung befindlichen Testsysteme zugegriffen werden (Rödel,

2002, Tix, 2003). Beide Systeme wurden jedoch noch an die spezifischen Anforderungen in diesem Projekt angepasst.

Des Weiteren war die bereits etablierte Zusammenarbeit mit der Stanford University/USA (1.5.) und der damit möglichen Nutzung eines gesamtgenomischen *C. elegans* DNA-Microarrays eine essentielle Voraussetzung für das durchgeführte Vorhaben. Damit wurde die systematische, genomweite Untersuchung der schadstoffinduzierbaren Genexpression erst möglich. Die erhaltenen Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Auswahl der spezifischen Gene, die auf den neu entwickelten „Celegans Toxchip“ platziert wurden.

Für die Herstellung (Spotting), das Einlesen der hybridisierten Arrays (Laserscanning) und deren Auswertung mittels spezieller Software war der Aufbau einer weiteren Kooperation vorgesehen. War am Anfang des Projektes noch die Anschaffung eines Handspotters, eines einfachen Laserscanners und die Zusammenarbeit mit der BioTez GmbH (Berlin) geplant, mussten diese Vorhaben bald aufgegeben werden (vergleiche hierzu auch 1.4.). Erfreulicherweise konnte durch Frau Kerstin Reichert (Doktorandin im Projekt) jedoch sehr rasch eine neue Kooperation mit dem MPI für Infektionsbiologie (Charité Berlin) eröffnet werden (siehe 1.5.)

### **1.3. Planung und Ablauf des Vorhabens**

Das Projekt teilt sich in vier Teilvorhaben, die sich wie folgt darstellen:

*Teilvorhaben I: Entwicklung und Herstellung des „Celegans Toxchips“*

- Auswahl relevanter Gene, deren Expression durch Arzneimittel, Biozide und andere Schadstoffe induziert werden.
- RT-PCR-Amplifikation der cDNAs, Klonierung und Verifizierung
- Herstellung des „Celegans Toxchips“ (in Zusammenarbeit mit dem MPI für Infektionsbiologie), Testung des Systems

*Teilvorhaben II: Überprüfung des Verwendungsspektrums des „Celegans Toxchips“ und Vergleich der Empfindlichkeit des Systems mit einem Reproduktionstest in Flüssigkultur*

- Testung der induzierenden Aktivität von wichtigen Chemikalien unterschiedlicher Stoffklassen auf DNA-Ebene und im Reproduktionstest (Flüssigkultur).
- Erfassung einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung (ECx) für ausgewählte Verbindungen.
- Untersuchung des Testsystems auf Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit.
- Analyse der Geninduktionsmuster für die Zuordnung zu bestimmten Chemikaliengruppen.

*Teilvorhaben III: Adaptation des „Celegans Toxchips“ an einen Test mit kontaminiertem Bodenmaterial*

- Testung der biologischen Aktivität von einzelnen Chemikalien auf DNA-Ebene und im Reproduktionstest (Boden).
- Erfassung einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung (ECx).

*Teilvorhaben IV: Auswertung der Testergebnisse*

- Vergleich der Ergebnisse aus den verschiedenen Testmethoden.
- Erstellung des Schlussberichts
- Erarbeitung standardisierbarer Protokolle

Das aufgeführte Teilvorhaben I stand entsprechend zeitlich am Beginn des Projektes und bildete die Basis für die weiteren Experimente. Die Teilvorhaben II und III wurden zum Teil chronologisch, zum Teil jedoch auch parallel dazu abgearbeitet (Reproduktionstests). Die Auswertung der Testergebnisse im Teilvorhaben IV kommt insbesondere in diesem Schlussbericht zum Ausdruck, detaillierte Protokolle sind dem Teil 2.1. (Methodik der Untersuchungen) zu entnehmen. Tabelle I zeigt zusätzlich eine kurze zeitliche Aufgliederung.

**Tab. I:** Zeitliche Aufgliederung der vier Teilvorhaben

Nummer	Teilvorhaben	Zeitdauer*
1	Entwicklung und Herstellung des „Ökotox-Genchips“	13 Monate
2	Überprüfung des Verwendungsspektrums des „Ökotox-Genchips“ und Vergleich der Empfindlichkeit des Systems mit einem Reproduktionstest in Flüssigkultur	12 Monate
3	Adaptation des „Ökotox-Genchips“ an einen Test mit kontaminiertem Bodenmaterial	7 Monate
4	Auswertung der Testergebnisse	1 Monat

\*- Gesamtlauzeit des Projektes: 01.07.2001 bis 31.03.2004 (33 Monate)

#### **1.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand**

Für die Entwicklung des Celegans Toxchips war ursprünglich eine Kooperation mit der Firma Biotex geplant, deren Genchips eigentlich auch Verwendung in dieser Arbeit finden sollten. Das Grundprinzip dieser Chips bestand darin, auf einen mit Streptavidin beschichteten Objektträger in vorgegebene Vertiefungen die mit einem Biotinanhang versehenen selektierten Genfragmente mit Hilfe einer Pipette, bzw. eines Handspotters aufzutragen. Dieses System inklusive eines Protokolls für die eigentliche Hybridisierung stellte sich jedoch nach einigen Vorversuchen als nicht hinreichend heraus und wurde nach persönlichen Gesprächen mit Mitarbeitern des Labors von Stuart Kim und Pat Brown von der Stanford University in Kalifornien, USA, sowie nach eigenen intensiven Literaturrecherchen durch ein anderes System ersetzt. Diese Systemumstellung auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger machte es jedoch nötig, eine Kooperation mit einem Institut zu etablieren, das geeignete Spottinggeräte und Fluoreszenzscanner für die Auswertung der Genchips,

sowie die entsprechende Auswertesoftware zur Verfügung stellen konnte. Durch persönliche Kontakte fand sich mit dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, sowie im späteren Verlauf mit dem Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité diese Möglichkeit. Durch die endgültige Auswertung der Induktions- und Hybridisierungsexperimente die in Kooperation mit dem Labor von Stuart Kim in Stanford, USA durchgeführt wurden sowie das Miteinbeziehen neuester Literatur, konnte die Genauswahl für den *Caenorhabditis elegans* Toxchip auf insgesamt 66 relevante Gene erweitert werden. In diesem Zusammenhang wurden die geplanten Investitionen für den Handspotter und Laser-Fluoreszenzscanner nicht getätigt und die Mittel umgewidmet.

### **1.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Die für die Auswahl der Gene des *Caenorhabditis elegans* Toxchip wichtigen Untersuchungen mit Hilfe eines gesamtgenomischen DNA-Microarrays von *C. elegans* wurden durch eine Kooperation mit dem Labor von Stuart Kim, Stanford University, Stanford (USA) möglich.

Die Herstellung des *Caenorhabditis elegans* Toxchip erforderte die Verwendung spezifischer Primer, deren Sequenzen im Fall von 21 Genen von Joanne Staines vom Sanger Institut in Hinxton (Großbritannien) bezogen wurden.

Das Spotten und spätere Auswerten des *Caenorhabditis elegans* Toxchips fand zum einen in der Microarray Serviceabteilung von Dr. Mollenkopf am MPI für Infektionsbiologie, Berlin, sowie im Labor für funktionelle Genomforschung der Charité, Frau Dr. Ungetüm, statt.

## 2. Hauptteil

### 2.1. Methodik der Untersuchungen

#### 2.1.1. Nematoden und Bakterien

Für alle Arbeiten wurde der Nematodenstamm *C. elegans* Bristol (N2) verwendet, der 1946 in England isoliert wurde (Briggs, 1946). Die Nematoden wurden bei allen Versuchen mit dem *Escherichia coli* Stamm OP50 gefüttert. Das ist eine gentechnisch hergestellte Uracilmangelmutterante, die von den Nematoden gut verwertet werden kann und einfach zu züchten ist (Brenner, 1974). Der Vorteil dieses Stammes ist, dass sich die Bakterien nach Aufbrauchen des Uracil-Vorrates im Medium nicht mehr weiter vermehren können. Dadurch wird ein Überwachsen der Platte durch *E. coli* verhindert. Alle Arbeiten mit *C. elegans* und *E. coli* wurden unter einer Clean-Bench vollzogen, welche für eine sterile Umgebung sorgt.

#### *Vorkultur auf Agar-Platten*

Für die Vorkultur, die der Vermehrung der Nematoden diente, wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens mit einer *C. elegans* Stammkonserve aufgetaut und auf einer mit OP50-Bakterien beimpften NGM-Agar-Platte verteilt. Anschließend wurden die Nematoden auf der Platte für drei Tage bei 20°C kultiviert. Nachdem sich die Nematoden auf dieser Stammplatte ausreichend vermehrt hatten, wurden unter der Sterilbank aus der Platte kleine Agarblöcke herausgeschnitten und mit der Nematoden bewachsenen Seite nach unten auf weitere mit OP50-Bakterien beimpfte NGM-Platten abgelegt. Diese Platten wurden ebenfalls für drei Tage bei 20°C inkubiert. Nachdem auch auf diesen ausreichend Nematoden gewachsen waren, konnten die Platten, sofern sie nicht direkt weiter verwendet werden sollten, bei 15°C für die Stammhaltung auf Platten aufbewahrt werden.



### 2.1.2. Medien

Um größere Mengen *E. coli* OP50 zu produzieren, wurden die Bakterien in DYT-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt und mittels Zentrifugation geerntet.

DYT-Medium: 32 g Bactotrypton (Caseinhydrolysat Pepton No. 140, BD)  
20 g Hefezellenautolysat (Roth)  
10 g NaCl (mit A.dest auf 1 l auffüllen und autoklavieren)

Die Vorkultivierung von *C. elegans* erfolgte auf NGM-Agar Platten (92x16 mm Petrischalen, Sarstedt), die zuvor mit *E. coli* OP50 inokuliert wurden, um einen geschlossenen Bakterienrasen zu erzeugen:

NGM-Agar: 1,5 g NaCl  
(0,5 l) 8,5 g Agar  
1,25 g Bactopepton (enzymatischer Proteinverdau, BD)  
0,5 ml Cholesterinlösung  
486 ml A.dest (anschließend die Lösung autoklavieren)

Wenn das Medium handwarm ist, unter Rühren steril zugeben:

12,5 ml 1 M Kaliumhydrogenphosphatpuffer (pH 6,0, autoklaviert)  
0,5 ml 1 M CaCl<sub>2</sub> (autoklaviert)  
0,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> (autoklaviert)  
0,125 ml Nystatinlösung

Die Kultivierung von *C. elegans* in Flüssigkultur erfolgte in Basalmedium.

Basalmedium: 6 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
(0,5 l) 22 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2,9 g NaCl  
470 ml A.dest (Lösung autoklavieren)

Nach dem Autoklavieren zugeben:

5 ml 1 M Natriumcitrat (pH 6,0, autoklaviert)  
1,5 ml 1 M CaCl<sub>2</sub> (autoklaviert)  
1,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> (autoklaviert)  
0,125 ml Nystatinlösung (sterilfiltriert)  
0,5 ml Cholesterinlösung (sterilfiltriert)

### 2.1.3. *Eingesetzte Testsubstanzen*

Im Laufe des vorgestellten Vorhabens wurden insgesamt zehn verschiedene Testsubstanzen eingesetzt, Tabelle II gibt eine kurze Übersicht. Für die einzelnen Teilabschnitte (Reproduktionstests, DNA-Arraytests, weitere Tests der Genexpression mittels RT-PCR und GFP Reporterkonstrukt) wurden jedoch nicht immer alle Verbindungen eingesetzt. Eine genaue Aufstellung erfolgt immer am Anfang des jeweiligen Ergebnisteils.

### 2.1.4. *Caenorhabditis elegans Reproduktionstest in Flüssigmedium*

#### 2.1.4.1. Durchführung des Reproduktionstests

Drei bis vier ungefähr 4 d alte, bei 20°C inkubierte NGM Platten, wurden zuerst auf Sauberkeit überprüft. Danach wurden die Nematoden mehrmals mit Basalmedium von den Platten gespült. Die abgspülten Nematoden wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Polypropylen) gesammelt und ab diesem Zeitpunkt auf Eis gelagert.

Für den Reproduktionstest wurden Larven des L1 Stadiums eingesetzt, da diese eine hohe und gleichmäßige Empfindlichkeit gegenüber exogenen Noxen aufweisen. Um die Würmer zu synchronisieren wurden sie nach dem Abspülen filtriert. Dazu wurde ein spezielles Filtrationsgerät (Sartorius SM 16510/11) mit einem 10 µm Membranfilter verwendet, das nur die L1 Stadien des Nematoden passieren können. Dieses Gerät wurde vor jedem Gebrauch sterilisiert. Die filtrierten L1 Würmer wurden dem Gerät entnommen und vorübergehend auf Eis gelagert. Die Dichte der erhaltenen Nematoden-suspension wurde dadurch ermittelt, dass verdünnte Aliquote unter dem Mikroskop ausgezählt wurden. Der bestimmte Durchschnittswert wurde benutzt, um das im Test einzusetzende Volumen der Nematodensuspension zu errechnen und eine Testkonzentration von ca. 1000 Nematoden pro ml zu erhalten.

**Tab. II:** Aufstellung der im Projekt eingesetzten Substanzen.

Stoffklasse	Substanz	Kurzbeschreibung	Ökotoxikologische Wirkung	Induzierte Genexpression
PAK-Typ	$\beta$ -Naphthoflavon	Farbstoff	?	CYP 1A und Induktor von Phase II Enzymen über XRE (xenobiotic-responsive element) und AHR +ARNT
	Fluoranthen*	PAK, eingesetzt zur Herstellung von Fluoreszenzfarbstoffen und Pharmaka	Akkumulation in aquatischen Tieren als auch Boden-invertebraten	
PCB-Typ	PCB52	Chlorsubstituiertes Biphenylmolekül	Starke Anreicherung in Fettgewebe, Höhere Tox. durch Hydroxyverbindungen	CYP 1A und CYP 2B, Induktor von Phase II Enzymen
Arzneimittel	Clofibrinsäure*	Lipidsenker vom Fibrattyp	Peroxisomenproliferation, Krebs bei Nagern	CYP4A
	Lansoprazol	Protonenpumpenhemmer, eingesetzt bei Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren	Hemmung von Cytochrom P450 Formen (CYP3A4 und CYP2C19)	CYP1A
Endokrine	Ethinylestradiol*	Sexualhormon (Antibabypille)	Östrogene Wirkung	Vitellogenine
	Diethylstilbestrol	Synthetische Substanz, früher zur Hormonbehandlung bei Frauen eingesetzt (in der BRD nicht mehr zugelassen).	stark östrogen wirksam, schwer abbaubar, kanzerogen und cytotoxisch	Vitellogenine ?
Herbizid	Atrazin*	Vertreter der 1,3,5-Triazine, Selektives Bodenherbizid (in der BRD nicht mehr zugelassen)	Schwer abbaubar, Östrogene Wirkung wahrscheinlich	CYP2B und 4A
Fungizid	Tributylzinn	Vertreter der Alkylzinn-Verbindungen, Bestandteil von Farbmitteln	Steroidwirksam auf Schnecken (androgene Wirkung), cytotoxisch	HSP
Insektizid	Endosulfan*	Chlorierter KW, eingesetzt gegen beißende und saugende Insekten	Stark toxisch für Fische, östrogene Wirkung ?	P450 Induktor von Phase II Enzymen

\* - nachgewiesen im Abwasser und Flusswasser (nach Römbke, J., Knacker, T. und Stahlschmidt-Allner, P.; Umweltprobleme durch Arzneimittel (1996) Forschungsbericht 106 04 121 des Umweltbundesamtes, 60/96, UBA-FB 96-060, ISSN 0722-18

Die aus der DYT-Bakterienvorkultur gewonnenen *E. coli* OP50 Zellen wurden auf eine Konzentration von 0,1g Frischgewicht OP50 pro ml Basalmedium eingestellt.

Als Lösungsmittel für die meist sehr lipophilen Chemikalien wurde DMSO gewählt. Die jeweils eingesetzten Stammlösungen wurden so hergestellt, dass bei Zugabe von 3 µl zu 1 ml Testvolumen die jeweils zu untersuchende Chemikalienmenge im DMSO enthalten war. Damit konnte erreicht werden, dass in jedem Ansatz konstant ein DMSO Gehalt von 0,3 % [v/v] vorhanden war.

Für den Test wurden halblange Reagenzgläser (DURAN<sup>®</sup>, 16mm Ø, 130mm Länge) benutzt. Dabei wurde als erstes das Basalmedium eingefüllt, danach die Chemikalienlösung und dann die Bakteriensuspension gefolgt von der Nematodensuspension. Besonders die Nematoden müssen beim Einfüllen öfter mit dem Reagenzglasrührgerät behandelt werden („vortexen“), da sie relativ schnell sedimentieren.

Folgende Zugaben wurden für 1 ml Testvolumen verwendet:

- 25 µl Bakteriensuspension
  - 3 µl Testsubstanz in DMSO
  - x µl Nematoden (1000 Tiere)
- auf 1 ml auffüllen mit Basalmedium

Insgesamt wurden immer 36 Reagenzgläser parallel angesetzt, davon sechs Chemikalienkonzentrationsstufen mit jeweils vier Wiederholungen, sowie je vier Kontrollen mit und ohne DMSO. Die Reagenzgläser wurden mit Kapsenbergkappen verschlossen. Anschließend wurden sie im Reagenzglasständer auf einem Rundschüttler (Nutationsschüttler) gestellt, welcher sich im Brutschrank (25°C) befand.

Nach 96 h wurden die Ansätze dem Brutschrank entnommen und innerhalb von ca. vier Stunden ausgezählt.

Zur Zählung wurde das Flüssigkeitsvolumen im Reagenzglas mit Hilfe einer Messpipette bestimmt, um den Verdunstungsverlust zu ermitteln. Anschließend wurden mehrere Aliquote entnommen, 1:10 verdünnt, und zur Auszählung auf den Objektträger gebracht. Mit Hilfe eines Zählobjektträgers mit drei 50 µl Spuren wurden jeweils 2 Aliquote zu je 3 x 50 µl gezählt. Die ermittelte Nematodenzahl konnte dann um den Verdunstungsverlust des Testmediums korrigiert werden, um die Nematodenzahl pro ml Testmedium zu erhalten.

#### 2.1.4.2. Auswertung der Daten

Jede Versuchsreihe wurde zweimal durchgeführt (resultierend n=8). Zu den volumenkorrigierten Zählergebnissen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung als absolute Werte und als Prozentwerte relativ zur Kontrolle bestimmt. Diese wurden als Nematodenzahl in % Reproduktion gegenüber der Dosis der Testsubstanzen in einem Diagramm aufgetragen. Weiterhin wurde die statistische Unabhängigkeit (Signifikanz) der Daten entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$  ermittelt. Bei dem vorliegenden Fall der unabhängigen Stichproben wurde bei vorhandener Normalverteilung der students t-Test benutzt. Ohne Normalverteilung eignet sich der Kruskal-Wallis Test (Rangvarianzanalyse). Das Programm Sigmastat 3.0 (SPSS Inc.) empfahl sich für diese Berechnungen.

Weiterhin wurden die verschiedenen Effektkonzentrationen berechnet. Dazu wurde das Programm „Critical Values“ zu Rate gezogen, welches mit Hilfe der Probitanalyse (Finney, 1988; Umrechnung der Prozentwerte in so genannte Probits und Abbildung auf die logarithmische Skala der Abszisse zur Erzeugung einer Regressionsgerade) die EC Werte berechnete und in Tabelle und Grafik ausgab. Dabei werden 0 % und 100 % Werte (Kontrollen) vom Programm negiert und fließen nicht in die Berechnung ein. Die EC Werte vom Rande der unterstellten Normalverteilung sind in der Regel unsicherer als der EC 50 Wert.

### 2.1.5. *Canorhabditis elegans* Reproduktionstest im Boden

Für die Testreihen wurde der Boden LUFA 2.2 benutzt. LUFA 2.2 ist ein natürlicher und unbelasteter lehmiger Sand, welcher von der „Land- und forstwirtschaftlichen Versuchsanstalt Speyer“ bezogen wurde. Aus der Tabelle III sind u. a. die chemisch-physikalischen Parameter von LUFA 2.2 zu entnehmen. LUFA 2.2 wird zur Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen und vor allem als Kontrollboden, aber auch für die Untersuchungen mit den Referenzsubstanzen benutzt.

**Tab. III:** Überblick der chemischen und physikalischen Parameter von LUFA 2.2 sowie der Konzentrationen verschiedener Schwermetalle und PAKs (Quelle: Kördel 2001)

<b>Boden</b>	<b>LUFA 2.2</b>
Ton (<0.002 mm)	8,2 %
Schluff (0,002-0,063 mm)	18,5 %
Sand (0,063-2,0 mm)	73,2 %
Bodenart	lehmiger Sand
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,8
Humus	2,3 %
Wasserhaltekapazität	500,0 mg/kg
As	n. d.
Cd	0,3 mg/kg
Cr	13,2 mg/kg
Cu	5,0 mg/kg
Ni	6,1 mg/kg
Pb	19,0 mg/kg
Zn	29,1 mg/kg
*Σ 16 PAK	<1 mg/kg

\*Σ 16 PAK = Kördel et al. (2001) extrahierte mittels Soxhlet mit Toluol die PAK. Die Bestimmung erfolgte mittels GC-MC. Es wurden die 16 PAK nach EPA bestimmt. n. d.: nicht nachweisbar.

Der Boden wurde in PE-Eimern (10 l) in einem kühlen Raum gelagert und für die Untersuchung dreimal bei –80°C eingefroren. Dazu wurde LUFA 2.2 in eine PE-Flasche 250 ml –80°C gelagert. Anschließend wurden die Böden aufgetaut und wieder eingefroren. Die dreimal ausgefrorenen Böden wurden an-

schließlich bei Raumtemperatur in denselben Behältern gelagert. Zur Standardisierung wurde die max. Wasserhaltekapazität (WHK) mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 100% eingestellt. Zu diesem Zweck wurden zuvor die Trockenmasse, der Wassergehalt, die max. WHK sowie der pH nach Standardmethoden bestimmt.

#### 2.1.5.1. Durchführung des Reproduktionstestes

Vier Tage vor Testbeginn wird eine Nematodenkultur (auf frischer NGM-Platte) aus einer „verhungerten“ bewachsenen NGM-Agarplatte angesetzt und für 96 h bei 20°C inkubiert.

*Einen Tag vor Testbeginn wird:*

- a) eine Bakterienkultur von *E. coli* (OP50) angesetzt. Zu diesem Zweck werden 250 ml DYT- Medium und 2 ml von der *E. coli* (OP50) Stammkultur in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Der Ansatz wird bei 37°C für 24 h im Schüttler inkubiert.
- b) Die Chemikalienstammlösungen wurden für die Bodenversuche in Aceton angesetzt, die Zugabe zum Boden erfolgte über die Einmischung von Testsubstanz-haltigen Quarzsand. Zu diesem Zweck wurde 1 ml Chemikalienstammlösung mit 1 g Quarzsand intensiv gemischt, getrocknet und anschließend dem Boden in entsprechender Konzentration zugesetzt.
- c) von dem zu untersuchenden Boden werden 1,5 g TM in 10 ml Reagenzgläser mit Deckel gegeben und mit 100 µl bidest. H<sub>2</sub>O und mit der Testsubstanz (siehe b) versetzt. Das Ganze wird kurz geschüttelt und bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Pro Ansatz werden vier Parallele angesetzt.

*Zum Testbeginn wird:*

- a) die *E. coli* (OP50)-Kultur geerntet. Dies erfolgt durch Zentrifugieren bei 5000 x g in der Zentrifuge. Im Anschluss wird das Pellet mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wird 1:1 mit M9-Medium

resuspendiert. Für den Testansatz werden  $1 \times 10^{10}$  Zellen/Testansatz benötigt.

- b) die Nematoden werden abgespült, durch Filtern synchronisiert und ausgezählt (vergleiche 2.1.4.1.). Das Filtrat enthält Nematoden, welche sich im L1-Stadium befinden. Für den Test werden pro Ansatz 100 Nematoden benötigt. Dazu wird das Filtrat soweit verdünnt, bis sich ca. 100 Nematoden in 100  $\mu$ l befinden. Diese Suspension wird mindestens sechsmalig ausgezählt, um möglichst genau das benötigte Volumen für 100 Nematoden zu bestimmen.
- c) für den Ansatz werden aus den Volumina von *E. coli* (OP50) und der Nematoden das Restvolumen für eine 100%ige max. WHK bestimmt. Das Restvolumen wird mit M9-Medium aufgefüllt. Dieses Volumen sowie das Volumen an *E. coli* (OP50) werden auf den Bodenansatz pipettiert und gründlich gevortext. Im Anschluß wird das Volumen, das 100 Nematoden entspricht, zugegeben und kurz gevortext. Die Ansätze werden bei 20°C für 96 h im Dunkeln inkubiert.

#### *Extraktion der Nematoden:*

Die Extraktion der Nematoden erfolgt nach der Ludox-Methode, die von Williams und Dusenbery (1988) beschrieben wurde. Ludox HS 40 ist eine wässrige kolloidale Siliziumsuspension. Die Extraktion beruht auf der unterschiedlichen spezifischen Dichte zwischen den Nematoden und dem abzutrennenden Substrat, dem Bodenmaterial. Das Ludox weist eine höhere spezifische Dichte auf als die Nematoden, so dass diese unter Schütteln aus dem Testsubstrat eluiert werden.

Der Test wird nach 96 h beendet, in dem die Ansätze für 2 min in ein Wasserbad mit 80°C gestellt werden. Durch die Hitze werden die Nematoden abgetötet. Im Anschluss wird zu jedem Ansatz je 2 ml Ludox HS 40 gegeben und kräftig geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 750 x g befinden sich die Nematoden im Überstand. Der Überstand wird in ein 50 ml Zentrifugentube dekantiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach dem



letzten Zentrifugieren wird der Überstand mit einer Pipette abgenommen, um möglichst alle Nematoden zu erhalten.

*Färbung der Nematoden:*

Die Nematoden wurden zum besseren Auszählen mit Coomassie angefärbt, einem Farbstoff, welches die Proteine eines Organismus färbt. Dazu wurden 300 µl zum Überstand (ca. 7 ml) gegeben. Die Zentrifugentubes wurden für 5 min in ein Wasserbad mit 80°C gestellt, da das Coomassie bei hohen Temperaturen die Proteine besser anfärbt. Die günstigste Einwirkzeit und Konzentration des Coomassie wurde in einem Vorversuch ermittelt. Das restliche Coomassie wurde mit 30 ml bidest. H<sub>2</sub>O über einen Zentrifugations-schritt bei 5000 x g für 20 min wieder ausgewaschen. Der erhaltene Überstand wurde mittels einer Pipette vorsichtig abgenommen und das Volumen bestimmt, um es zur späteren Berechnung der Individuenzahl und des Vermehrungs-faktors heranziehen zu können.

*Auszählen der Nematoden und Bestimmung der Reproduktion:*

Von jedem Ansatz wurden 6 Aliquote unter einem Mikroskop ausgezählt, um die Anzahl an Nematoden möglichst genau zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden 100 µl des Nematodenextraktes entnommen, vorsichtig auf eine Spur eines beschichteten Objektträgers gegeben und gezählt. Aus dem bestimmten Volumen des Nematodenextraktes und der ausgezählten Nematodenanzahl wurde die Individuenzahl (I) berechnet. Dabei wurde der Mittelwert noch mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Anzahl der Individuen pro ml zu erhalten, da die Tiere in 100 µl Aliquoten ausgezählt wurden.

$$I = (X \times 10) \times Ne$$

X = Mittelwert der 6 Aliquote

Ne = Volumen des Aliquotes

### 2.1.5.2. Auswertung der Daten

Jede Versuchsreihe wurde zweimal durchgeführt (resultierend n=8). Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung absolut berechnet und als Prozentwerte relativ zur Kontrolle bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Nematodenzahl in % Reproduktion gegenüber der Dosis der jeweiligen Testsubstanz in einem Diagramm aufgetragen. Die weitere statistische Analyse zur Bestimmung der Signifikanz wurde wieder mit dem Programm Sigma Stat 3.0 (SPSS Inc.) ausgeführt (vergleiche 2.1.4.2.).

### 2.1.6. *Biomonitor-Tests auf DNA-Ebene*

#### 2.1.6.1. Durchführung und Ernte einer *C. elegans* Synchron-Flüssigkultur

Für die Flüssigkultur wurde eine ausreichende Anzahl von mit OP50-Bakterien beimpfter NGM-Platten (100-180) angesetzt und für drei Tage bei 20°C inkubiert (Stadium mit vielen L1 Larven). Die Würmer wurden dann mit zwei bis drei ml Basalmedium ohne Zusätze von den Platten gespült und die Suspension in einem sterilen Gefäß gesammelt. Anschließend wurden die Tiere über eine Filtrationseinheit (Sartorius SM 16510/11) gegeben, welche mit einem 10 µm Membranfilter bestückt war. Durch diese Filterporengröße war es möglich Nematoden im L1 Stadium aus einer Wurmsuspension mit gemischten Entwicklungsstadien sicher und zuverlässig herauszufiltrieren, ohne dass die Würmer dabei durch den Einsatz von Chemikalien, (wie z.B. Natriumhypochlorit) geschädigt wurden. Die so im Filtrat gewonnenen L1 Würmer wurden mit Basalmedium und Zusätzen sowie OP50-Bakterien (3 mg Frischgewicht/ml) in Kultur gebracht, nach 24 h induziert und nach weiteren 48 h geerntet werden. Die Zugabe der Chemikalien erfolgte immer in flüssiger Form unter Verwendung einer in DMSO gelösten Stammlösung. Die DMSO

Endkonzentration im Medium betrug immer konstant 0,3 % (v/v), dies war auch der Wert für die Kontrollprobe.

Die Ernte der Kultur wurde durch eine Saccharoseflotation erweitert, um sicher zu gehen, dass sich ausschließlich Würmer im späteren Pellet befinden. Durch die Zugabe einer eisgekühlten Mischung von gleichen Teilen 60%iger (w/v) Saccharoselösung und M9-Puffer (nach zwei ersten Waschschritten mit M9-Puffer) flottierten die Würmer während einer 5 minütigen Zentrifugation bei 2000 x g in die obere Phase und konnten anschließend mit Hilfe einer Pipette in ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt werden. Zum Entfernen der sich noch im abgenommenen Wurmüberstand befindlichen Saccharose wurden abschließend drei Waschschrritte mit M9-Puffer durchgeführt, bevor das Wurmpellet bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden konnte.

#### 2.1.6.2. Gesamt-RNA Präparation

Nach der Wurmernte erfolgte direkt die Zugabe von vier Volumen Trizol pro einem Volumen Wurmpellet, die Lösung wurde 30 s gevortext und anschließend zur Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die Weiterbearbeitung wurde alles im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und dann direkt wieder in flüssigen Stickstoff eingefroren. Dieser Schritt wurde sechsmal wiederholt und diente dazu, die Wurmzellen aufzubrechen. Anschließend wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  mindestens über Nacht eingefroren, am nächsten Tag aufgetaut und sechsmal für je 30 s gevortext. Die Proben wurden in neue 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann mit 2 ml Chloroform pro 1 ml Wurmpellet versetzt. Nach 15 s Schütteln mit der Hand wurden die Proben für 5 min bei 4000 x g zentrifugiert und die RNA aus der oberen wässrigen Phase in ein neues Röhrchen abpipettiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und die wässrige Phase diesmal in ein kleines steriles Corexröhrchen überführt. Nach Zugabe von einem Volumen Ethanol wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert und damit die RNA gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 20

min bei 10.000 x g in der Kühlzentrifuge (Sorvall, SS34 Rotor) zentrifugiert, der Überstand abgegossen, die Pellets mit 15 ml 70 % Ethanol gewaschen, kurz bei 70°C im Wasserbad erwärmt und 5 min bei 10.000 x g in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt und die Pellets anschließend an der Luft getrocknet. Zum Eluieren wurde 200-1500 µl RNase freies A. bidest. in die Röhrchen gegeben und durch vorsichtiges Pipettieren das Pellet im Wasser resuspendiert. Zum weiteren Lösen wurde das Röhrchen für 1 min in ein Wasserbad bei 65-70°C gehalten und das Eluat anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefberfhrt. Für die Bestimmung der optischen Dichte (OD) am Fotometer wurde ein Aliquot entnommen und daraus eine geeignete Verdünnung hergestellt.

#### 2.1.6.3. mRNA Präparation

Die Präparation der mRNA erfolgte mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen) bzw. mit dem NucleoTrap mRNA Mini Kit (Macherey & Nagel) aus Gesamt-RNA. Die Präparationsmethode ist für beide Kits nahezu identisch und unterscheidet sich lediglich in der Bezeichnung der zu verwendenden Puffer, so dass hier exemplarisch nur die Präparation mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini Kits von Qiagen dargestellt wird.

Eine definierte Menge an RNA ( $\leq 0,25$  mg) wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 250 µl gebracht und mit 250 µl OBB-Puffer und 15 µl Oligotexsuspension versetzt. Nachdem die Lösungen durch vorsichtiges Pipettieren ausreichend miteinander vermischt waren, wurde das Reaktionsgefäß für 3 min bei 70°C in einem Heizblock (Eppendorf, Thermomixer 5436) erwärmt und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min stehen gelassen. Dieser Schritt diente dazu die Poly-A-Schwänze der mRNA mit den Oligotex-Partikeln zu verbinden. Zum Waschen der Proben wurden sie nach dem Pelletieren durch Zentrifugation bei 14.000 x g (Biofuge 13, Heraeus) für 2 min wieder in 400 µl OW2-Puffer resuspendiert, die Suspension auf ein Zentrifugationssulchen gegeben, für 1

min bei 14.000 x g zentrifugiert und der Waschschrift wiederholt. Das Eluieren erfolgte mit zweimal 20 µl auf 70°C erhitzten OEB-Puffer. Dazu wurden 20 µl Puffer auf die Säule gegeben, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren das Oligotex resuspendiert, für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert und der Schritt wiederholt. Aus dem Eluat wurde ein Aliquot für die Bestimmung der mRNA-Konzentration entnommen und mittels eines Fotometers die optische Dichte bestimmt.

#### 2.1.6.4. Gesamtgenomischer DNA Microarray von *C. elegans*

Die Experimente mit dem gesamtgenomischen DNA Microarray von *C. elegans* wurden durchgeführt, um relevante Gene für den Celegans Toxchip auswählen zu können. Die Experimente wurden durch eine Kooperation mit dem Labor von Stuart Kim an der Stanford University in Kalifornien (USA) möglich. Dazu wurde in Deutschland aus den entsprechenden Wurmulturen die mRNA präpariert und die Proben in der Regel anschließend mittels eines Kurier-dienstes auf Trockeneis nach Stanford versandt, wo dann die eigentlichen Array-Experimente und die Auswertung durchgeführt wurden. Für einen Teil der Experimente war es auch möglich persönlich die Experimente in Stanford durchzuführen. Die eingesetzten Chemikalien waren: Fluoranthen (0,5 mg/l), β-Naphthoflavon (5 mg/l), DES (0,5 mg/l), Atrazin (25 mg/l) und Clofibrat (10 mg/l). Für Atrazin und Fluoranthen wurde jeweils die mRNA aus vier, für β-Naphthoflavon und Clofibrat aus drei und für DES aus zwei unabhängigen Kulturen präpariert und für die Hybridisierungsexperimente eingesetzt.

##### 2.1.6.4.1. Reverse Transkription und Hybridisierung

Das eigentliche Array-Experiment bestand aus zwei Arbeitsschritten. Der erste Schritt umfasste die Umschreibung und dabei auch Markierung der mRNA mit Fluoreszenzfarbstoffen zu cDNA während der Reversen Transkription. Der zweite Schritt war die eigentliche Hybridisierung, d.h. das Binden der markierten

cDNA an die auf den Glasträger gespotteten PCR-Fragmente. Für die Markierung der Proben wurden die Fluoreszenzfarbstoffnukleotide Cy3-dUTP für die Kontrollprobe und Cy5-dUTP für die Testsubstanz-induzierte Probe verwendet. Sämtlicher Umgang mit den Farbstoffen musste möglichst unter Lichtausschluss erfolgen, um ein vorzeitiges Ausbleichen zu vermeiden.

### *Reverse Transkription*

Eine definierte Menge an mRNA (von 3-5 µg in max. 8 µl), jeweils aus der Kontrollprobe und der korrespondierenden Testsubstanz-induzierten Probe, wurde mit 1,5 µl eines 22-mer Oligo (dT)-Primer in einer Konzentration von 2 µg/ µl (Operon) jeweils in ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit DEPC behandelten A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 9,5 µl gebracht, im Heizblock bei 70°C für 10 min erhitzt und anschließend für 8 min auf Eis abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurden zu den Proben folgende Substanzen hinzugegeben:

DEPC behandeltes A.bidest.	4,4 µl
Cy-dUTP 3/5 (25 mM, Amersham)	3 µl
RNase inhibitor (40 U/ µl, Amersham)	1 µl
Superscript II Enzym (Invitrogen)	2 µl
Trimix	9,6 µl

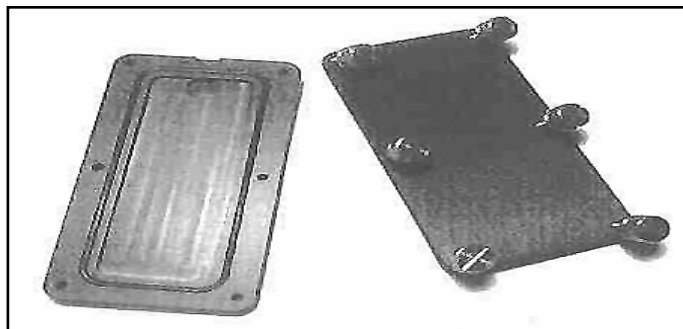
Der Trimix für dUTP bestand dabei aus folgenden Komponenten: 0,6 µl eines 25 mM dATP-, dCTP-, dGTP-/ 10 mM dTTP-Mix, 6 µl vom 5x 1st Strand Buffer (Invitrogen) und 3 µl 0,1 M DTT (Invitrogen). Für eine vereinfachte Handhabung wurde der Trimix als Vorratslösung vorab in einer größeren Menge angesetzt.

Danach wurden die Proben bei 42°C im Heizblock für 1,5 h inkubiert. Zum Degradieren der RNA wurde 1,5 µl 1 M NaOH zugegeben, alles bei 65°C im Heizblock für 10 min inkubiert und anschließend sofort mit 1,44 µl 1 M HCl neutralisiert und zügig mit 35 µl 10 mM Tris (pH=7,4) verdünnt. Beide Proben wurden nun zusammengefasst, mit 500 µl Puffer PB (Qiaquick PCR Purification Kit, Qiagen) auf eine Qiaquick Säule gegeben, 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben,

1 min bei 14.000 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der letzte Schritt wiederholt. Anschließend wurde die Säule 1 min bei 14.000 x g trocken zentrifugiert, auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt, zum Eluieren 30 µl 10 mM Tris auf die Säule gegeben, das Ganze zum Einwirken für 1 min bei Raumtemperatur stengelassen, dann die Säule mit dem Reaktionsgefäß für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert und abschließend das Eluat in der SpeedVac eingetrocknet. Die eingetrocknete Probe wurde dann mit 17,5 µl 10 mM Tris gelöst, 1 µl carrierDNA (Yeast tRNA 20 µg/ µl, Roche), 4 µl 20x SSC und 0,5 µl 10% SDS hinzugefügt, die Probe bei 100°C für 1-2 min erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur für ca. 10 min abgekühlt.

#### *Hybridisierung*

Für die Hybridisierung, d.h. das Binden der markierten Proben an die gespotteten Fragmente auf dem Array, wurde der den Array tragende Objektträger in eine Hybridisierungskammer (Monterey Industries, Abbildung 1) mit der Arrayseite nach oben gelegt. Um das Austrocknen des Arrays zu verhindern wurden vorsichtig 50 µl 1x SSC an den Rand der Kammer pipettiert und abgewartet, dass es sich unter den Objektträger zieht. Anschließend wurde die Probe auf den Array aufgetragen, der Array mit einem staubfreien Deckgläschen abgedeckt, die Hybridisierungskammer gut verschlossen und zum Hybridisieren für 20 h ins Wasserbad bei 65°C gelegt.



**Abb. 1:** Hybridisierungskammer

Nach der Hybridisierung mussten die Objektträger noch gewaschen werden. Dazu wurden drei unterschiedliche Waschpuffer hergestellt, deren Zusammensetzung Tabelle IV zu entnehmen ist. Die drei Waschpuffer wurden in Färbekammern mit einem Volumen von 250 ml gefüllt, die Objektträger mit Deckgläschen in ein passendes Färbegestell überführt und für 1 min im Waschpuffer 1 hin und her geschwenkt, wobei auch die Deckgläschen von den Objektträger abgeschwemmt wurden.

**Tab. IV:** Zusammensetzung der Waschpuffer

Waschpuffer	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
ddH <sub>2</sub> O	840 ml	990 ml	1000 ml
20x SSC	150 ml	10 ml	-
10% SDS	10 ml	-	-
Zeit	1 min	1 min	1 min

Anschließend wurden die Objektträger in ein neues Färbegestell überführt und für 1 min im Waschpuffer 2 gewaschen. Aus dieser Färbekammer wurde das Gestell mit den Objektträgern direkt in die letzte Färbekammer gefüllt mit Waschpuffer 3 getaucht und dort ebenfalls für 1 min gewaschen. Abschließend wurde das Gestell mit den Objektträger in einer Klinikzentrifuge für 5 min bei 600 rpm trocken zentrifugiert und die Objektträger bis zum Scannen dunkel und trocken aufbewahrt.

#### 2.1.6.4.2. Datengewinnung und Auswertung

Zur Gewinnung von Daten wurden die Arrays mit Hilfe eines Fluoreszenz-scanners (Axon) gescannt und die erhaltenen Bilder mit dem Programm Genepix Pro 3.0 bearbeitet. Die so ermittelten Daten wurden in die Stanford Microarray Datenbank (SMD: <http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/login.pl>) eingeladen und wie bei Sherlock et al. (2001) beschrieben, analysiert. Die eigentliche Evaluation der Daten erfolgte nach den Richtlinien auf der



Homepage von Stuart Kim ([http://cmgm.stanford.edu/~kimlab/data\\_analysis.html](http://cmgm.stanford.edu/~kimlab/data_analysis.html)). Wie bei anderen Autoren beschrieben (Coller et al., 2000; Bartosiewicz et al., 2001; Larkin et al., 2003) wurden bei der Auswertung nur Gene berücksichtigt, deren Expression oder Repression gleich oder über dem zweifachen Wert im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen lagen. Die Induktionsdaten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler vom Mittelwert (SEM) von allen Experimenten dargestellt.

#### 2.1.6.5. Der Celegans Toxchips

##### 2.1.6.5.1. Die Produktion der Genfragmente für den Celegans Toxchip

Die Genselektion für den Celegans Toxchip erfolgte auf Grundlage der Experimente mit dem gesamtgenomischen DNA Array des Labors von Stuart Kim in Stanford, Kalifornien, und wurde ergänzt durch Hinweise aus der Literatur sowie durch Ergebnisse aus Untersuchungen von Menzel et al. (2001). Es konnten insgesamt 66 Gene selektiert werden (eine ausführliche Aufstellung der Gene findet sich unter 2.2.2.), wobei zwei davon, das *ama-1* und *act-3*, als so genannte Housekeeping-Gene fungieren. Housekeeping Gene sind solche Gene, die ständig in konstanter Menge exprimiert werden (Grundfunktionen des Stoffwechsels und zelluläre Struktur, z.B. Aktin) und die damit für die Expressionskontrolle als quantitativer Standard eingesetzt werden können. Zusätzlich zu den ausgewählten Genen wurden Kontrollen auf den Chip gespottet, um eine Rückmeldung über die Güte der Hybridisierung zu erhalten. Sie beinhalten sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen. Eine Auflistung der Kontrollen enthält Tabelle V.

Die Amplifikation der ausgewählten Gene in ausreichender Konzentration für das spätere Spotten der Genfragmente auf den Objektträger erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Dabei musste jedoch zuerst für jedes ausgewählte Gen ein passendes Primerpaar designed werden, welches dann bei der PCR eingesetzt, das entsprechende Genfragment amplifizierte.

**Tab. V:** Hybridisierungskontrollen auf dem *Caenorhabditis elegans* Toxchip

Bezeichnung	Beschreibung	Konzentration
K10	Genom. DNA	10 µg
K6	Genom. DNA	6 µg
K4	Genom. DNA	4 µg
K2	Genom. DNA	2 µg
K1	Genom. DNA	1 µg
K0,5	Genom. DNA	0,5 µg
14/ 4,0	C44H4.3	4 µg
14/ 2,0	C44H4.3	2 µg
14/ 1,0	C44H4.3	1 µg
14/ 0,5	C44H4.3	0,5 µg
56/ 2,0	F59D8.1	2 µg
56/ 1,0	F59D8.1	1 µg
56/ 0,5	F59D8.1	0,5 µg
SP-1	Spottingpuffer	-
Sp-2	Spottingpuffer	-
Sp-3	Spottingpuffer	-

Für Genfragmente, die sich mit Hilfe der PCR nur schwierig amplifizieren ließen, wurde eine Klonierung in ein Plasmid vorgenommen, da sie sich dadurch anschließend deutlich leichter in ausreichender Konzentration herstellen ließen. Für alle Gene wurde eine Testspaltung durchgeführt um sicherzustellen, dass es sich bei ihnen auch um die richtigen Fragmente handelt. Um zu verhindern, dass unerwünschte Beiprodukte wie z.B. Primer oder Nukleotide beim Spotten mit auf den Array kamen, wurden die Proben gereinigt und ihre Konzentration genau bestimmt.

#### *Primerdesign*

Für das Design der Primer wurden zunächst die entsprechenden gesplicten, d.h. die kodierenden Regionen enthaltenden Sequenzen der selektierten Gene aus der Wormbase Datenbank ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)) in das Programm SEC Central eingeladen und dort mit Hilfe des Primer Designers die entsprechenden Primersequenzen ausgewählt. Nachdem die Sequenzen der Primer festgelegt waren, konnten diese über entsprechende Anbieter (Invitrogen, Biotex, Operon, Sigma) synthetisiert werden. Die Primer wurden in kristalliner Form geliefert und

so mit RNase freiem A.bidest. in Lösung gebracht, dass die Endkonzentration der Primerlösung jeweils 50 µM entsprach.

Für 21 Primerpaare der insgesamt 63 war es nicht möglich ein Produkt zu amplifizieren. Durch eine Kooperation mit Joanne Staines vom Sanger Institut in Hinxtton, UK, konnten jedoch neue Primersequenzen bezogen werden, welche eine erfolgreiche Amplifizierung möglich machten. Für drei der Vitellogeningene (*vit-3* = F59D8.1, *vit-4* = F59D8.2 und *vit-5* = C04F6.1) konnten die Primer nur so designed werden, dass das entstehende Produkt für alle drei Gene identisch ist. Gleiches gilt für die beiden Cytochrom P450 Gene 31A1 (C01F6.3) und 31A2 (H02I12.8)

Eine ausführliche tabellarische Übersicht über die Produktlänge der durch die spezifischen Primer gebildeten Genfragmente, sowie die Sequenz der Primer findet sich im Anhang.

#### *Polymerase Ketten Reaktion (PCR)*

Als Template wurden in dieser Arbeit verschiedene Gesamt-cDNA Proben von *C. elegans* gewählt und im späteren Verlauf auch die entstandenen PCR-Produkte selbst eingesetzt. Es wurde mit zwei unterschiedlichen Polymerasen gearbeitet, zum einen wurde die HotStarTaq DNA Polymerase von Qiagen und zum anderen die Taq Polymerase von Promega verwendet.

Für einen typischen 20 µl PCR Ansatz wurden folgende Substanzen in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

<u>Substanz:</u>	<u>HotStarTaq</u>	<u>Promega Taq</u>
MgCl <sub>2</sub> -Puffer (15mM MgCl <sub>2</sub> )	2,0 µl	2,0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 µl	0,4 µl
Polymerase	0,1 µl	0,15µl
A.bidest.	16,1 µl	14,85µl
Primer 1 (50 µM)	0,2 µl	0,2 µl
Primer 2 (50 µM)	0,2 µl	0,2 µl
Template (cDNA)	1,0 µl	1,0 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei standen drei Geräte mit unterschiedlichen Fassungskapazitäten zur Verfügung (UNO von Biometra, Progene und Touchgene Gradient von Techne), die je nach Verfügbarkeit oder Größe des Ansatzes eingesetzt wurden. Es wurden 25-35 Zyklen gefahren, die jeweils drei Schritte beinhalteten:

1. Denaturierung: 1 min bei 94°C
2. Annealing: 1 min bei 45-64°C
3. Extension: 1 min bei 72°C

Nach dem letzten Zyklus wurde ein Endsyntheseschritt von 10 min bei 72°C angehängen. Für die HotStarTaq Polymerase mußte vor dem ersten Denaturierungsschritt einmalig ein Hitzeschritt von 15 min bei 95°C für die Aktivierung der Polymerase durchgeführt werden. Die Annealingtemperaturen für die einzelnen Primer waren unterschiedlich, da sie vom Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) des jeweiligen Primers und von seiner Länge abhängig sind. Die Berechnung der Annealingtemperatur  $T_s$  erfolgte nach Sambrook et al. (1989) unter Verwendung folgender Gleichung:

$$T_s = 69,3 + 0,41 (G+C) - 650/n$$

G+C: prozentualer Anteil G und C des Primers  
n: Primerlänge in Basen

In der Praxis wurden Primer mit ähnlichen Annealingtemperaturen in Gruppen zusammengefasst und jeweils die niedrigste Temperatur abzüglich einem Grad Celsius als Annealingtemperatur für die Gruppe ausgewählt. Die Qualität der durch die PCR gewonnen Produkte wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft und die Proben anschließend bei -20°C gelagert.

### *Klonierung*

Für einige Gene war es schwierig durch PCR alleine eine ausreichende Konzentration für das spätere Spotten auf dem Celegans Toxchip zu gewinnen. Für diese Gene wurde das durch PCR gewonnene, gereinigte Produkt in ein pGEM-T (Promega) Plasmid kloniert. Anschließend wurden die resultierenden

Plasmide aus *E. coli* isoliert und als Template für die PCR eingesetzt. Dies führte zu einer deutlich höheren Ausbeute an Amplimeren. Gleichzeitig ermöglichte dieses Verfahren das Anlegen einer stabilen Templatekonserve für das entsprechende Genfragment. Die Klonierung umfasste insgesamt drei Schritte. Das Anlegen chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen, den Einbau des fraglichen Fragments in einen Vektor und die daran anschließende Transformation in kompetenten *E.coli*-Zellen mit abschließender Präparation des rekombinanten Plasmides. Alle Schritte wurden nach etablierten Methoden gemäß Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

#### *Restriktionsanalyse*

Um Abzusichern, dass das erhaltene PCR-Produkt auch dem gewünschten Genfragment entspricht, wurden jeweils Testspaltungen durchgeführt. Die in Frage kommenden Sequenzen der Genfragmente wurden aus der Datenbank WormBase ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)) in das Programm SECentral (Scientific Educational Software) geladen, die entsprechenden Restriktionsorte ausgewählt und die durch das Schneiden entstehenden Fragmentlängen für die spätere Auswertung mittels Gelelektrophorese bestimmt. Für eine typische Testspaltung wurde folgender Ansatz pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert:

PCR-Produkt	1,0 µl
Puffer	1,5 µl
Restriktionsenzym 1	0,2 µl
Restriktionsenzym 2	0,2 µl
A.bidest.	12,1 µl

Die Größe der durch die Restriktion erhaltenen Fragmente wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese ermittelt und die so erhaltenen Längen mit denen durch das Programm SECentral berechneten verglichen. Als Größenstandard wurde eine 200 Bp-Leiter verwendet.

### *Reinigung der Fragmente*

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick 8 PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt, um z.B. überschüssige Primer zu eliminieren. Diese Vorgehensweise gewährleistete, dass beim späteren Spotten wirklich nur die jeweiligen Genfragmente auf den Chip aufgebracht wurden. Die 6x8 Säulen fassende Apparatur wurde mit Hilfe eines Vakuumregulators (Qiagen) an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Die gewünschte Säulenzahl in die entsprechenden Halterungen gesteckt, die zu reinigenden Proben auf die Säulen gegeben und mehrmals mit den jeweils vorgesehenen Puffer gewaschen. Dabei wurden Fragmente ab einer Länge von 100 Bp von dem Säulenmaterial zurückgehalten und kleinere Fragmente, wie z.B. Primer und Nukleotide, aber auch Polymerasen und Salze, ausgewaschen. Die vom Säulenmaterial zurückgehaltenen Genfragmente wurden abschließend zweimal mit 20 bis 40 µl A. bidest (pH 7,5) eluiert. Für spätere Konzentrationsberechnungen wurde das Volumen des Eluats notiert. Eine ausführlichere Anleitung befindet sich im QIAquick Spin Handbuch (Qiagen, Stand März 2001).

Eine weitere Möglichkeit der Reinigung, die nur für einzelne Genfragmente eingesetzt wurde, ist die Reinigung aus dem Agarosegel. Dazu wurde die zu reinigende Probe nach Beendigung der Gelelektrophorese aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Reinigung wurde mit dem von Amersham erhältlichen „GFX PCR DNA und Gel Band Purification Kit“ durchgeführt. Das Gelstück wurde zusammen mit dem im Kit enthaltenen Capture Buffer bei 60°C gelöst und auf eine GFX-Säule gegeben. Es wurde kurz zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus) und mit einem Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurde zweimal mit je 25 µl A. bidest eluiert. Eine detaillierte Beschreibung ist im Amersham-Handbuch nachzulesen. Mit Hilfe einer abschließenden Gelelektrophorese wurde die Qualität der gereinigten Fragmente im Hinblick auf Verunreinigungen überprüft.

#### *Konzentrationsbestimmung der Fragmente*

Die Quantifizierung der gereinigten DNA-Fragmente erfolgte im DNA Agarosegel mit Hilfe des kommerziellen DNA-Mengenstandards QuantStandard (100 ng/ $\mu$ l, 1000 bp, Gensura). Je 2  $\mu$ l einer gereinigten DNA-Probe wurden mit 0,2  $\mu$ l Probenverdünnungspuffer vermischt und zusammen mit einer Verdünnungsreihe des Mengenstandards auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Konzentration in den einzelnen Proben wurde mit Hilfe des Programms Alphamager (AlphaInnotech, USA) anhand der Leuchtintensität der Banden im Vergleich zu einem mitgeführten Standard ermittelt.

#### 2.1.6.5.2. Herstellung des Celegans Toxchips

Die Herstellung der Genchips untergliederte sich in drei Phasen. Um eine gute Bindekapazität für die aufzuspottenden Genfragmente zu erhalten, wurden zunächst die verwendeten Glasobjektträger mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet. Anschließend wurden die Genfragmente auf die beschichteten Objektträger gespottet. Abschließend wurde die kovalente Bindung zwischen den Genfragmenten und der beschichteten Chipoberfläche durch ein sogenanntes Crosslinken mit UV-Strahlung fixiert.

#### *Beschichtung der Objektträgers mit Poly-L-Lysin-Lösung*

Bevor die Objektträger (25x75x1 mm, SuperFrostPlus, Menzel-Gläser) mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet werden konnten, mussten sie zunächst gereinigt werden. Dazu wurde eine Waschlösung aus 61,25 g NaOH, 245 ml A. bidest. und 367,5 ml Ethanol (100%) hergestellt. Die Waschlösung wurde auf eine große und eine kleine Färbekammer aufgeteilt, 30 Objektträger in zwei Objektträgerhalter eingeordnet und diese in die Kammern gestellt. Nachdem sie zwei Stunden auf einem Orbitalshaker (Typ VX7, Janke&Kunkel) geschüttelt worden waren, wurden die Objektträger in neue, mit frischem A. bidest. gefüllte, Kammern überführt und gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde viermal mit frischem Wasser wiederholt. Für die Herstellung der Poly-L-Lysin-Lösung

wurden 52,5 ml Poly-L-Lysin (0,1% w/v in Wasser, Sigma), 52,5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma) und 420 ml A. bidest zusammen gegeben und gut vermischt. In der Lösung wurden die Objektträger ca. 60 min geschüttelt. Anschließend wurden die Objektträger zweimal mit A. bidest gewaschen, einzeln in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) 5 min bei 40 x g zentrifugiert (Zentrifuge 3-1, Sigma), in eine weitere Färbekammer überführt und in einem Vakuumofen (Hybaid, Biometra) bei 45°C 10 Minuten gut durchgetrocknet.

### *Spotten der Arrays*

Das Spotten wurde am MPI für Infektionsbiologie, Berlin, in der Microarrayabteilung von Dr. Mollenkopf durch Jörg Angermann durchgeführt. Vor dem Spotten wurden die gereinigten Genfragmente in einer Speedvac eingetrocknet, um dann in Spottingpuffer (0,01% Sarcosyl, 15 mM Natriumphosphatpuffer) aufgenommen und in eine 384 Multiwellplatte überführt zu werden. Für das Spotten wurde der Spottingroboter MicroGrid II von BioRobotics (Abbildung 2). verwendet. Dieser platziert mittels Kapillarkraft die einzelnen Spots in definierter Reihenfolge auf die mit Poly-L-lysin-Lösung beschichteten Chips. Jedes Gen wurde dabei pro Array viermal nebeneinander gespottet. Pro Genchip wurden zwei Arrays angelegt.



**Abb. 2:** Spottingroboter MicroGrid II von BioRobotics



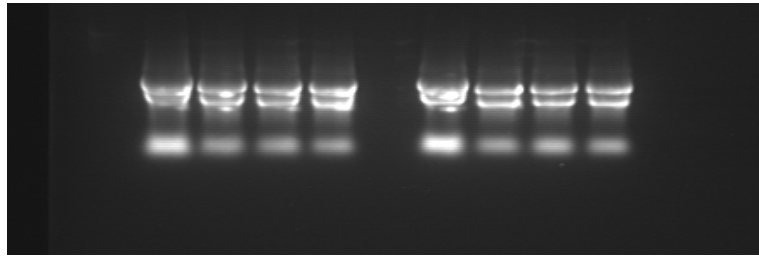
### *Nachbehandlung der Arrays*

Um die Ergebnisse der späteren Hybridisierung zu optimieren, wurden die Objektträger zunächst über Wasserdampf gehalten, bis sie beschlugen. Die Objektträger wurden anschließend auf einer Heizplatte mit der Array tragenden Seite nach oben bei ca. 80°C einige Sekunden getrocknet. Das Fixieren der kovalenten Bindung zwischen den PCR-Produkten und der beschichteten Chipoberfläche erfolgte anschließend durch Crosslinken unter UV-Licht bei einer Energie von 240 mJ. Zum Blocken freier Valenzen wurden die Chips 20 min unter Rühren in eine Lösung aus 3,3 g Bernsteinsäureanhydrid (Aldrich), 205 ml 1-Methyl-2-pyrrolidinone (Aldrich) und 4,6 ml Natriumborat (1 M, pH 8,0) getaucht. Danach wurden die Chips zum Denaturieren und Waschen mehrmals in 95°C heißem A.bidest. geschwenkt und abschließend getrocknet.

#### 2.1.6.5.3. Reverse Transkription und Hybridisierung

Da die Reverse Transkription und Hybridisierung bereits ausführlich unter 2.1.6.4.1. beschrieben wurde, wird im Folgenden nur näher auf die speziellen Modifikationen des Celegans Toxchip eingegangen. Erste Hybridisierungsexperimente unter Verwendung des CyScribe cDNA Post Labelling Kits (Amersham) bzw. später des Stanforder Protokolls führten noch nicht zum erwünschten Erfolg. Deshalb wurde das Verfahren, wie nachfolgend dargestellt, erfolgreich abgewandelt.

Vor Verwendung der RNA wurde diese mittels Gelelektrophorese überprüft, um sicherzustellen, dass sie nicht degradiert ist (Abbildung 3). Weiterhin wurde durch eine Bestimmung der optischen Dichte am Fotometer direkt vor Verwendung der RNA abgesichert, dass für die Reverse Transkription Gesamt-RNA in einer Menge von 25 µg in einem Volumen von 5-6,5 µl eingesetzt wurde. Nach der cDNA-Synthese und anschließender RNA-Degradation wurden die Proben mit 1,44 µl 1M HCl neutralisiert und mit 500 µl TE-Puffer verdünnt. Jede Probe wurde nun auf eine Microcon-30-Säule (Amicon) gegeben und alles 12 min bei 12.000 x g zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus).



**Abb. 3:** Typisches Gelfoto isolierter RNA-Proben

Die distinkten Banden stellen die rRNA dar, die ca. 75-80% der Gesamt-RNA ausmacht. Die oberste Bande wird durch die 28S-rRNA, die mittlere durch die 18S-rRNA und die unterste Bande durch die 5,8S-rRNA hervorgerufen. Diese charakteristischen Banden der Proben zeigen, dass die RNA nicht durch Abbauprozesse degradiert worden ist.

Nach einem Waschen der Säulen mit 500  $\mu$ l TE-Puffer und anschließender Zentrifugation von 12 min bei 12.000 x g, wurden die Säulen umgedreht in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und 5 Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Dann wurden die jeweilige Kontrolle und Probe zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben, 1  $\mu$ l Yeast tRNA (20  $\mu$ g/ $\mu$ l) hinzugefügt und in der Speedvac soweit eingengt, bis sie fast trocken war. Anschließend wurde die Probe mit ca. 30  $\mu$ l DigEasyHyb-Puffer (Roche) wieder aufgenommen, zum Auftrennen der Doppelstränge für 3 min bei 95°C im Heizblock erhitzt, dann 2 min auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Für die Hybridisierung wurde die Probe auf den Array gegeben und mit einem HybriSlip HS22 (22x22 mm, Sigma) abgedeckt. Dies erfordert Geschick, da die Hybrislips auf einen genau definierten Platz vorsichtig aufgelegt werden müssen. Dabei dürfen möglichst keine Luftblasen entstehen. Ist das dennoch der Fall, so müssen diese sehr vorsichtig entfernt werden, da die Deckgläschen nicht mehr verschoben werden dürfen. Bei allen Schritten, in denen mit den Slides gearbeitet wird, muss auf eine staubfreie Umgebung geachtet werden, da Verunreinigungen später auf dem Chip sichtbar sind und sich gegebenenfalls negativ auf die Auswertung auswirken können. Abschließend wurde die den Chip tragende Hybridisierungskammer (Monterey Industries, USA) gut verschlossen und zum Hybridisieren für 16 h ins Wasserbad bei 42°C gelegt.

Nach der Hybridisierung wurden die Genchips in drei unterschiedlichen Waschpuffern jeweils für 10 min gewaschen. Die Zusammensetzung der Waschpuffer ist Tabelle VI zu entnehmen. Ein Teil des Waschpuffers 1 wurde in eine Spritzflasche gegeben und diente zum Abspülen der Hybrislips. Dann wurden die Chips in eine mit Waschlösung 1 gefüllte Färbekammer gesetzt und mit Hilfe eines Rührfisches 6-10 min unter Rühren gewaschen. Dieser Vorgang wurde dann mit Waschlösung 2 und schließlich mit Waschlösung 3 wiederholt, wobei darauf zu achten war, dass die Chips zwischendurch nicht trockneten. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Chips einzeln in neue Zentrifugenröhrchen überführt und 4 min bei 300 x g trocken zentrifugiert. Bis zum Scannen wurden die Chips dunkel und trocken gelagert.

**Tab. VI:** Zusammensetzung der Waschpuffer des Celegans Toxchip

Waschpuffer	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
ddH <sub>2</sub> O	950 ml	990 ml	1000 ml
20x SSC <sup>1</sup>	50 ml	10 ml	2,5 ml
10% SDS <sup>2</sup>	6 ml	-	-
Zeit	6-10 min	6-10 min	6-10 min

<sup>1</sup> – Natriumcitrat, Natriumchlorid

<sup>2</sup> – Natriumdodecylsulfat

#### 2.1.6.5.4. Datengewinnung und Auswertung

Das Scannen der Chips wurde am MPI für Infektionsbiologie, Servicegruppe Microarrays, später im Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité mit Hilfe eines Fluoreszenzlaserscanners (Agilent; Abbildung 4) durchgeführt. Dabei wurde durch den Scanner ein Bild erzeugt und auf einen Rechner transferiert, welches die durch den Laser angeregten Spots zeigt. Die Intensitäten und Ratios der einzelnen Spots wurden mit dem Programm ImaGene5 Standard (BioDiscoveries) berechnet und die so erhaltenen Rohdaten mit



**Abb. 4:** Agilent Microarray Scanner

Hilfe des Programms GeneSight 3.2 (BioDiscoveries) ausgewertet. Die Normalisierung der Daten erfolgte dabei durchgehend auf das Housekeeping-Gen *act-3*. Die Berechnung der Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten sowie die Ermittlung des Standardfehlers erfolgten mit Hilfe des Programms SigmaPlot 8.0. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler vom Mittelwert (SEM) aller Experimente.

Wie bereits unter 2.1.6.4.2. beschrieben, wurden bei der Auswertung nur Gene berücksichtigt, deren Expression  $\geq$  dem zweifachen Wert im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen lagen. Durch den Einsatz unterschiedlicher Software für die Auswertung der Ergebnisse der gesamtgenomischen Microarray und der *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimente ergab sich für die Darstellung der Ergebnisse reprimierter Gene eine unterschiedliche Schreibweise. Für die Auswertung der *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimente galten Gene als reprimiert, die Werte kleiner gleich der 0,4 fachen Induktion im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen.

#### 2.1.6.5. Single worm RT-PCR

Für die semiquantitativen Single worm RT-PCR Untersuchungen wurden die Nematoden nach dem gleichen Protokoll wie für die DNA Array Experimente in Flüssigmedium kultiviert (vergleiche 2.1.6.1.) Folgende Testsubstanzen (in drei

unterschiedlichen Konzentrationen) kamen zum Einsatz: Fluoranthen,  $\beta$ -Naphthoflavon, PCB52, Lansoprazol und Atrazin. Die Induktionszeit betrug jedoch nur 48 h. Auch die Ernte der Tiere erfolgte wie unter 2.1.6.1. beschrieben.

Für den eigentlichen Test wurden 10-20 Tiere (in insgesamt 50  $\mu$ l A. dest) 1 min Minute kräftig geschüttelt. Die Probe wurde dann minimal 20 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren, anschließend für 30 sec im  $65^{\circ}\text{C}$  Wasserbad inkubiert und für 1 min kräftig geschüttelt. Es folgte eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von der Zugabe von 40  $\mu$ l Chloroform. Das jetzt zweiphasige Gemisch wurde kräftig geschüttelt und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde vorsichtig in ein neues Tube überführt und ein gleiches Volumen Chloroform zugeben. Die Probe wurde wieder geschüttelt, zentrifugiert und die obere Phase wurde erneut in ein frisches Tube überpipettiert. Der Probe wurden jetzt 2  $\mu$ l Glykogen (5 mg/ml) als Fällhilfe zugesetzt, anschließend erfolgte die RNA Fällung durch Zugabe von 100  $\mu$ l Isopropanol (vorsichtig umschütteln, 10 min Raumtemperatur). Die Proben wurden für 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $20.000 \times g$  zentrifugiert, das Pellet mit 200  $\mu$ l 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10  $\mu$ l 5 mM Tris/HCl Puffer (pH=8,0) aufgenommen.

Anschließend wurde die gesamte Probe für die cDNA Synthese eingesetzt. Es erfolgte die Zugabe von 0,8  $\mu$ l oligo dT Primer, eine Inkubation bei  $65^{\circ}\text{C}$  für 5 min gefolgt von 15 min Inkubation bei Raumtemperatur. Als Reverse Transkriptase (RT) wurde für diese Experimente die MMLV-RT von der Firma Promega verwendet. Folgende Substanzen wurden der vorbereiteten Probe noch zugesetzt:

5 x RT-Puffer:	3,0 $\mu$ l
dNTPs	0,8 $\mu$ l
RT	0,4 $\mu$ l

Der Ansatz wurde für 1 h bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert und abschließend für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  abgestoppt.

Im Folgenden waren die cDNA Proben bereit für die PCR. Dazu wurden Verdünnungsreihen angelegt (in 5 mM Tris/HCl Puffer; pH=8,0) und in einem ersten Schritt zwei Primer für das Aktinogen *act-1* (als ein konstitutiv exprimiertes Gen, ein so genanntes housekeeping gene) für die PCR (vergleiche dazu 2.1.6.5.1.) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurde in einer DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Die quantitative Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe eines computergestützten Imagers (Alphamager von Alpha Innotech, USA) und der dazugehörigen Software. Das *act-1* Expressionslevel diente dabei als interner Standard, das heißt es wurde jeweils soviel cDNA Probe für die PCR eingesetzt, dass die *act-1* Expression für Proben eines Experimentes das gleiche Expressionsniveau zeigten. Es folgten dann die PCR Experimente mit spezifischen Primern für die Cytochrom P450 Gene 35A1, A2, A3 und A5. Es wurde dann eine relative Auswertung vorgenommen, wobei das spezifische Expressionsniveau in der Kontrolle (mit 0,3% DMSO im Medium) jeweils auf 1 gesetzt wurde. Die ermittelten Werte für die Testsubstanzen inkubierten Proben stehen als Faktoren, die entsprechend eine Vervielfachung der Expression der untersuchten Gene anzeigt. Für jede Testsubstanz wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt sowie der Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

#### 2.1.6.6. Erfassung der Fluoreszenzemission des GFP produzierenden *C. elegans* Stammes

Auch die Kultivierung, Testsubstanzinkubation und Ernte der für die GFP Untersuchungen kultivierten Nematoden folgte dem bereits unter 2.1.6.1. beschriebenen Protokoll. Es wurden die gleichen fünf Testsubstanzen wie für die RT-PCR Untersuchungen eingesetzt, die Induktionszeit betrug 48 h. Als Teststamm wurde für diese Untersuchungen jedoch ein transgener Nematodenstamm eingesetzt, welcher transgen in seiner Erbinformation ein zusätzliches Genkonstrukt bestehend aus dem CYP35A3 Promotor und dem

Gen für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) enthält. Dabei wurde ein 2000 bp langer Promoterbereich (direkt vor dem kodierenden Bereich des Cytochrom P450 3A3 Gens direkt in Front des GFP Gens kloniert und in die Nematoden eingeführt (Menzel et al., 2001). Dieses Testsystem zeichnet sich dadurch aus, dass der relative Induktionsstatus des CYP Promotors (und damit dessen Expressionsniveau) ohne weitere Experimente sofort an Hand der GFP Produktion bestimmt werden kann.

Nach der Inkubation und Ernte der Nematoden wurden für jede Probe einzeln 10 adulte Tiere auf einen Objektträger überführt und unter einem Fluoreszenzmikroskop (200, Nikon) betrachtet. Mit Hilfe eines computergestützten Imagers (AlphaMager von Alpha Innotech, USA) wurde dann für jeden Nematoden einzeln die Lichtemission im grünen Bereich (500 nm) quantitativ bestimmt.

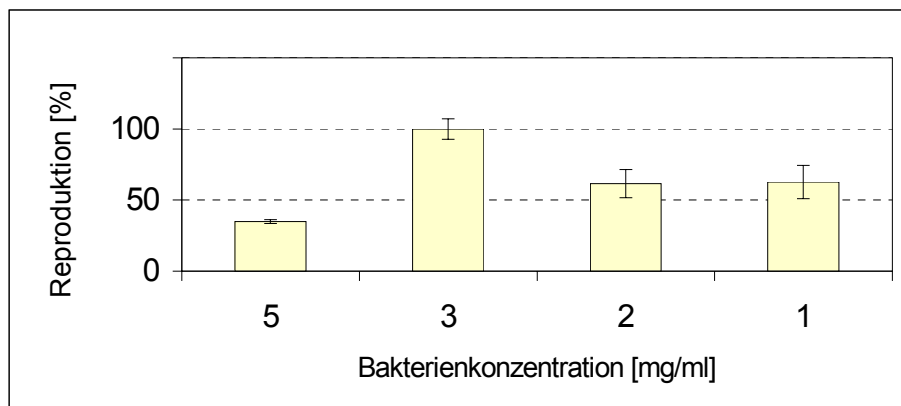
Für jede Testsubstanz wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt sowie der Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Für die abschließende relative Auswertung wurde Expressionsniveau in der Kontrolle (mit 0,3% DMSO im Medium) jeweils auf 1 festgesetzt. Die ermittelten Werte für die Testsubstanzen inkubierten Proben stehen als Faktoren, die entsprechend eine Vervielfachung der Expression der untersuchten Gene anzeigen.

## 2.2. Ergebnisse

### 2.2.1. *Caenorhabditis elegans* Reproduktionstest in Flüssigmedium

#### 2.2.1.1. Voruntersuchungen zur Menge der Bakterienzugabe

Es stellte sich relativ schnell heraus, dass die ursprünglich gewählte Bakterienkonzentration von 5 mg/ml (Frischgewicht) einen eher negativen Einfluss auf den Versuch hatte und das Optimum bei einem niedrigeren Wert zu suchen war. Bei einem Testvolumen von 1 ml und einem Einsatz von 1000 Würmern wurden 5 mg; 3 mg; 2 mg und 1 mg Bakterien OP50 (Frischgewicht) in der Suspension zugegeben. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 5.



**Abb. 5:** Nematodenreproduktion in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration.

Dargestellt sind relative Daten in Prozent, wobei der höchste erhaltene Wert (bei 3 mg/ml) auf 100% gesetzt wurde. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung (n=4).

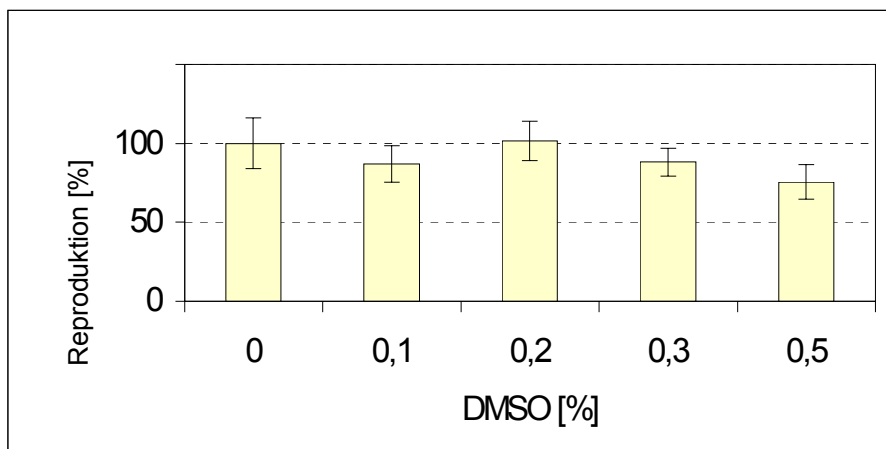
Die ursprünglich mit diesem Testsystem verwendete Bakterienmenge von 5 mg/ml erwies sich als signifikant schlechter als der Einsatz von 3 mg/ml ( $p < 0,05$ ). Alle folgenden Versuche wurden mit **3 mg/ml** durchgeführt.



### 2.2.1.2. Voruntersuchungen zum Einfluss des Lösungsmittels

Um sicherzustellen, dass das gewählte Lösungsmittel DMSO nicht bereits allein einen negativen Einfluss auf die Reproduktion von *C. elegans* ausübt, wurde eine Konzentrationsreihe von 0,1% bis 0,5% angesetzt. Die Bakterienzugabe betrug 3 mg/ml.

Bei keinem der Messwerte (Abbildung 6) ergaben sich signifikante Unterschiede zu einem anderen Messwert in der Gruppe. Tendenziell ist jedoch eine Abnahme der Nematodenreproduktion bei einer Erhöhung auf 0,5% DMSO deutlich zu beobachten. Für die weiteren Untersuchungen wurde das Lösungsmittel DMSO mit einer Konzentration von **0,3%** eingesetzt, um eine möglichst hohe Löslichkeit der meist hydrophoben Substanzen zu gewährleisten.



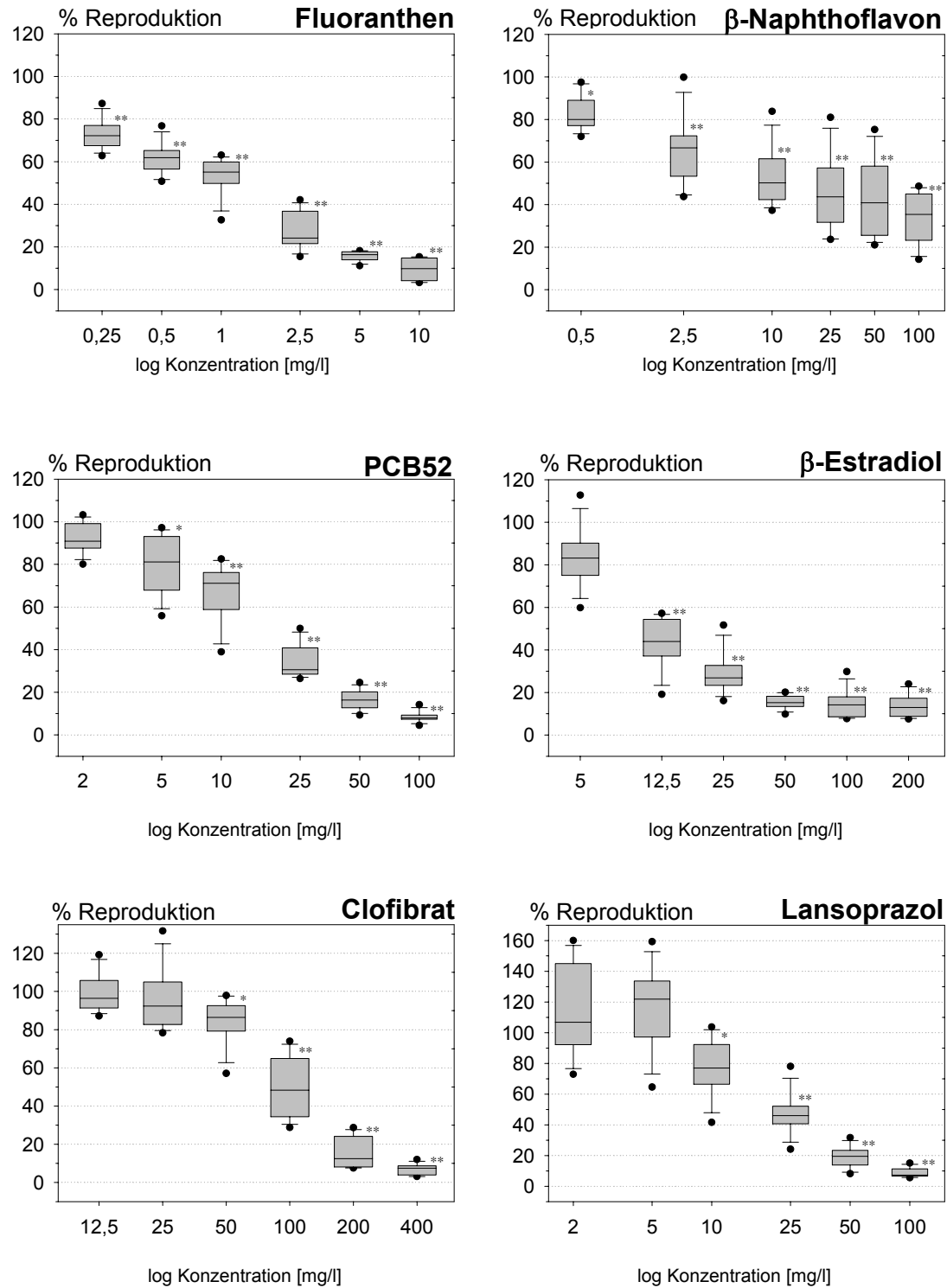
**Abb. 6:** Nematodenreproduktion in Abhängigkeit von der DMSO Konzentration im Medium.

Dargestellt sind relative Daten in Prozent, wobei der Mittelwert ohne DMSO auf 100% gesetzt wurde. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung (n=6).

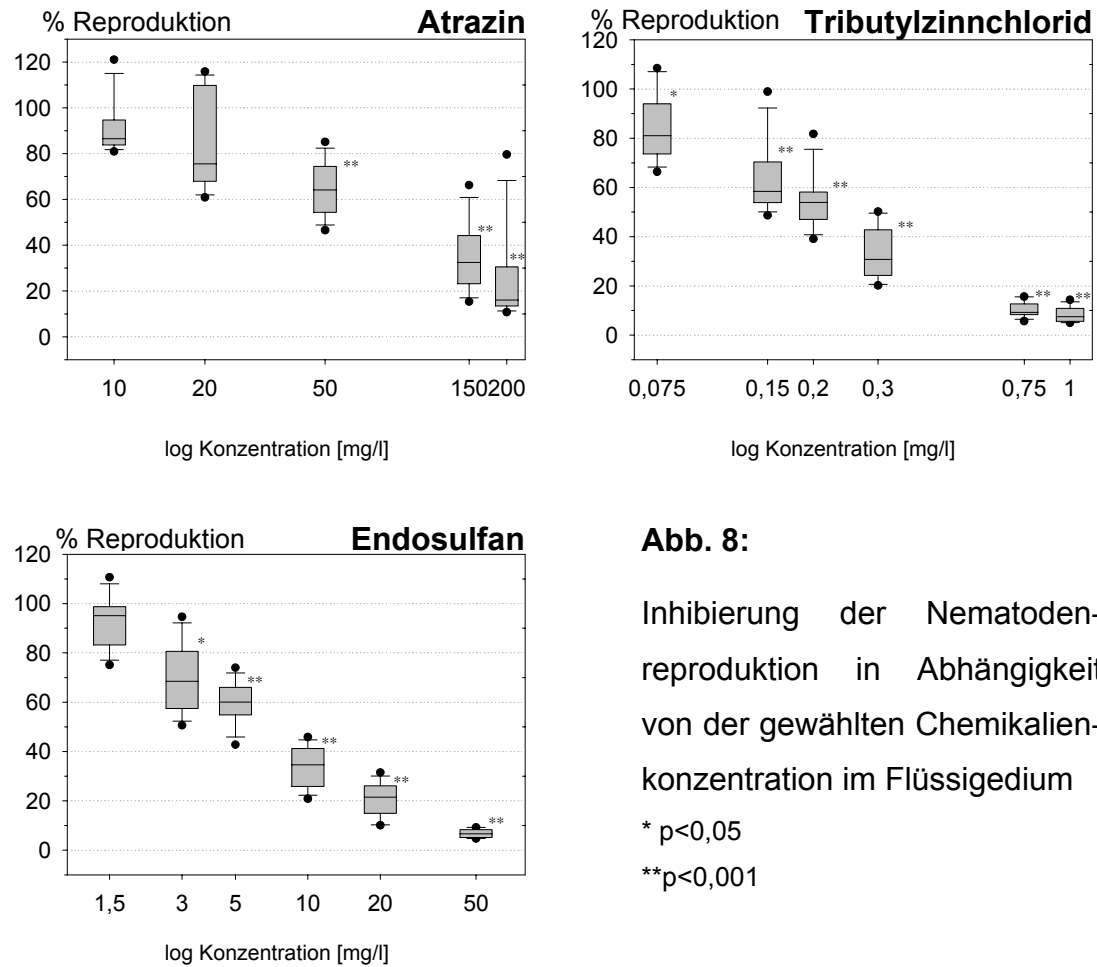
### 2.2.1.3. Ergebnisse des Reproduktionstests für neun Chemikalien

Aufbauend auf den Vorversuchen und der optimierten Grundkonfiguration des Tests wurden Testreihen mit neun verschiedenen Chemikalien durchgeführt. Dabei wurde die Expositionszeit des Testes von 96 h genau eingehalten. Die Reagenzglaskulturen sind ausschließlich im Brutschrank bei 23°C inkubiert worden. Die verwendeten Lösungen und Suspensionen wurden nach Bedarf neu angesetzt. Das betrifft die Nematoden, die Bakteriensuspension, die Verdünnungsreihen der Stammlösungen sowie gegebenenfalls Grundchemikalien wie Puffer, Nährsalzlösungen und Cholesterol.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 7 und 8) präsentieren die aufgenommenen Daten für die Reproduktionstests als relative Werte (% Reproduktion) in einzelnen Boxplots, wobei der Kontrollwert ohne Testsubstanz auf 100 % festgesetzt wurde. Getestet wurden die folgenden Substanzen: Die PAKs Fluoranthen und  $\beta$ -Naphthoflavon, als polychloriertes Biphenyl PCB52, als endokrin aktive Substanz  $\beta$ -Estradiol, die Medikamentenwirkstoffe Clofibrat und Lansoprazol, das Herbizid Atrazin, das Fungizid Tributylzinnchlorid und Endosulfan als Insektizid. Mit dieser breiten Auswahl sollte gezielt ein weites Spektrum von Substanzen aus ganz verschiedenen Stoffklassen und unterschiedlichen Wirkungsweisen auf ihre toxische Wirkung auf den Nematoden *C. elegans* getestet werden. Die abgeleiteten Effektkonzentrationen präsentiert Tabelle VII.



**Abb. 7:** Inhibition der Nematodenreproduktion in Abhängigkeit von der gewählten Chemikalienkonzentration im Flüssigmedium.  
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$

**Abb. 8:**

Inhibierung der Nematodenreproduktion in Abhängigkeit von der gewählten Chemikalienkonzentration im Flüssigedium

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,001$

**Tab. VII:** Effektkonzentrationen für die Reproduktion von *C. elegans* inkubiert mit neun verschiedenen Chemikalien.

Substanz	EC <sub>20</sub> [mg/l]	EC <sub>50</sub> [mg/l]
Fluoranthen	0,19	0,90
β-Naphthoflavon	0,56	18,94
PCB52	5,09	15,61
β-Estradiol	3,03	13,85
Clofibrat	53,58	103,67
Lansoprazol	9,34	22,68
Atrazin	25,59	86,64
Tributylzinnchlorid	0,09	0,22
Endosulfan	2,38	6,83

Nachfolgend wird für jede der neun eingesetzten Substanzen einzeln eine verbale Beschreibung der Ergebnisse gegeben.

*Fluoranthen:*

Das aus Steinkohlenteer gewonnene Fluoranthen erwies sich im Reproduktionstest als relativ stark wirksam. Die  $EC_{50}$  betrug 0,90 mg/l. Ab 5 mg/l war die Kurve bereits stark abgeflacht d.h. es fand keine nennenswerte Reproduktion mehr statt. Die Tiere waren dann stark im Wachstum behindert bzw. tot. Die  $EC_{20}$  wurde bei 0,19 mg/l ermittelt, beträgt also ungefähr ein Fünftel des  $EC_{50}$  Werts.

*$\beta$ -Naphthoflavon:*

Der PAK  $\beta$ -Naphthoflavon gilt als Inhibitor der Aromatenhydroxylase, die bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen soll. Es induziert ebenfalls Entgiftungsenzyme des Biotransformationssystems (Phase I und II). Der Reproduktionstest gestaltete sich insofern schwierig, als die Löslichkeit von  $\beta$ -Naphthoflavon über 50 mg/l nicht mehr vollständig gegeben war. Es zeigte sich jedoch schon bei einer weit niedrigeren Konzentrationen eine Wirkung und bei  $> 10$  mg/l traten keine signifikanten Veränderungen mehr ein. Während der  $EC_{50}$  Wert zu 18,94 mg/l berechnet wurde, liegt der  $EC_{20}$  Wert bei 0,56 mg/l.  $\beta$ -Naphthoflavon zählte im Test zu den weniger stark wirkenden Chemikalien.

*PCB52:*

PCBs, deren Verwendung in Deutschland mittlerweile verboten ist, sind vor allen auf Grund ihrer Langzeitwirkung in biologischen Systemen von Interesse. Zusätzlich werden auch neurophysiologische und hormonähnliche Wirkungen diskutiert. Da hinsichtlich der Chlorsubstitution am Biphenylmolekül verschiedene Möglichkeiten existieren, gibt es über zweihundert verschiedene PCB-Kongenere, von denen PCB52 eines ist. Toxikologisch werden PCB in ortho- und non-ortho-substituierte Kongenere unterteilt. Während letztere an den Dioxin-Rezeptor binden und die Subfamilie CYP1 induzieren (Dioxin-Typ),

induzieren erstere ähnlich dem Arzneimittel Phenobarbital auch CYP2B Isoenzyme (Phenobarbitaltyp). Im Reproduktionstest wirkte PCB52 ähnlich wie  $\beta$ -Naphthoflavon mittelstark inhibierend. Die Konzentrations-Wirkungskurve verlief gleichmäßig mit starker Abnahme der Reproduktion bis zur 20 mg/l Konzentration und anschließender Abflachung der Kurve. Der  $EC_{50}$  Wert beträgt 15,61 mg/l, der  $EC_{20}$  Wert berechnete sich zu 5,09 mg/l.

*$\beta$ -Estradiol:*

Auch die endokrine Substanz  $\beta$ -Estradiol zählte im Reproduktionstest zu den moderat wirkenden Substanzen. Das zu den Steroidhormonen zählende  $\beta$ -Estradiol ist in Form seiner Ester als Arzneimittel weit verbreitet (z.B. gegen Osteoporose und klimakterische Beschwerden). Eine synthetisch hergestellte verwandte Substanz, das Ethinylestradiol ist Bestandteil von Antikonzeptiva. Im Reproduktionstest zeigte sich eine Wirkung bis zu 50 mg/l. Danach war keine Verstärkung der Inhibierung trotz steigender Konzentration festzustellen, Löslichkeitsprobleme bestanden nicht. Der  $EC_{50}$  Wert lag bei 13,85 mg/l, der  $EC_{20}$  Wert bei 3,03 mg/l.

*Clofibrat:*

Das Pharmazeutikum Clofibrat war im Test die auf die Reproduktion von *C. elegans* am schwächsten wirkende Testsubstanz. Es wird als Cholesterinsenker zur Behandlung von Hypercholesterinämie, Arteriosklerose und Angina pectoris verwendet. Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt einen gleichmäßigen Verlauf. Erst über 300 mg/l tritt eine vollständige Hemmung der Reproduktion auf. Der  $EC_{50}$  Wert liegt bei 103,67 mg/l, der  $EC_{20}$  Wert beträgt 53,58 mg/l.

*Lansoprazol:*

Mit dem so genannten Protonenpumpenhemmer Lansoprazol wurde ein weiteres Arzneimittel untersucht. Lansoprazol wird gegen Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre und Refluxösophagitis eingesetzt. Im Test lag die

Reproduktionshemmung noch im mittleren Bereich. Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt ein relativ gleichmäßiges Bild, was umso erstaunlicher ist, als bei Lansoprazol schon ein bräunlicher Ausfall ab ca. 50 mg/l festzustellen war. Die Hemmung der Reproduktion setzte sich jedoch auch jenseits dieses Wertes fort. Die  $EC_{50}$  wird bei 22,68 mg/l erreicht, die  $EC_{20}$  zu 9,34 mg/l berechnet. Die Werte sind besonders in den Randbereichen der Verteilung insofern unsicher, als die Probitanalyse nur mit vier Werten durchgeführt werden konnte.

*Atrazin:*

Das Herbizid Atrazin zählt in den USA zu den am meisten angewandten Herbiziden. Es ist in Deutschland bereits verboten (jedoch nicht in allen Mitgliedsstaaten der EU). Atrazin und seine Metabolite, vor allen Desethylatrazin, verursachen auf Grund ihrer Persistenz weiterhin noch Rückstandsprobleme. Da es schlecht an Bodenpartikel absorbiert wird, findet man es sowohl im Grundwasser als auch im Oberflächenwasser, wo es den Wasserorganismen schadet.

Im *C. elegans* Reproduktionstest wirkte Atrazin schwach inhibierend. So war erst bei über 50 mg/l ein signifikanter Rückgang der Reproduktion festzustellen. Bei über 200 mg/l fiel Atrazin schließlich aus der Lösung aus. Die Standardabweichung für den höchsten Konzentrationswert ist ungewöhnlich stark, so dass keine genauen Aussagen zum absoluten Wert gemacht werden können. Der  $EC_{50}$  Wert wurde zu 86,64 mg/l ermittelt und der  $EC_{20}$  Wert zu 25,59 mg/l.

*Tributylzinnchlorid:*

Zu den am stärksten im Reproduktionstest inhibierenden Substanzen muss Tributylzinnchlorid gerechnet werden. Es gehört zu den zinnorganischen Verbindungen und wird als Desinfektions- und Konservierungsmittel eingesetzt (Holz-, Textilien-, Papierschutz). Es wurde insbesondere bekannt durch die Diskussion um Antifoulinganstriche und der diesbezüglichen Verwendung auf

Grund seiner mollusciziden und algiziden Eigenschaften. Im Test verlief die Kurve der Konzentrations-Wirkungsbeziehung sehr regelmäßig. Bei 1 mg/l waren die meisten Tiere bereits schon tot und es trat keine Reproduktion mehr auf. Der EC<sub>50</sub> Wert wurde für 0,22 mg/l und der EC<sub>20</sub> Wert mit 0,09 mg/l berechnet. Tributylzinnchlorid erwies sich damit als sehr stark toxisch.

#### *Endosulfan:*

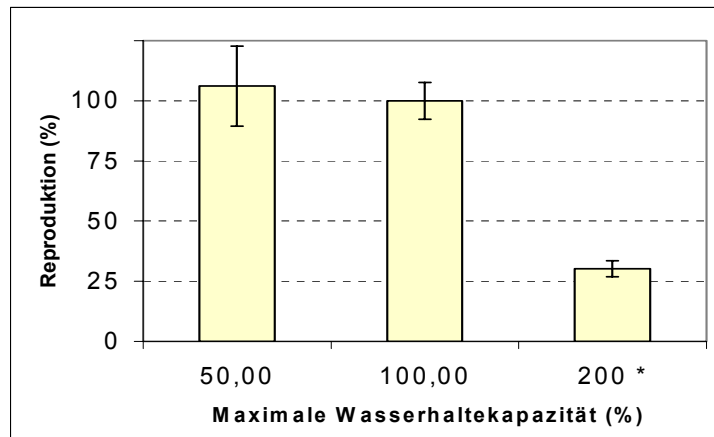
Ein weiteres insektizides Kontakt und Fraßgift ist Endosulfan. In Land- und Forstwirtschaft wird es als systemisches Insektizid gegen saugende und beißende Insekten eingesetzt. Im Reproduktionstest wies Endosulfan eine starke Toxizität auf. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung verlief gleichmäßig bis zur vollständigen Inhibierung der Reproduktion bei ungefähr 40-50 mg/l. Die EC<sub>50</sub> wurde mit 6,83 mg/l und die EC<sub>20</sub> mit 2,38 mg/l berechnet.

### 2.2.2. *Caenorhabditis elegans* Reproduktionstest im Boden

#### 2.2.2.1. Untersuchungen zur maximalen Wasserhaltekapazität

Um optimale Testbedingungen für *C. elegans* zu entwickeln, wurden verschiedene Wassergehalte im Standardboden LUFA 2.2 getestet. Die Reproduktionsrate (F1 Nachwuchs pro Individuum) betrug bei 50% maximaler Wasserhaltekapazität (max. WHK)  $46,0 \pm 14,4$  (Standardabweichung), bei 100% max. WHK  $43,4 \pm 6,6$  und in 200% max. WHK  $13,1 \pm 2,9$ . In der Abb. 9 wird die Reproduktion von *C. elegans* bei verschiedener Bodenfeuchte verglichen. Es ist deutlich zu erkennen, dass kaum ein Unterschied zwischen 50% und 100% der max. WHK besteht. Eine signifikant geringere Reproduktion konnte jedoch bei einer max. WHK von 200% festgestellt werden. Für die weiteren Versuche wurde mit einer maximalen Wasserhaltekapazität von **100%** gearbeitet.





**Abb. 9:** Reproduktion von *C. elegans* nach 96 h bei verschiedenen maximalen Wasserhaltekapazitäten des Bodens LUFA 2.2.

Die ausgezählten Nematoden für 100% max. WHK wurden zur Auswertung auf 100% festgesetzt. \* Signifikanz ( $p < 0,05$ ) bei  $n=6$ .

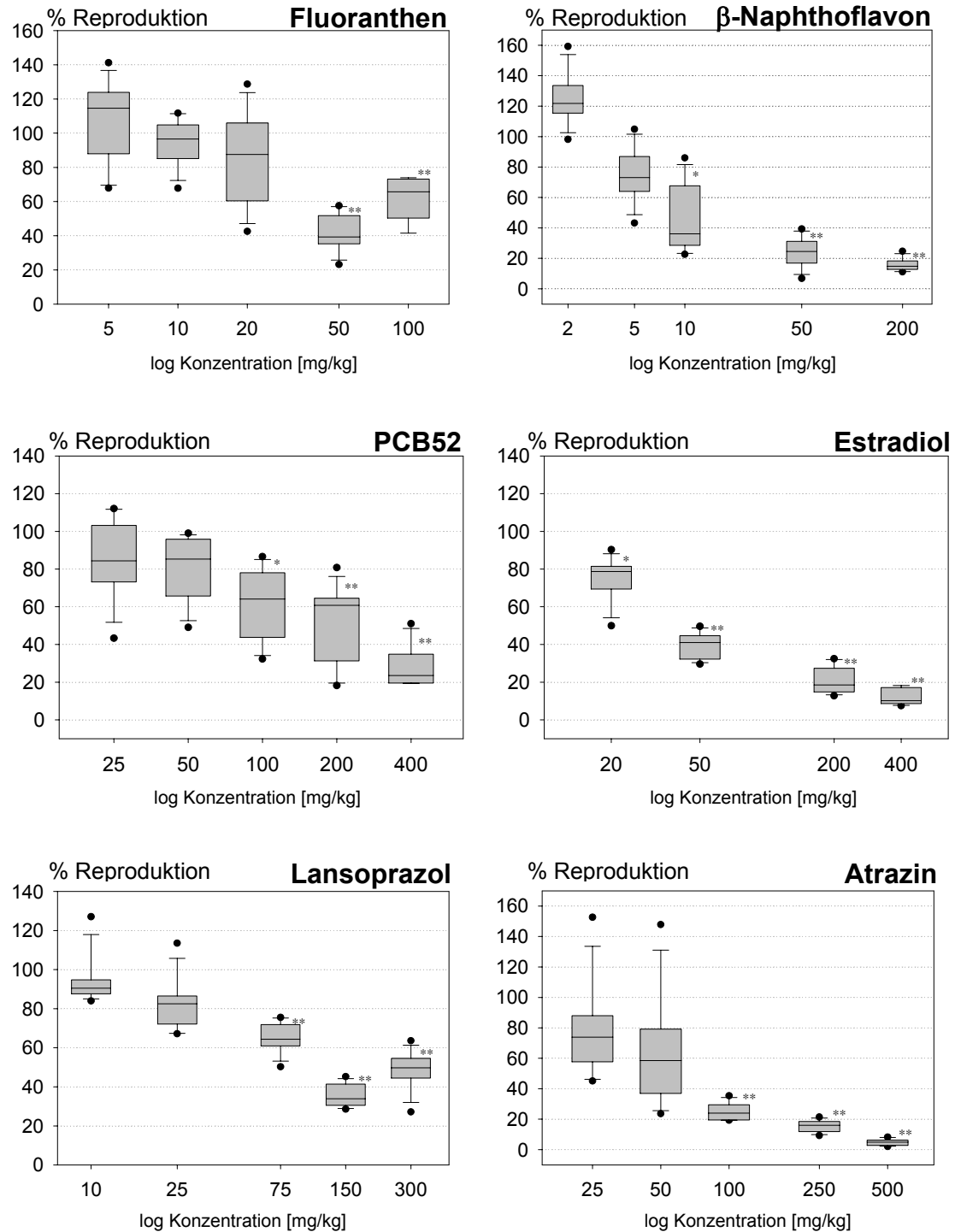
#### 2.2.2.2. Ergebnisse der Reproduktionstests im Boden für sechs Chemikalien

Die folgende Abbildung 10 präsentiert die aufgenommenen Daten für die Reproduktionstests im Boden als relative Werte (% Reproduktion) in einzelnen Boxplots, wobei der Kontrollwert ohne Testsubstanz auf jeweils 100 % festgesetzt wurde. Getestet wurden die folgenden Substanzen: Die PAKs Fluoranthen und  $\beta$ -Naphthoflavon, als polychloriertes Biphenyl PCB52, als endokrin aktive Substanz  $\beta$ -Estradiol, der Medikamentenwirkstoffe Lansoprazol und das Herbizid Atrazin. Die abgeleiteten Effektkonzentrationen zeigt Tabelle VIII.

Für alle Substanzen zeigte der am Institut entwickelte Test eine klare Konzentrations-Wirkung Abhängigkeit. Im Einzelnen ergaben sich für die eingesetzten Substanzen folgende Resultate:

##### *Fluoranthen:*

Bei dem Einsatz von 5 mg Fluoranthen pro kg Boden konnte eine leichte Erhöhung der Reproduktion von *C. elegans* bestimmt werden. Eine signifikant schädigende Wirkung konnte erst über 20 mg/kg festgestellt werden. Der  $EC_{50}$



**Abb. 10:** Inhibition der Nematodenreproduktion im Boden in Abhängigkeit von der gewählten Chemikalienkonzentration.  
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$

**Tab. VIII:** Effektkonzentrationen für die Reproduktion von *C. elegans* im Boden inkubiert mit sechs verschiedenen Chemikalien.

Substanz	EC <sub>20</sub> [mg/kg]	EC <sub>50</sub> [mg/kg]
Fluoranthen	21,57	43,39
$\beta$ -Naphthoflavon	1,94	13,55
PCB52	41,75	175,74
$\beta$ -Estradiol	11,02	47,70
Lansoprazol	31,36	158,57
Atrazin	24,84	66,84

Wert wurde mit 43,39 mg/kg bestimmt und lag damit im Vergleich zum Flüssigmedium fast um den Faktor 50 höher. Als mögliches Artefakt sind die Werte von 100 mg/kg zu betrachten, die deutlich über denen von 50 mg/kg liegen.

*$\beta$ -Naphthoflavon:*

Auch im Fall des zweiten PAK,  $\beta$ -Naphthoflavon, bewirkte die geringste eingesetzte Konzentration von 2 mg/kg eine leichte Erhöhung der Reproduktion von *C. elegans*. Eine weitere Steigerung auf 5 mg/kg resultierte jedoch bereits in einer signifikanten Beeinträchtigung der Nematodenvermehrung, ab der 10-fachen Konzentration stellen die Tiere ihre Reproduktion fast völlig ein. Die EC<sub>50</sub> lag bei 13,55 mg/kg. Damit erwies sich  $\beta$ -Naphthoflavon im Boden-Reproduktionstest dreimal toxischer als das Fluoranthen. Die Effektkonzentrationen im Flüssigmedium und im Boden lagen im gleichen Konzentrationsbereich.

*PCB52:*

Mit steigender Aufwandmenge an PCB52 erfolgte eine auffällig kontinuierliche Verminderung der *C. elegans* Reproduktion, die Abweichung der einzelnen Replikate ist jedoch relativ groß. PCB52 erwies sich im Bodentest im Vergleich

zum Flüssigmedium deutlich weniger wirksam, die  $EC_{50}$  wurde mit 175,74 mg/kg bestimmt und lag damit um rund den Faktor 11 höher als im Flüssigmedium.

*$\beta$ -Estradiol:*

Nach den PAKs  $\beta$ -Naphthoflavon und Fluoranthen erwies sich die hormonell wirksame Substanz  $\beta$ -Estradiol als effektivste Substanz im Bodenreproduktionstest. Während bei einer Konzentration von 20 mg/kg die Reproduktionshemmung von 20% noch moderat ausfiel, bewirkte eine Steigerung auf 50 mg/kg mehr als eine Halbierung des Reproduktionserfolges. Die  $EC_{50}$  lag bei 47,70 mg/kg Boden und damit im Reproduktionstest gut dreimal höher als im Flüssigmedium.

*Lansoprazol:*

Der Medikamentenwirkstoff Lansoprazol bewirkte eine klare Konzentrations-Effekt Abhängigkeit, wobei jedoch erst ab 75 mg/kg Boden eine signifikante Verminderung der *C. elegans* Reproduktion zu beobachten war. Mit einer  $EC_{50}$  von 158,57 mg/kg gehörte Lansoprazol zu den weniger toxischen Substanzen im Bodentest.

*Atrazin:*

Atrazin erwies sich im Bodenreproduktionstest vergleichsweise toxischer als im Flüssigmedium. Die starke Streuung der Werte für die beiden niedrigsten Atrazinkonzentrationen konnte durch eine zusätzliche Wiederholung nicht vermindert werden. Bei einer Konzentration von über 100 mg/kg Boden stellten die Tiere ihre Reproduktion fast völlig ein. Die  $EC_{50}$  beträgt 66,84 mg/kg und ist damit deutlich niedriger als die  $EC_{50}$  des Flüssigmediums (86,64 mg/l).

### 2.2.3. *Biomonitor-Tests auf DNA-Ebene*

#### 2.2.3.1. Gesamtgenomischer DNA Microarray von *C. elegans*

Durch die Experimente mit dem gesamtgenomischen DNA-Microarray von *C. elegans* konnten unter Verwendung der Testsubstanzen Atrazin,  $\beta$ -Naphthoflavon ( $\beta$ -NF), Clofibrat, Diethylstilbestrol (DES) und Fluoranthen von 17.815, auf dem Array befindlichen Genen, 203 eindeutig als durch die eingesetzten Substanzen induzierbar identifiziert werden. Dabei war der stärkste Induktor Fluoranthen mit 79 differentiell exprimierten Genen, gefolgt von Clofibrat mit 53 Genen, Atrazin mit 52 und  $\beta$ -NF mit 40 differentiell exprimierten Genen. Als schwächster Induktor in dieser Untersuchung erwies sich DES mit 8 induzierten Genen.

Für 26 der insgesamt 203 differentiell exprimierten Gene konnte eine Induktion durch mehr als eine der Testsubstanzen gezeigt werden, drei davon wurden durch drei unterschiedliche Chemikalien induziert. Wie erwartet gehörten viele der durch die verwendeten Testsubstanzen induzierten Gene zu Genfamilien, die bekannt dafür sind, dass sie in die Biotransformation von Schadstoffen involviert sind, wie z.B. die Cytochrom P450 Superfamilie (CYP). In dieser Untersuchung konnten 9 Gene, die zur CYP Genfamilie gehören, durch die eingesetzten Chemikalien induziert werden. Dabei zeigte sich, dass  $\beta$ -NF die stärkste Genexpression hervorrief, gefolgt von Atrazin (siehe Tabelle IX).

Das *vem-1* Gen (Cytochrom b5) wurde durch Clofibrat und  $\beta$ -NF induziert. Von der Glutathion-S-transferase Familie (GST) wurden vier Gene durch die 5 getesteten Substanzen exprimiert, wobei das Gen Y48E1B.10 sowohl durch Fluoranthen als auch durch  $\beta$ -NF induziert wurde. Für Mitglieder der UDP-Glucuronosyltransferase und Carboxyltransferase Familie zeigten sich jeweils drei Gene als induzierbar durch die verwendeten Chemikalien  $\beta$ -NF, Clofibrat und Atrazin, wobei das Carboxylesterase Gen F13H6.3 sowohl durch  $\beta$ -NF als auch durch Clofibrat und das UDPGT Gen AC3.7 durch  $\beta$ -NF, Clofibrat und

Atrazin induziert wurde. Für DES und Fluoranthen wurde keine Induktion in diesen beiden Genfamilien gefunden (Tabelle IX).

**Tab. IX:** Induktionsfaktoren der Cytochrome P450/ b5, GSTs, Carboxylesterasen und UDPGTs.

Gen	Atrazin	Clofibrat	DES	Fla	$\beta$ -NF	Name
<b>Cytochrome P450 /b5</b>						
C03G6.14	-	-	-	-	7.3 $\pm$ 3.8	35A1
C03G6.15	-	-	-	-	32.2 $\pm$ 23.5	35A2
C06B3.3	-	-	-	-	14.5 $\pm$ 9.6	35C1
F08F3.7	-	-	-	-	3.0 $\pm$ 0.4	14A5
F28G4.1	-	-	-	3.1 $\pm$ 0.6	-	37B1
K07C6.3	4.5 $\pm$ 0.8	-	-	-	-	35B2
K07C6.4	2.5 $\pm$ 0.2	-	-	-	-	35B1
K07C6.5	8.7 $\pm$ 3.1	-	-	-	-	35A5
T13C5.1	2.4 $\pm$ 0.2	-	-	-	-	22A
K07E3.8*	-	5.2 $\pm$ 1.0	-	-	3.9 $\pm$ 0.4	<i>vem-1</i>
<b>GSTs</b>						
F35E8.8	6.3 $\pm$ 3.4	-	-	-	-	
F56A4.1	-	3.2 $\pm$ 0.6	-	-	-	
K08F4.7	-	-	2.1 $\pm$ 0.3	-	-	<i>gst-4</i>
Y48E1B.10*	-	-	-	2.6 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.1	
<b>Carboxylesterasen</b>						
B0238.1	-	-	-	-	8.7 $\pm$ 5.3	
B0238.13	-	-	-	-	8.1 $\pm$ 3.4	
F13H6.3*	-	4.5 $\pm$ 0.8	-	-	6.0 $\pm$ 1.6	
<b>UDP-glucuronosyltransferasen</b>						
AC3.7*	2.6 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.6	-	-	3.0 $\pm$ 0.3	
C23G10.6	-	-	-	-	3.0 $\pm$ 0.4	
ZC443.6	2.7 $\pm$ 0.5	-	-	-	-	

Neben den bereits genannten vier Genfamilien wurden weitere 61 Gene induziert, die für Proteine unterschiedlicher Stoffwechselwegen kodieren, (Tabellen X). 36 dieser Gene konnten durch Fluoranthen, 12 durch Clofibrat, 11 durch Atrazin und  $\beta$ -NF und zwei durch DES induziert werden. Zwei der 61 Gene, C44H4.3 (*sym-1*) und K11G9.6 (*mtl-1*), waren sowohl durch Clofibrat als auch durch  $\beta$ -NF induzierbar.

**Tab. X:** Induktionsfaktoren von Genen mit unterschiedlicher Funktion.

Gen	Atrazin	Clofibrat	DES	Fla	$\beta$ -NF	Zugehörigkeit
C48C5.3	-	-	-	2.4 $\pm$ 0.2	-	ABC Transporter
T28F3.9	2.6 $\pm$ 0.1	-	-	-	-	Acetylglucosaminyltransferase
C50B6.7	-	-	-	15.3 $\pm$ 4.9	-	Amylase
ZK384.3	21.0 $\pm$ 9.2	-	-	-	-	Aspartylprotease
C07G2.2	-	-	-	5.3 $\pm$ 2.1	-	bZIP Transkriptionsfaktor
R05H10.6	3.9 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	Cadherin Proteinfamilie
T20B3.1	-	-	-	-	3.3 $\pm$ 1.1	Carnitat Acyltransferase
C25B8.3	-	3.2 $\pm$ 0.8	-	-	-	Cathepsin B-like Cystein Protease
T13F2.8	-	-	-	2.9 $\pm$ 0.5	-	Caveolin Proteinfamilie
F54A3_31.E	2.4 $\pm$ 0.3	-	-	-	-	Chaperonin Komplex Protein
C42D4.12	-	-	-	3.8 $\pm$ 1.0	-	Chemorezeptor
C08H9.7	-	-	-	2.3 $\pm$ 0.2	-	Chitinase
F15A4.8	-	-	-	2.7 $\pm$ 0.4	-	Chitinase
F36D3.9	-	-	2.8 $\pm$ 0.0	-	-	Cystein Protease
F41E6.6	-	-	-	-	3.2 $\pm$ 0.8	Cystein Protease
F54G8.2	-	-	-	2.7 $\pm$ 0.5	-	Diacylglycerol Kinase
W08D2.5	-	-	-	9.4 $\pm$ 5.9	-	E1-E2 (P-type) ATPase
F01G10.3	8.3 $\pm$ 5.5	-	-	-	-	Enoyl-CoA Hydratase
F15B9.1	-	5.5 $\pm$ 1.9	-	-	-	Retinol bindendes Protein
F32H2.5	-	-	-	9.9 $\pm$ 7.2	-	Fettsäuresynthase
C05C8.3	-	5.8 $\pm$ 2.8	-	-	-	FK506 bindendes Protein
F26A1.2	2.3 $\pm$ 0.2	-	-	-	-	FKH Transkriptionsfaktor
F52H3.7	-	-	-	5.8 $\pm$ 1.0	-	Galectin
F57F4.3	2.4 $\pm$ 0.3	-	-	-	-	GEI-4 Interagierendes Protein
Y66A7A.6	-	4.5 $\pm$ 1.5	-	-	-	Glycosyltransferase
Y9C9A_52.A	3.5 $\pm$ 0.9	-	-	-	-	G-Protein gekoppelter Rezeptor
VW02B12L.1	-	-	-	3.6 $\pm$ 0.9	-	H <sup>+</sup> -ATPase
M163.3	-	-	-	-	2.5 $\pm$ 0.2	Histon
F22F1.1	-	2.6 $\pm$ 0.5	-	-	-	Histon H1
K08B12.1	-	3.6 $\pm$ 0.9	-	-	-	Lipase
K11G9.6	-	3.8 $\pm$ 0.8	-	-	7.9 $\pm$ 4.6	Metallothionein <i>mtl-1</i>
C24A8.3	-	-	-	2.6 $\pm$ 0.4	-	Methyltransferase
C02E7.1	-	-	-	-	3.4 $\pm$ 0.6	Na/K-Transport ATPase
C15H9.1	-	-	-	3.2 $\pm$ 0.6	-	Nicotinamid Nucleotid Transhydrogenase
M02H5.G	-	-	-	2.4 $\pm$ 0.3	-	Nuklear Hormon Rezeptor
C09D1.1	-	-	-	3.1 $\pm$ 0.7	-	Nuklearer Hormon Rezeptor
F53C11.3	-	-	-	-	2.1 $\pm$ 0.0	Oxidoreductase
ZK270.1	-	-	-	5.9 $\pm$ 3.5	-	Patched Familie
F18A12.8	-	-	-	2.4 $\pm$ 0.2	-	Peptidase
F42G9.2	-	6.0 $\pm$ 1.8	-	-	-	Peptidylprolyl cis-trans Isomerase
H23N18.5	-	-	-	-	2.4 $\pm$ 0.1	Phospholipase
B0348.3	-	-	-	2.8 $\pm$ 0.4	-	Phospholipase C
F26H9.5	-	2.9 $\pm$ 0.3	-	-	-	Phosphoserin Aminotransferase
T05E11.6	-	-	-	3.0 $\pm$ 0.5	-	Protease
Y20C6A.1	-	-	-	4.6 $\pm$ 2.3	-	Protein
C24G7.5	-	-	-	2.9 $\pm$ 0.5	-	Proteinkinase
M176.6	3.0 $\pm$ 0.4	-	-	-	-	Proteinkinase
R155.3	-	-	-	3.5 $\pm$ 0.8	-	Protein-Tyrosine Phosphatase
T21C12.2	-	2.4 $\pm$ 0.3	-	-	-	Pyruvatdioxygenase

Gen	Atrazin	Clofibrat	DES	Fla	$\beta$ -NF	Zugehörigkeit
F26H9.6	-	2.3 $\pm$ 0.1	-	-	-	RAB Familie
C56E6.5	-	-	-	2.4 $\pm$ 0.2	-	Rhodopsin-like Rezeptor
W08D2.7	-	-	-	5.4 $\pm$ 0.9	-	RNA helicase
C39E9.2	-	-	2.1 $\pm$ 0.2	-	-	SCP-like extrazelluläres Protein
C04G6.1a	-	-	-	-	2.6 $\pm$ 0.3	Serin/ Threonin Proteinkinase
Y40D12A.2	-	-	-	-	2.3 $\pm$ 0.2	Serincarboxypeptidase
AH6.6	-	-	-	3.0 $\pm$ 0.3	-	Serpentin Rezeptor
D2062.10	5.4 $\pm$ 1.6	-	-	-	-	Serpentin Rezeptor
Y113G7B.2	2.5 $\pm$ 0.2	-	-	-	-	Serpentin Rezeptor
R05F9.12	-	-	-	12.3 $\pm$ 6.1	-	Sucrasedisomaltase
C44H4.3	-	3.2 $\pm$ 0.6	-	-	2.6 $\pm$ 0.5	SYM Genklasse
F17A2.1	-	-	-	3.2 $\pm$ 0.5	-	TRA-2 Genklasse
Y32F6B.1	-	-	-	3.1 $\pm$ 0.4	-	Transporter
Y39A3A.1	-	-	-	2.7 $\pm$ 0.8	-	Transposase
C01G6.8	-	-	-	3.9 $\pm$ 1.2	-	Tyrosine Rezeptorkinase
F11C3.3	-	-	-	3.9 $\pm$ 0.7	-	Uncoordinated Genklasse
F44C8.10	-	-	-	3.1 $\pm$ 0.7	-	Uncoordinated Genklasse
M106.3	-	-	-	-	2.1 $\pm$ 0.1	Zinc-binding dehydrogenase
F28F9.1	-	-	-	4.0 $\pm$ 1.3	-	Zinc-finger Familie
T22F3.11	-	-	-	7.1 $\pm$ 3.0	-	Zuckertransporter

Zusätzlich wurden 92 Gene, deren Funktionen noch unklar sind (<http://wormbase.org>), als induzierbar durch mindestens eine verwendete Testsubstanz aufgefunden. Von diesen 92 Genen wurden 35 durch Fluoranthen, 28 durch Atrazin, 19 durch Clofibrat und 15 durch  $\beta$ -NF induziert. Diese Zahlen schließen die Induktion von 6 Genen durch zwei unterschiedliche, sowie von zwei Genen durch drei verschiedenen Testsubstanzen mit ein (Tabelle XI). Eine tabellarische Aufstellung aller 92 Gene findet sich als Rohdaten in der Stanford Microarray Datenbank (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/login.pl>).

**Tab. XI:** Induktionsfaktoren für Gene unbekannter Funktion, die durch mehr als eine eingesetzte Testsubstanz induzierbar waren.

Gen	Atrazin	Clofibrat	DES	Fla	$\beta$ -NF
C29F7.2	-	4.5 $\pm$ 0.5	-	6.9 $\pm$ 4.1	5.1 $\pm$ 1.0
F45D3.3	-	2.9 $\pm$ 0.5	-	-	2.8 $\pm$ 0.4
F58H1.2	-	4.3 $\pm$ 1.1	-	-	3.5 $\pm$ 0.5
ZC434.3	-	3.0 $\pm$ 0.3	-	-	3.2 $\pm$ 0.6
T16G1.6	3.0 $\pm$ 0.3	-	-	4.7 $\pm$ 1.7	3.7 $\pm$ 0.8
VC5.1	-	4.7 $\pm$ 1.8	-	-	3.4 $\pm$ 0.7
F08G5.6	6.2 $\pm$ 3.1	-	-	35.8 $\pm$ 18.6	-
T06D8.1	3.6 $\pm$ 0.7	-	-	5.7 $\pm$ 0.6	-



Interessanterweise konnten auch 24 Gene der Kollagen Superfamilie, sowie 6 Gene der C-type Lectine durch die verwendeten Testsubstanzen induziert werden (Tabelle XII). Von den Kollagen Genen wurden 17 durch Clofibrat, drei durch Atrazin und weitere drei durch Fluoranthen und zwei Gene durch  $\beta$ -NF induziert. Von den sechs C-type Lectin Genen wurden zwei durch Atrazin und zwei weitere durch Fluoranthen sowie ein Gen durch Clofibrat exprimiert. Das C-type Lectin Gen Y19D10A.J wurde durch Atrazin und Fluoranthen induziert.

**Tab. XII:** Induktionsfaktoren von Kollagen und C-type Lectin Genen

Gen	Atrazin	Clofibrat	DES	Fla	$\beta$ -NF
<b>Kollagen</b>					
B0222.6	2.4 $\pm$ 0.5	-	-	-	-
B0222.8	2.5 $\pm$ 0.6	-	-	-	-
B0491.2	-	5.9 $\pm$ 1.5	-	-	-
C09G5.6	-	-	-	-	3.4 $\pm$ 0.5
C35B8.1	-	4.4 $\pm$ 0.8	-	-	-
C46A5.3	-	6.0 $\pm$ 3.5	-	-	-
C52D10.13	-	4.2 $\pm$ 1.1	-	-	-
F14F7.1	2.5 $\pm$ 0.2	-	-	-	-
F23H12.4	-	2.8 $\pm$ 0.2	-	2.7 $\pm$ 0.4	-
F27C1.8	-	4.2 $\pm$ 1.4	-	-	-
F30B5.1	-	5.2 $\pm$ 1.6	-	-	-
F46C8.6	-	5.1 $\pm$ 1.6	-	-	-
F53F1.5	-	-	-	2.5 $\pm$ 0.4	-
F54C9.4	-	3.2 $\pm$ 0.7	-	-	-
K09H9.3	-	2.5 $\pm$ 0.1	-	-	-
T01B7.7	-	6.3 $\pm$ 2.0	-	-	-
T14B4.6	-	4.0 $\pm$ 0.9	-	-	-
T21D12.2	-	3.5 $\pm$ 1.0	-	-	-
W03G11.1	-	-	-	3.2 $\pm$ 0.6	-
Y41E3.2	-	6.3 $\pm$ 2.2	-	-	-
ZK1010.7	-	6.3 $\pm$ 2.1	-	-	-
ZK1290.3	-	4.7 $\pm$ 1.6	-	-	2.9 $\pm$ 0.4
ZK836.1	-	4.1 $\pm$ 0.2	-	-	-
<b>C-type Lectin</b>					
B0218.8	-	3.9 $\pm$ 0.9	-	-	-
F08H9.6	2.5 $\pm$ 0.2	-	-	-	-
F15E11.9 = Y19D10A.9	15.4 $\pm$ 1.6	-	-	-	-
F17B5.2	-	-	-	5.8 $\pm$ 1.4	-
F56A4.J	-	-	-	42.3 $\pm$ 21.6	-
Y19D10A.J*	14.9 $\pm$ 2.0	-	-	39.8 $\pm$ 17.0	-

Für 153 Gene konnte eine Repression durch die applizierten Testsubstanzen festgestellt werden. Von diesen 153 Genen wurden lediglich zwei Gene durch mehr als eine Testsubstanz reprimiert, F32A5.5 und K08F4.7 (sowohl durch Atrazin als auch durch Fluoranthen). Die übrigen Gene wurden jeweils nur durch eines der eingesetzten Chemikalien reprimiert. Atrazin verursachte dabei eine Repression bei 140 Genen, gefolgt von Fluoranthen mit neun Genen, DES mit sieben,  $\beta$ -NF mit zwei und Clofibrat mit nur einem Gen.

Wie in Tabelle XIII zu sehen ist, gehören 43 der reprimierten Gene zu bereits klassifizierten Genfamilien. Dies sind die Vitellogenine im Fall von K09F5.2 (*vit-1*) und K07H8.6 (*vit-6*), die Hitzeschock Proteinfamilie (F43D9.4), die CYP P450 Familie (C36A4.1) und andere. Die weiteren 110 Gene deren Funktion bis dato noch unbekannt ist, konnten durch mindestens eines der eingesetzten Testsubstanzen reprimiert werden. Eine tabellarische Aufstellung dieser 110 Gene findet sich im Anhang, beziehungsweise als Rohdaten in der Stanford Microarray Datenbank (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/login.pl>). Interessanterweise fanden sich drei Gene (F26H9.5, kodiert für eine Aminotransferase, K08F4.7, eine GST und C39E.9.2, Mitglied der SCP-like extracellulären Proteinfamilie), die durch die verwendeten Chemikalien sowohl induziert als auch reprimiert wurden. F26H9.5 und C39E9.2 wurden induziert durch DES und reprimiert durch Atrazin, K08F4.7 wurde ebenfalls durch DES induziert, jedoch durch Fluoranthen und Atrazin reprimiert.

**Tab. XIII:** Repressionsfaktoren für Gene mit bekannter Funktion, die durch die eingesetzten Testsubstanzen reprimiert wurden

Gen	Atrazin	Clofibrat	DES	Fla	β-NF	Zugehörigkeit
ZK816.5	-	-	-	2.2 ± 0.1	-	Alkoholdehydrogenasen
C30G12.2	-	-	-	2.9 ± 0.3	-	Alkoholdehydrogenasen
F26H9.5	2.8 ± 0.3	-	-	-	-	Aminotransferasen
F28F8.2	3.1 ± 0.7	-	-	-	-	AMP-bindende Enzyme
F49E12.2	3.7 ± 0.8	-	-	-	-	Calpainproteasen
C49C3.11	2.3 ± 0.1	-	-	-	-	C-type Lectin
F08H9.5	2.8 ± 0.3	-	-	-	-	C-type Lectin
F38A1.5	3.1 ± 0.5	-	-	-	-	C-type Lectin
F49H6.2	-	-	-	-	3.2 ± 1.0	C-type Lectin
C36A4.1	2.6 ± 0.3	-	-	-	-	CYP P450
T24D8.5	3.4 ± 0.2	-	-	-	-	Neurotransmitter
F31A3.1	3.9 ± 0.6	-	-	-	-	
K08F4.7	3.1 ± 0.5	-	-	6.4 ± 1.3	-	Glutathione S-transferasen
F43D9.4	2.4 ± 0.2	-	-	-	-	Hitzeschock Hsp20
R09B5.6	-	-	-	3.1 ± 0.3	-	Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenasen
5C25B8.4	2.1 ± 0.0	-	-	-	-	Lectin
F32A5.5	4.9 ± 1.9	-	-	3.9 ± 1.0	-	Major Intrinsic Proteine
F44D12.7	2.7 ± 0.3	-	-	-	-	Major Sperm Protein Familie
T13F2.10	2.4 ± 0.2	-	-	-	-	Major Sperm Protein Familie
ZK1225.6	2.6 ± 0.1	-	-	-	-	Major Sperm Protein Familie
ZK1307.3	4.7 ± 1.6	-	-	-	-	Major Sperm Protein Familie
T11F9.6	2.8 ± 0.3	-	-	-	-	Metalloproteasen
F09E8.6	2.4 ± 0.2	-	-	-	-	Metalloproteasen
R05C11.3	-	-	3.3 ± 0.0	-	-	Nuklearer Transporter
T07G12.5	2.6 ± 0.6	-	-	-	-	Transporter Protein
Y38H8A.3	2.5 ± 0.2	-	-	-	-	Proteinkinasen
C04G2.2	2.2 ± 0.1	-	-	-	-	Proteinkinasen
T21E3.1	-	-	2.4 ± 0.2	-	-	Protein-Tyrosine Phosphatasen
K10H10.2	3.0 ± 0.2	-	-	-	-	
C39E9.2	4.3 ± 0.8	-	-	-	-	SCP-like extrazelluläre Proteine
F09E8.5	5.3 ± 1.9	-	-	-	-	SCP-like extrazelluläre Proteine
F49E11.10	3.1 ± 0.6	-	-	-	-	SCP-like extrazelluläre Proteine
T05A10.5	3.2 ± 0.3	-	-	-	-	SCP-like extrazelluläre Proteine
F28D1.3	6.6 ± 1.6	-	-	-	-	Thaumatococcus
F28D1.4	5.4 ± 2.0	-	-	-	-	Thaumatococcus
F28D1.5	6.3 ± 1.8	-	-	-	-	Thaumatococcus
T02G5.7	-	-	-	4.6 ± 2.0	-	Thiolasen
T06G6.11	5.6 ± 2.7	-	-	-	-	Thioredoxin
T05A10.3	3.9 ± 0.7	-	-	-	-	Transthyretin-like
K09F5.2	-	-	3.6 ± 0.6	-	-	Vitellogenine ( <i>vit-1</i> )
K07H8.6	4.5 ± 1.1	-	-	-	-	Vitellogenine ( <i>vit-6</i> )
Y43F8C.1	2.4 ± 0.2	-	-	-	-	Neurotransmitter
T11F9.8	5.1 ± 1.3	-	-	-	-	Zink Metalloprotease

## 2.2.3.2. Genauwahl für den Celegans Toxchip

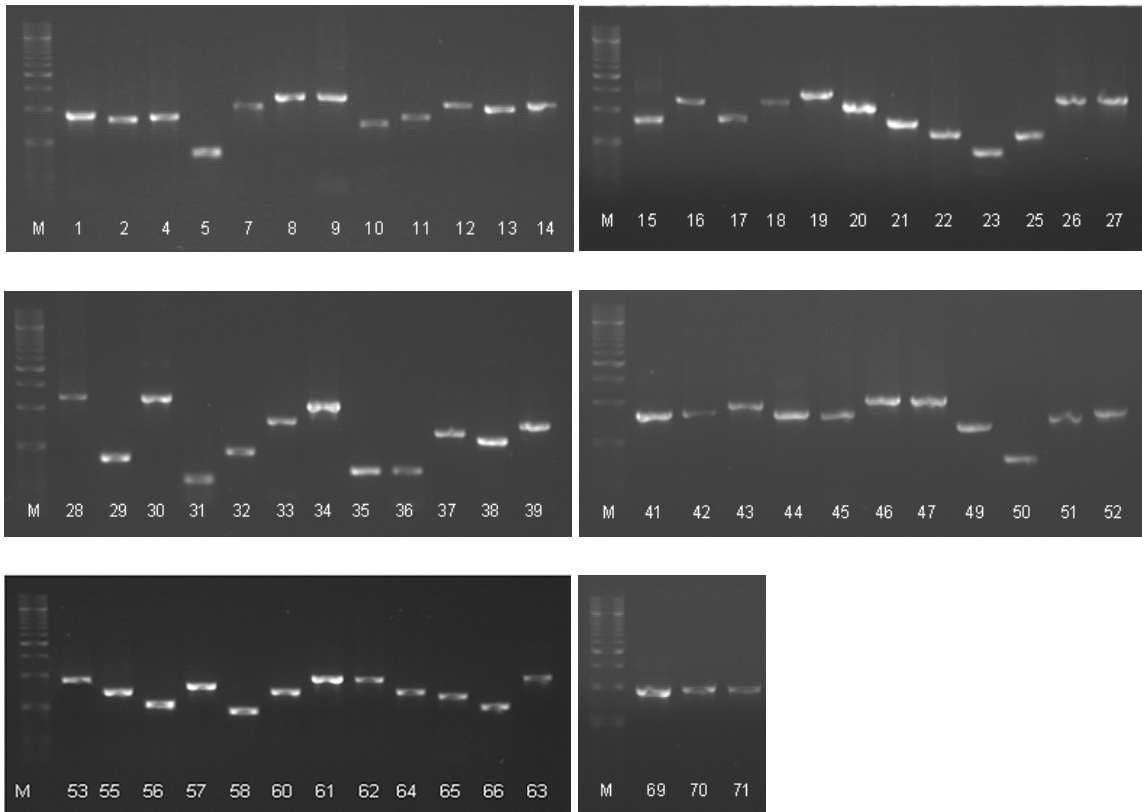
Die Ergebnisse der gesamtgenomischen Untersuchungen (2.2.2.2.), sowie ergänzende Angaben aus der Literatur führten wie in Tabelle XIV dargestellt ist, zu einer Auswahl von insgesamt 66 Genen, die durch die verwendeten Testsubstanzen als besonders gut induzierbar anzusehen sind und somit eine hohe Relevanz für den Einsatz auf dem Celegans Toxchip besitzen.

Tab. XIV: Genauwahl für den Celegans Toxchip

Nr.	Gen-ID	Name	Zugehörigkeit	Größe [bp]	induziert durch
1	54	F53C11.3	2,4-dienyl-CoA-Reduktase	749	Clofibrat/ $\beta$ -NF/ DES
2	46	C44B7.9	ABC Transporter	1158	Clofibrat/ $\beta$ -NF
3	64	T20B3.1	Acetyltransferase	701	Clofibrat/ Atrazin
4	33	T04C12.4	<i>act-3</i> - Housekeeping Gen	800	
5	20	F36A4.7	<i>ama-1</i> Housekeeping Gen	993	
6	47	C47E12.4	Anorgan. Pyrophosphatase	1074	Clofibrat/ $\beta$ -NF
7	63	T18H9.2	Aspartyl Protease <i>asp-2</i>	1125	Atrazin/ Clofibrat
8	37	Y38A10A.5	Calreticulin <i>crt-1</i>	644	Atrazin/ $\beta$ -NF
9	4	B0238.13	Carboxylesterase	839	$\beta$ -NF/ Clofibrat
10	19	F13H6.3	Carboxylesterase	1375	Clofibrat/ $\beta$ -NF
11	44	C17H12.4	Carboxylesterase	820	Clofibrat/ $\beta$ -NF
12	61	K10C2.1	Carboxypeptidase	1094	FA/ Atrazin
13	55	F54C9.4	Kollagen <i>col-38</i>	700	Atrazin/ Clofibrat/ $\beta$ -NF
14	39	B0218.8	C-typ Lectin	748	Clofibrat/ Atrazin/ FA/ DES
15	52	F41E6.6	Cystein Protease	961	Clofibrat/ $\beta$ -NF
16	29	K07E3.8	Cytochrom b5 <i>vem-1</i>	393	Clofibrat/ $\beta$ -NF
17	25	K01D12.11	Glutathion S-transferase	599	Atrazin
18	38	Y48E1B.10	Glutathion S-transferase <i>gst-20</i>	565	$\beta$ -NF/ Atrazin/ Clofibrat
19	21	F37B1.1	Glutathion S-transferase <i>gst-24</i>	932	Atrazin
20	32	R03D7.6	Glutathion S-transferase <i>gst-5</i>	454	$\beta$ -NF/ Atrazin
21	50	F26H9.6	GTP-bindendes Protein <i>rab-5</i>	378	Clofibrat/ $\beta$ -NF
22	49	F26D10.3	Hitzeschock <i>hsp-1</i>	694	Atrazin/ FA
23	35	T27E4.2	Hitzeschock <i>hsp-16.1</i>	301	Atrazin/ $\beta$ -NF
24	36	T27E4.3	Hitzeschock <i>hsp-16.48</i>	301	Hitzestress (Thakurta et al.)
25	43	C12C8.1	Hitzeschock Hsp-70	953	Atrazin
26	53	F44E5.4	Hitzeschock Hsp-70	928	Atrazin
27	69	F44E5.5	Hitzeschock Hsp-70	928	Hitzestress (Thakurta et al.)
28	71	VC5	Ladderprotein	905	$\beta$ -NF/ Clofibrat/ FA
29	14	C44H4.3	Leucine Rich Repeat <i>sym-1</i>	1148	Clofibrat/ $\beta$ -NF/ Atrazin
30	58	K08B12.1	Lipase	448	Clofibrat/ $\beta$ -NF
31	66	T21H3.1	Lipase	501	Atrazin/ DES

Nr.	Gen-ID	Name	Zugehörigkeit	Größe [bp]	induziert durch
32	31	K11G9.6	Metallthionin <i>mtl-1</i>	227	Clofibrat/ $\beta$ -NF
33	18	F08F3.7	P450 - 14A5	1159	$\beta$ -NF
34	34	T19B10.1	P450 - 29A1	1090	$\beta$ -NF
35	5	C01F6.3	P450 - 31A1	380	Clofibrat
36	24	H02I12.8	P450 - 31A2	899	Clofibrat
37	15	C49C8.4	P450 - 33E1	869	$\beta$ -NF
38	2	B02I3.15	P450 - 34A9	809	$\beta$ -NF
39	7	C03G6.14	P450 - 35A1	1164	$\beta$ -NF
40	8	C03G6.15	P450 - 35A2	1195	Clofibrat/ $\beta$ -NF/ FA
41	30	K09D9.2	P450 - 35A3	1193	$\beta$ -NF
42	16	C49G7.8	P450 - 35A4	1194	$\beta$ -NF
43	27	K07C6.4	P450 - 35B1	1352	Atrazin
44	26	K07C6.3	P450 - 35B2	1212	Atrazin
45	9	C06B3.3	P450 - 35C1	1203	$\beta$ -NF
46	51	F28G4.1	P450 - 37B1	810	Clofibrat/ $\beta$ -NF
47	28	K07C6.5	P450- 35A5	1198	Atrazin
48	62	T10B10.2	Peptidase	929	Atrazin/ FA
49	41	C02E7.1	P-type ATPase	816	Clofibrat/ $\beta$ -NF
50	42	C09H5.2	P-type ATPase	842	Clofibrat/ $\beta$ -NF
51	65	T21C12.2	Pyruvate Dioxygenase <i>hpd-1</i>	644	Clofibrat/ $\beta$ -NF
52	10	C08F11.8	UDP-Glucuronosyltransferase	730	Clofibrat/ Atrazin
53	11	C10H11.3	UDP-Glucuronosyltransferase	823	$\beta$ -NF/ Clofibrat
54	12	C23G10.6	UDP-Glucuronosyltransferase	1058	$\beta$ -NF
55	17	F01D4.2	UDP-Glucuronosyltransferase	825	$\beta$ -NF
56	1	AC3.7	UDP-Glucuronosyltransferase	899	$\beta$ -NF/ Atrazin/ Clofibrat
57	13	C29F7.2	unbekannt	891	Clofibrat/ $\beta$ -NF
58	22	F45D3.3	unbekannt	602	Clofibrat/ $\beta$ -NF
59	23	F58H1.2	unbekannt	398	Clofibrat/ $\beta$ -NF
60	70	T16G1.6	unbekannt	962	$\beta$ -NF/ Atrazin/ FA
61	60	K09F5.2	Vitellogenin <i>vit-1</i>	702	FA
62	45	C42D8.2	Vitellogenin <i>vit-2</i>	798	Östrogen (Custodia et al.)
63	56	F59D8.1	Vitellogenin <i>vit-3</i>	531	FA
64	56	F59D8.2	Vitellogenin <i>vit-4</i>	531	FA
65	56	C04F6.1	Vitellogenin <i>vit-5</i>	531	Östrogen (Custodia et al.)
66	57	K07H8.6	Vitellogenin <i>vit-6</i>	790	Östrogen (Custodia et al.)

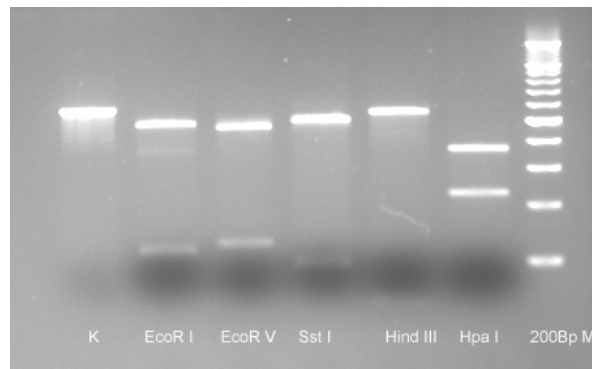
Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde die Qualität der gereinigten Fragmente im Hinblick auf Verunreinigungen aber auch korrekte Fragmentlänge überprüft. Die folgenden Gelbilder (Abbildung 11) zeigen alle gereinigten PCR-Fragmente, wobei zu erkennen ist, dass für jedes PCR-Produkt eine distinkte Bande existiert und es keinerlei Anzeichen für Verunreinigungen oder unerwünschte PCR-Nebenprodukte gibt. Die Banden wurden unter Verwendung einer 500 bp-Leiter als Marker auf ihre korrekte Größe hin überprüft.



**Abb. 11:** Gelfotos der eingesetzten Genfragmente

M = Marker, Bezeichnung der Gene entsprechend Gen-ID aus Tabelle XIV.

Zur Identitätsprüfung wurde neben der Größenbestimmung für jedes Genfragment eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Die Größe der durch die Restriktion erhaltenen Fragmente wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese ermittelt und die so erhaltenen Längen mit denen theoretisch berechneten verglichen. Abbildung 12 zeigt exemplarisch für das Gen K09D9.2 die Ergebnisse solch einer Restriktionsanalyse.



**Abb. 12:** Restriktionsanalyse des Gens K09D9.2

Eingesetzt wurden die Restriktionsenzyme *EcoR I* und *V*, *Sst I*, *Hind III* und *Hpa I*, K zeigt das ungeschnittene Fragment, M den Marker.

#### 2.2.3.3. Daten des Celegans Toxchip

Im Folgenden sind die mit Hilfe des Scanners aufgenommenen Fotos der Laserdetektion dargestellt (siehe folgende Abb.). Für jede Testsubstanz und jede Konzentration wurde repräsentativ ein Scannerfoto ausgewählt. Eine Aussage über Induktionen und Repressionen kann jedoch anhand der Scannerfotos nicht ohne weiteres gemacht werden, da alle Intensitätswerte gemittelt und mit den Werten des Housekeeping-Gens *act-3* (Gen-ID 33) verglichen werden müssen. Dieses kann nur mit Hilfe der Computerprogramme erfolgen. Die ausgewerteten und gemittelten Daten der einzelnen Chemikalien wurden zur besseren Übersicht nach induzierten und reprimierten Genen selektiert und zusammengefasst. Die mit einem Stern markierten Werte zeigen Daten, die durch die Ermittlung der Mittelwerte scheinbar induziert sind. Diese Induktion wurde jedoch lediglich durch extreme Einzelwerte hervorgerufen und kann nicht als Testsubstanz-induzierte Genexpression gewertet werden. Nicht aufgeführte Gene wurden durch die Chemikaliengabe nicht beeinflusst. Die Daten aller untersuchten Gene finden sich nach Testsubstanzen sortiert als Rohdaten im Anhang.

Abbildung 13 zeigt am Beispiel der Testsubstanz Endosulfan in der Konzentration von 0,06 mg/ l im Kulturmedium die Zuordnung der Gene zu den Spots der Scannerfotos. Die Bezeichnung der Gene und die Zuordnung zu den Gen-IDs lassen sich Tabelle XIV entnehmen.

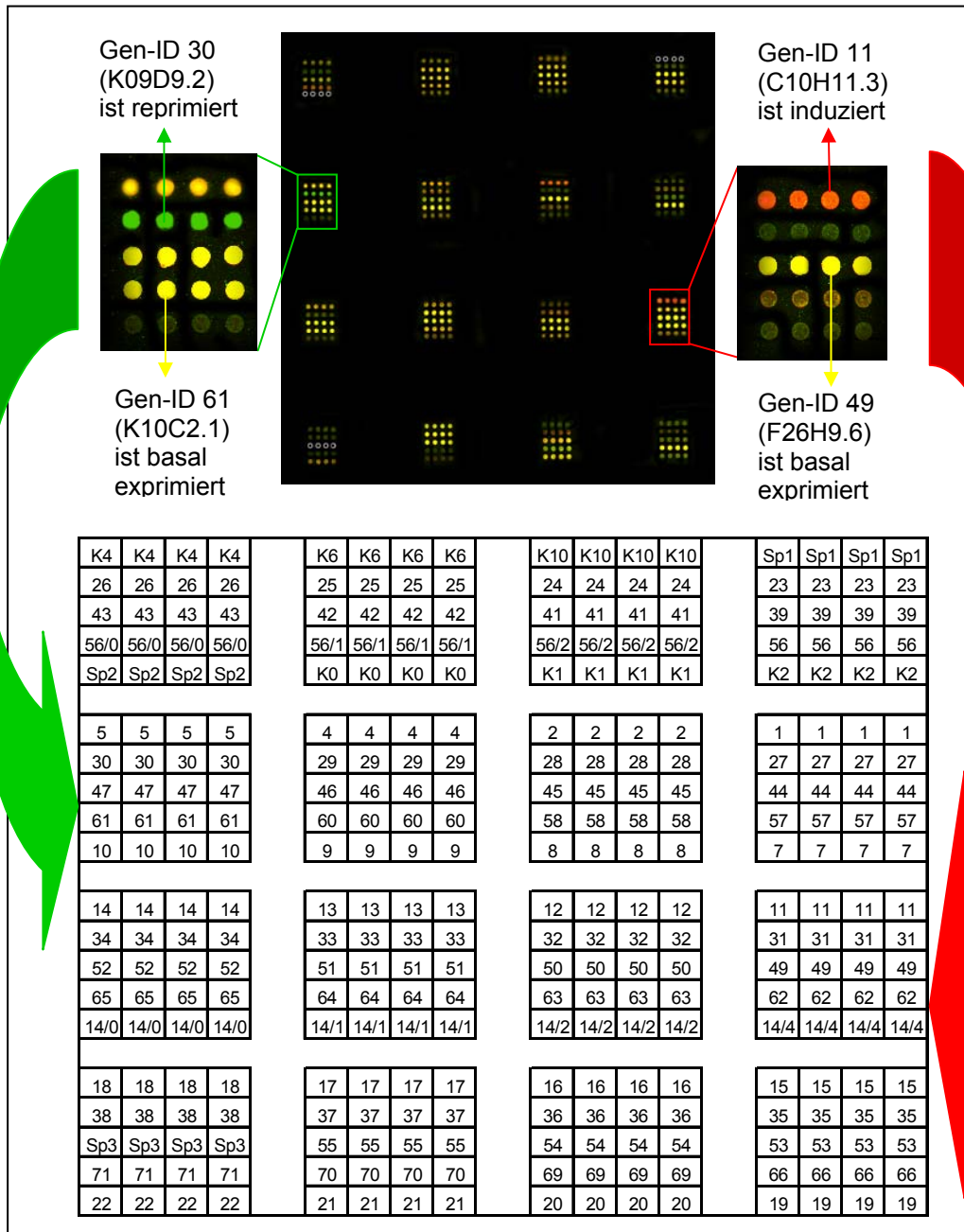
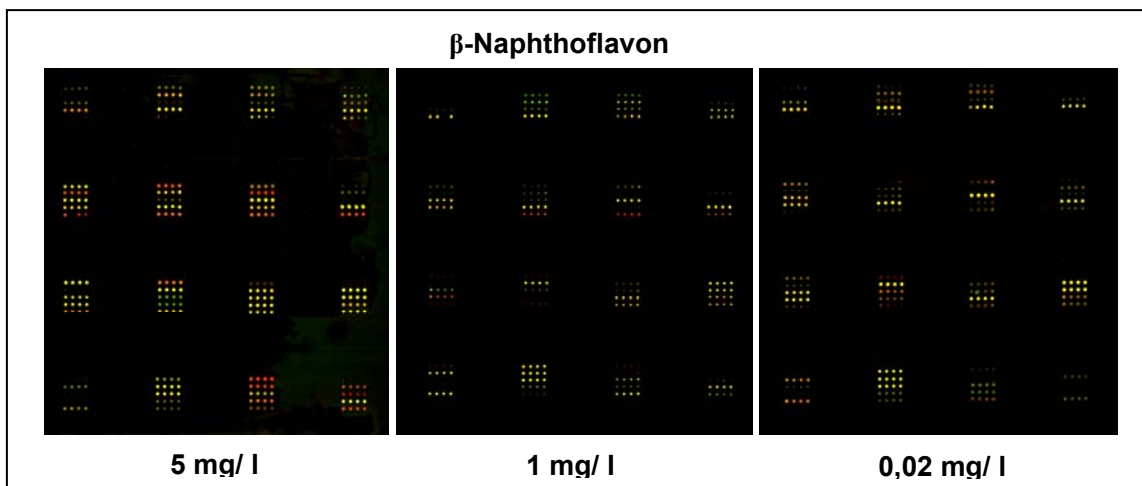


Abb. 13: Zuordnung der Gen-IDs zu den Spots der Scannerfotos



### 2.2.3.3.1. $\beta$ -Naphthoflavin

Die Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für  $\beta$ -Naphthoflavin konnten eine Induktion bei 18 Genen für die höchste verwendete Konzentration von 5 mg/l zeigen (Abb. 14 und Tab. XV). Fast alle der induzierten Gene gehören zu Genfamilien die bekannt dafür sind, dass sie im Biotransformationssystem bei der Umsetzung von Xenobiotika beteiligt sind. So finden sich unter anderem sieben CYP Gene, die für Enzyme der Phase I des Biotransformationssystems kodieren, davon gehören sechs der CYP P450 Superfamilie an. Für Phase II des Biotransformationssystem konnten zwei Gene kodierend für Carboxyl-esterasen, ein Gen kodierend für die Glutathion S-transferasen (GST) und zwei Gene kodierend für die UDP-Glucoronosyltransferasen exprimiert werden. Weiterhin wurden vier Gene induziert, die für Hitzeschock Proteine kodieren sowie ein Gen für die Metallothionine und ein Gen für die Vitellogenine. Von einem exprimierten Gen ist nicht bekannt, welche Funktion es im Stoffwechsel erfüllt.



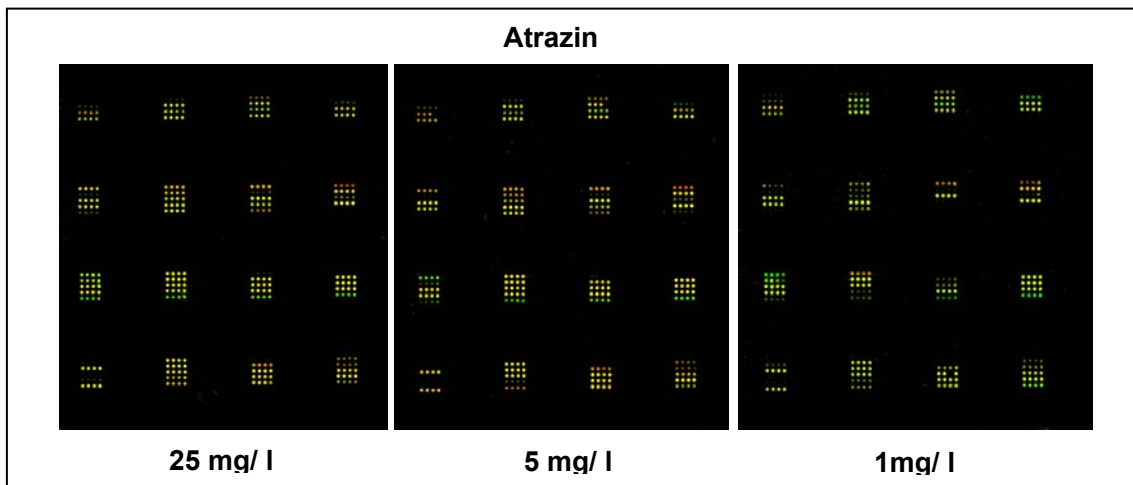
**Abb. 14:** Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für  $\beta$ -Naphthoflavin.

**Tab. XV:** Zusammenfassung der Induktionsfaktoren von  $\beta$ -Naphthoflavon induzierten Gene des Celegans Toxchip.

$\beta$ -Naphthoflavon				
Gen	Zugehörigkeit	5 mg/ l	1 mg/ l	0,2 mg/ l
B0238.13	Carboxylesterase	19,77 $\pm$ 3,24	0,51 $\pm$ 0,11	0,29 $\pm$ 0,06*
F13H6.3	Carboxylesterase	10,38 $\pm$ 1,41	0,53 $\pm$ 0,06	1,26 $\pm$ 0,41
K07E3.8	Cytochrom b5 <i>vem-1</i>	6,60 $\pm$ 1,03	0,51 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,06*
R03D7.6	GST <i>gst-5</i>	4,63 $\pm$ 0,61	0,55 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,07*
T27E4.2	Hitzeschock <i>hsp-16.11</i>	4,09 $\pm$ 0,43	0,52 $\pm$ 0,10	0,14 $\pm$ 0,03
T27E4.3	Hitzeschock <i>hsp-16.48</i>	4,98 $\pm$ 0,31	0,93 $\pm$ 0,11	0,89 $\pm$ 0,47
F44E5.5	Hitzeschock Hsp70	3,99 $\pm$ 0,30	0,45 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,02
K11G9.6	Metallothionin <i>mtl-1</i>	4,20 $\pm$ 0,96	0,64 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,13
C03G6.14	P450 35A1	42,81 $\pm$ 9,52	0,79 $\pm$ 0,18	2,06 $\pm$ 0,81
C03G6.15	P450 35A2	103,42 $\pm$ 26,45	1,78 $\pm$ 0,60	2,42 $\pm$ 0,88
K09D9.2	P450 35A3	111,08 $\pm$ 38,00	0,34 $\pm$ 0,07	2,48 $\pm$ 1,01
C49G7.8	P450 35A4	84,86 $\pm$ 30,16	2,44 $\pm$ 1,05	0,29 $\pm$ 0,11*
K07C6.3	P450 35B2	12,30 $\pm$ 2,73	0,69 $\pm$ 0,08	0,73 $\pm$ 0,38
C06B3.3	P450 35C1	129,25 $\pm$ 37,56	1,17 $\pm$ 0,27	5,01 $\pm$ 2,02*
C08F11.8	UDP-Glucuronosyltransferase	23,75 $\pm$ 4,43	0,50 $\pm$ 0,10	2,25 $\pm$ 0,91
C10H11.3	UDP-Glucuronosyltransferasen	4,86 $\pm$ 0,44	0,80 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,01*
C29F7.2	unbekannt	8,27 $\pm$ 1,40	0,88 $\pm$ 0,15	0,82 $\pm$ 0,14
F59D8.1	Vitellogenin <i>vit-3</i>	4,73 $\pm$ 0,69	1,49 $\pm$ 0,21	4,56 $\pm$ 0,89

#### 2.2.3.3.2. Atrazin

Durch das Herbizid Atrazin wurden insgesamt fünf Gene in den Hybridisierungsexperimenten mit dem Celegans Toxchip induziert. Vier dieser Gene wurden dabei reprimiert und ein Gen exprimiert (Abb. 15 und Tab. XVI). Zu den reprimierten Genen gehören die beiden P450 Gene K07C6.5 und K09D9.2, die in allen drei untersuchten Konzentrationen induziert waren, sowie das Gen C23G10.6, kodierend für die Glucuronosyltransferasen und das Gen F58H1.2, dessen Funktion im Stoffwechsel unbekannt ist. Diese beiden Gene konnten nicht durch die höchste verwendete Konzentration, jedoch durch die beiden niedrigeren induziert werden. Das Gen Y48E1B.10, kodierend für Glutathion S-transferasen wurde durch Atrazin in den beiden höchsten Konzentrationen exprimiert.



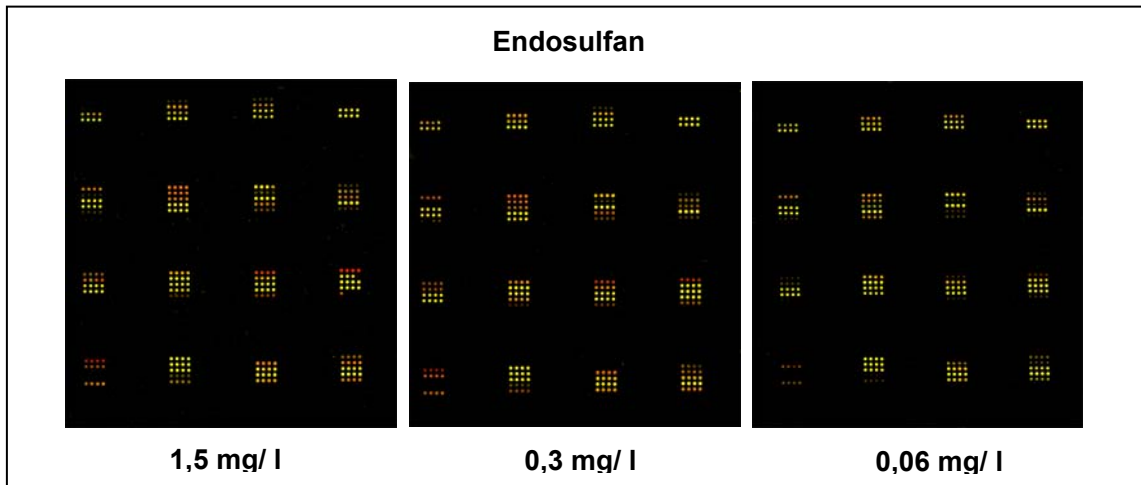
**Abb. 15:** Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für Atrazin.

**Tab. XVI:** Zusammenfassung der Induktionsfaktoren von Atrazin induzierten Gene des Celegans Toxchip

<b>Atrazin</b>				
<b>Gen</b>	<b>Zugehörigkeit</b>	<b>25 mg/ l</b>	<b>5 mg/ l</b>	<b>1 mg/ l</b>
C23G10.6	UDP-Glucuronosyltransferase	$0,45 \pm 0,07$	$0,20 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,07$
F58H1.2	unbekannt	$0,57 \pm 0,12$	$0,30 \pm 0,07$	$0,19 \pm 0,02$
K07C6.5	P450 35A5	$0,35 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,02$
K09D9.2	P450 35A3	$0,13 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,08$
Y48E1B.10	Glutathion S-transferase	$3,50 \pm 1,66$	$2,63 \pm 0,30$	$1,47 \pm 0,12$

#### 2.2.3.3.3. Endosulfan

Durch Endosulfan wurden fünf Gene exprimiert, die alle für Enzyme kodieren, die am Biotransformationssystem beteiligt sind (Abb. 16 und Tab. XVII). Dabei finden sich mit F08F3.7 und B0213.15 zwei P450 Gene und mit C23G10.6 und C10H11.3 zwei Gene, die für UDP-Glucuronosyltransferasen kodieren, sowie das Gen B0238.13, welches für eine Carboxylesterase kodiert. Jedes dieser Gene wurde durch die beiden höchsten verwendeten Chemikalienkonzentrationen induziert, das P450 Gen B0213.15 sogar bei allen drei eingesetzten Konzentrationen.



**Abb. 16:** Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für Endosulfan.

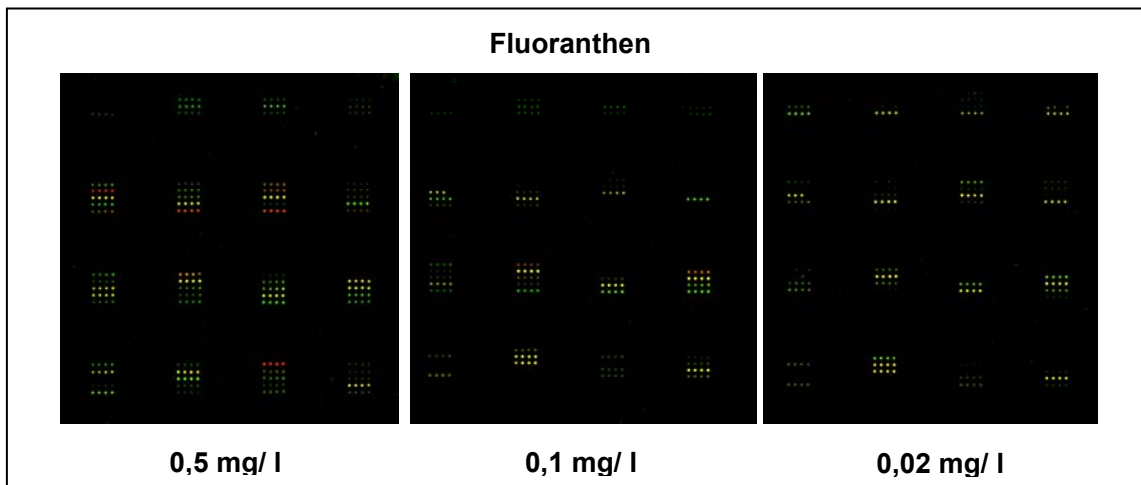
**Tab. XVII:** Zusammenfassung der durch Endosulfan induzierten Gene des Celegans Toxchip

Endosulfan				
Gen	Zugehörigkeit	1,5 mg/ l	0,3 mg/ l	0,06 mg/ l
B0238.13	Carboxylesterase	7,00 ± 1,59	5,37 ± 1,30	0,84 ± 0,02
F08F3.7	P450 14A5	12,84 ± 2,79	6,82 ± 0,69	1,53 ± 0,38
B0213.15	P450 34A9	7,54 ± 1,84	9,29 ± 1,67	3,51 ± 0,29
C23G10.6	UDP-Glucuronosyltransferase	2,43 ± 0,32	2,11 ± 0,25	0,80 ± 0,10
C10H11.3	UDP-Glucuronosyltransferase	17,49 ± 6,69	7,89 ± 2,06	2,17 ± 0,61

#### 2.2.3.3.4. Fluoranthen

Bei einer Fluoranthen-Konzentration von 0,5 mg/l wurden in den Celegans Toxchip Hybridisierungsexperimenten insgesamt 10 Gene in ihrer Expression beeinflusst, davon fünf induziert und fünf reprimiert (Abb. 17 und Tab. XVIII). Die Fluoranthen-Konzentrationen von 0,1 mg/l und 0,02 mg/l bewirkten bei zwei Genen eine Repression. Zu den induzierten Genen gehören das für Kollagen kodierende Gen F54C9.4, das Metallothionin K11G9.6, sowie die beiden P450

Gene C06B3.3 und F28G4.1 und das Gen C29F7.2. Zu den reprimierten Genen gehören das *sym-1* Gen, das P450 Gen K09D9.2, das Gen C23G10.6, welches für eine UDP-Glucuronosyltransferase kodiert, das Vitellogenin Gen *vit-3* und das Gen F58H1.2, dessen Funktion im Stoffwechsel noch unbekannt ist.



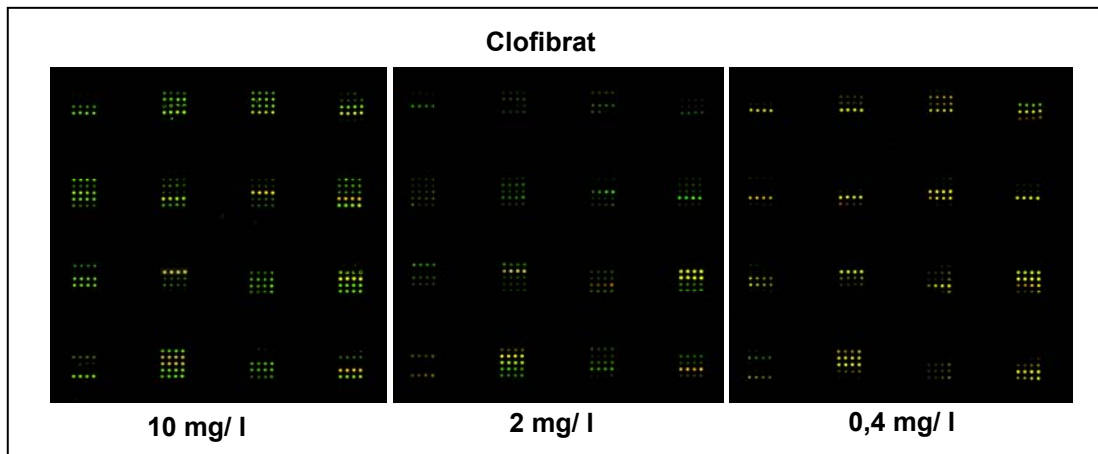
**Abb. 17:** Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem *Celegans* Toxchip für Fluoranthen.

**Tab. XVIII:** Zusammenfassung der Induktionsfaktoren von Fluoranthen induzierten Gene des *Celegans* Toxchip.

<b>Fluoranthen</b>				
<b>Gen</b>	<b>Zugehörigkeit</b>	<b>0,5 mg/ l</b>	<b>0,1 mg/ l</b>	<b>0,02 mg/ l</b>
F54C9.4	Kollagen <i>col-38</i>	2,45 ± 0,12	1,15 ± 0,07	1,12 ± 0,06
K11G9.6	Metallothionin <i>mtl-1</i>	3,58 ± 0,38	0,80 ± 0,10	0,86 ± 0,11
C06B3.3	P450 35C1	5,48 ± 0,71	0,85 ± 0,08	0,90 ± 0,09
F28G4.1	P450 37B1	2,39 ± 0,24	0,64 ± 0,05	0,74 ± 0,07
C29F7.2	unbekannt	5,00 ± 0,27	1,65 ± 0,11	0,97 ± 0,10
C44H4.3	Leucin Rich Repeat <i>sym-1</i>	0,18 ± 0,01	1,25 ± 0,30	0,59 ± 0,05
K09D9.2	P450 35A3	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,08 ± 0,00
C23G10.6	UDP-Glucuronosyltransferase	0,30 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,25 ± 0,01
F58H1.2	unbekannt	0,28 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,25 ± 0,09*
F59D8.1	Vitellogenin <i>vit-3</i>	0,22 ± 0,01	0,34 ± 0,06*	0,53 ± 0,06

## 2.2.3.3.5. Clofibrat

Durch die Clofibrat Konzentration von 10 mg/ l wurden in Celegans Toxchip Hybridisierungsexperimenten fünf Gene reprimiert (Abb. 18 und Tab. XIX). Für drei der Gene, nämlich die P450 Gene 35A3 und 35A5, sowie das Gen F58H1.2 zeigte sich eine Repression auch bei einer Clofibratkonzentration von 2 mg/ l und für 35A3 und 35A5 zusätzlich noch bei einer Konzentration von 0,4 mg/ l.



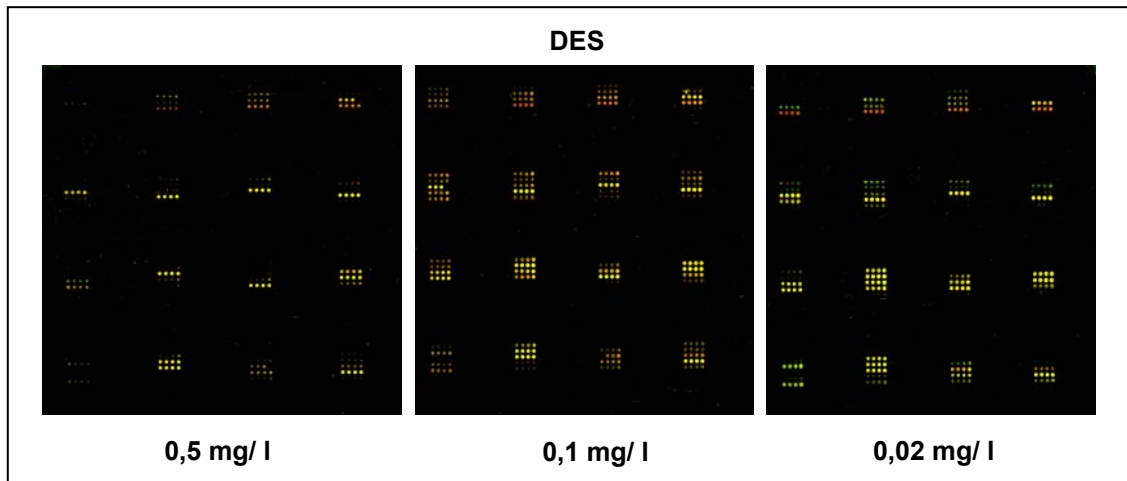
**Abb. 18:** Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für Clofibrat.

**Tab. XIX:** Zusammenfassung der durch Clofibrat induzierten Gene des Celegans Toxchip.

Gen	Zugehörigkeit	Clofibrat		
		10 mg/ l	2 mg/ l	0,4 mg/ l
C17H12.4	Carboxylesterase	0,202 ± 0,042	0,375 ± 0,039	1,02 ± 0,05
R03D7.6	GST <i>gst-5</i>	0,186 ± 0,035	0,63 ± 0,06	1,49 ± 0,26
C03G6.14	P450 35A1	0,297 ± 0,034	0,37 ± 0,07	0,59 ± 0,14
K09D9.2	P450 35A3	0,213 ± 0,021	0,240 ± 0,034	0,26 ± 0,02
K07C6.5	P450 35A5	0,150 ± 0,034	0,225 ± 0,025	0,215 ± 0,014
F58H1.2	unbekannt	0,230 ± 0,051	0,186 ± 0,030	0,71 ± 0,05

### 2.2.3.3.6. Diethylstilbestrol (DES)

In den Celegans Toxchip Hybridisierungsexperimenten konnte für das Gen C29F7.2, sowie für das Vitellogenin Gen *vit-6* eine deutliche Induktion durch alle eingesetzten DES Konzentrationen gezeigt werden (Abb. 19 und Tab. XX).



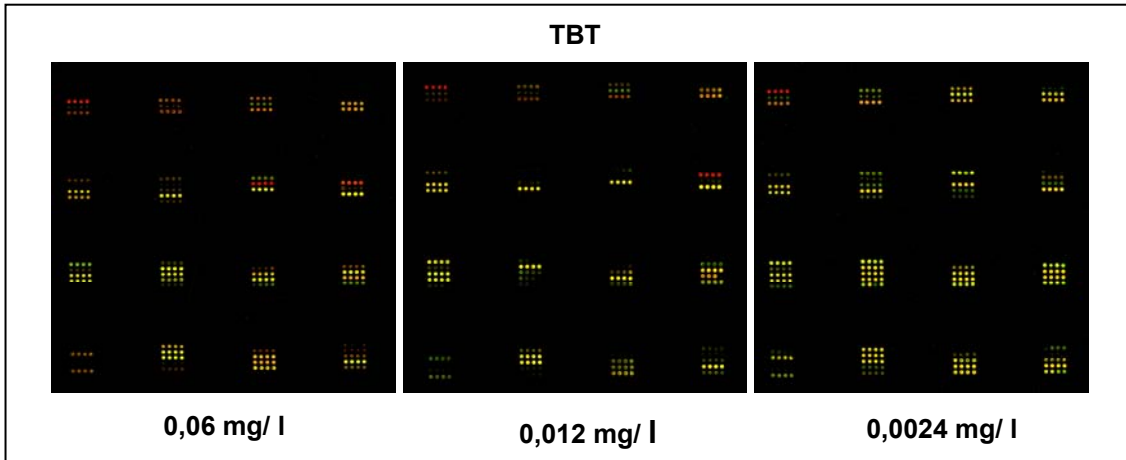
**Abb. 19:** Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für DES.

**Tab. XX:** Zusammenfassung der durch DES induzierten Gene des Celegans Toxchip.

		DES		
Gen	Zugehörigkeit	0,5 mg/ l	0,1 mg/ l	0,02 mg/ l
C29F7.2	unbekannt	3,81 ± 0,59	2,75 ± 0,22	4,25 ± 0,65
K07H8.6	Vitellogenin <i>vit-6</i>	2,92 ± 0,27	3,62 ± 0,69	5,89 ± 1,68

### 2.2.3.3.7. Tributylzinnchlorid (TBT)

Durch Tributylzinnchlorid konnten in den Celegans Toxchip Experimenten drei Gene induziert werden. Das P450 Gen 35B2 wurde dabei durch alle drei eingesetzten Konzentrationen induziert, das P450 Gen 35B1 durch die beiden höchsten, sowie das Vitellogenin Gen *vit-2* durch die höchste verwendete TBT Konzentration.



**Abb. 20:** Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für TBT.

**Tab. XXI:** Zusammenfassung der durch TBT induzierten Gene des Celegans Toxchip.

		TBT		
Gen	Zugehörigkeit	0,06 mg/ l	0,012 mg/ l	0,0024 mg/ l
K07C6.3	P450 35B2	12,93 ± 3,22	17,60 ± 4,51	24,57 ± 3,26
K07C6.4	P450 35B1	10,08 ± 2,88	2,63 ± 0,08	1,73 ± 0,18
C42D8.2	Vitellogenin <i>vit-2</i>	2,67 ± 0,23	1,19 ± 0,11	1,79 ± 0,15

#### 2.2.3.4. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens der eigenen AG

Nachdem im Verlauf des Vorhabens sichtbar wurde, dass die technischen Probleme bei der Entwicklung des „Celegans Toxchips“ und dessen reproduzierbarer Anwendung nicht zufrieden stellend bis zum Ende des Projektes gelöst werden können, wurde andere Techniken eingesetzt, um die höhere Sensitivität der Genexpression gegenüber der Reproduktion methodisch erfassen zu können. Hier sollen die Ergebnisse von zwei neuen Testsystemen vorgestellt werden, die Anwendung der Single worm RT-PCR und der Einsatz eines GFP produzierenden *C. elegans* Stammes als Biomonitor.

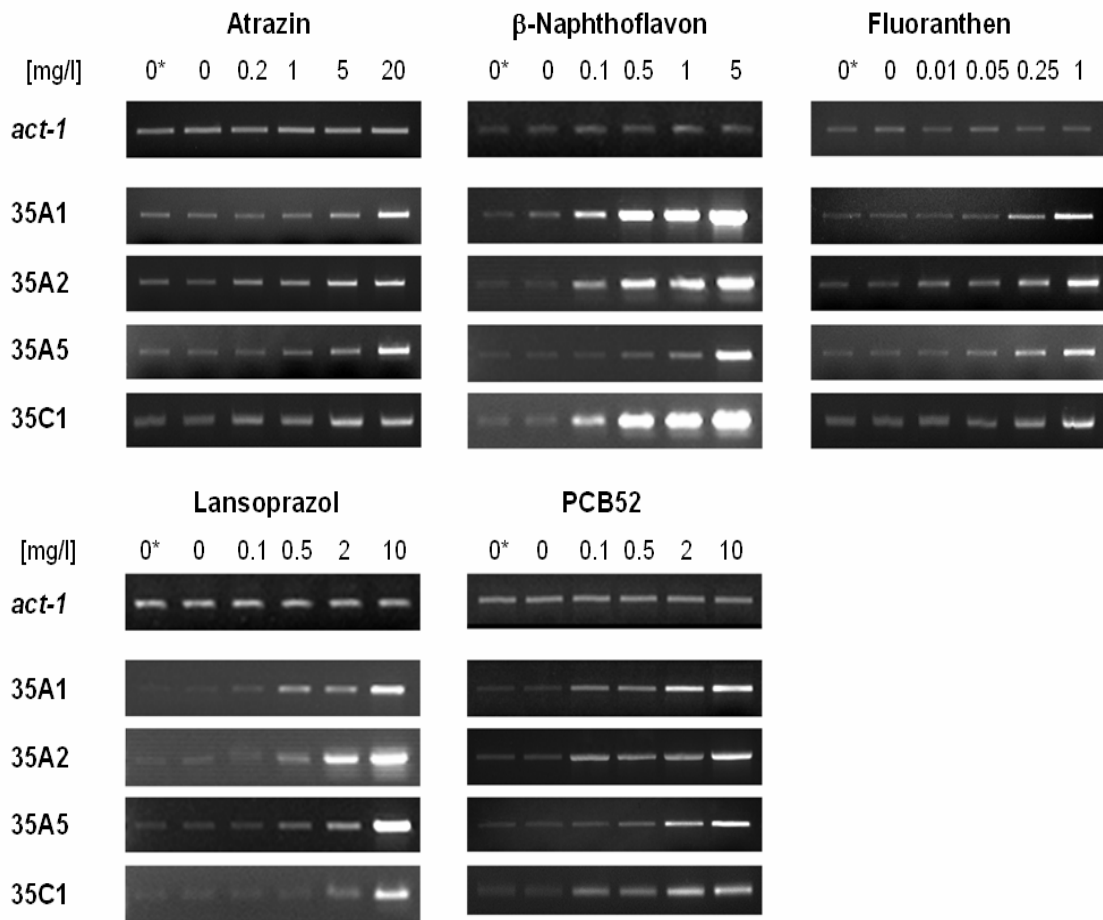


#### 2.2.3.4.1. Single worm RT-PCR zur Erfassung der Genexpression

Bei der Single worm RT-PCR kann der Genexpressionsstatus von einzelnen Nematoden bestimmt werden. Die hier aufgeführten Werte stammen von jeweils 20 Tieren, die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Die aus den Tieren isolierte RNA (mRNA) wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR amplifiziert. Als interner Standard diente *act-1* ( $\beta$ -Actin, ein so genanntes housekeeping Gen). Dessen Expressionslevel wurde anschließend für eine semiquantitative Auswertung der folgenden CYP35 RT-PCR genutzt. Getestet wurden der Expressionsstatus von CYP35A1, A2, A5 und C1, alle Gene die nachgewiesenermaßen ein hohes Induktionspotential durch PAKs, PCBs und weitere Substanzen besitzen. Als Testsubstanzen (in vier unterschiedlichen Konzentrationen) kamen zum Einsatz: Fluoranthen,  $\beta$ -Naphthoflavon, PCB52, Lansoprazol und Atrazin.

Abbildung 21 zeigt ein jeweils typisches Bild für die Auftragung der PCR-Ansätze auf ein DNA-Agarosegel. Die quantitative Auswertung ( $n=3$ ), aufgeschlüsselt für die vier Gene und die fünf verwendeten Substanzen, folgt in Abbildung 22. Dabei werden die Ergebnisse in einer relativen Auswertung gezeigt, die Werte für die Kontrolltiere wurden gleich 1 gesetzt.

Für alle fünf Substanzen konnte konzentrationsabhängig eine zunehmende Induktion der untersuchten CYP 35 Gene nachgewiesen werden. Als besonders starke Induktoren wirkten PCB52,  $\beta$ -Naphthoflavon und Fluoranthen, weniger stark Atrazin. PCB52 und konnte bereits bei einer Konzentration von 0,1 mg/l eine Verdopplung der Genexpression von 35A1, A2 und C1 induzieren. Im Fall von  $\beta$ -Naphthoflavon konnte bei einer Konzentration von 0,1 mg/l die 35C1 Expression die Verdopplungsschwelle übertreffen. Fluoranthen bewirkte eine Verdopplung der 35A1 und A5 Genexpression bei einer Konzentration von 0,25 mg/l, Lansoprazol bei 0,5 mg/l von 35A1 und A2. Bei einer Konzentration von 5,0 mg/l bewirkte auch Atrazin eine Verdopplung der 35C1 Geneexpression. Bei steigenden Aufwandsmengen reagierten in allen Experimenten die untersuchten CYP Gene auch mit einer steigenden Genexpression.

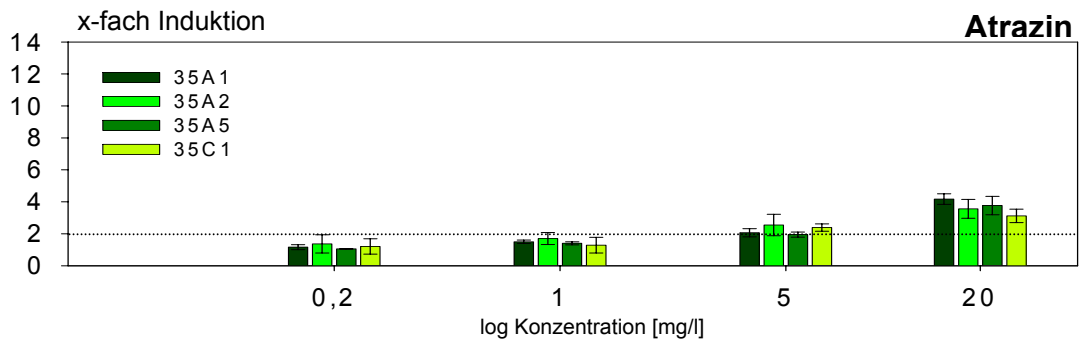
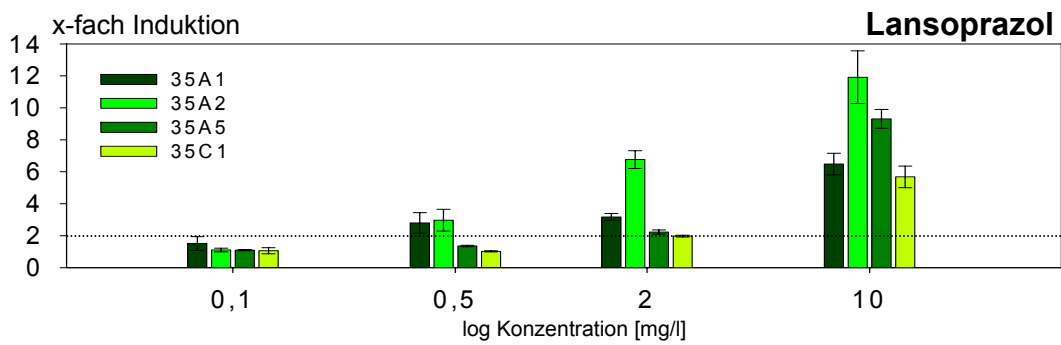
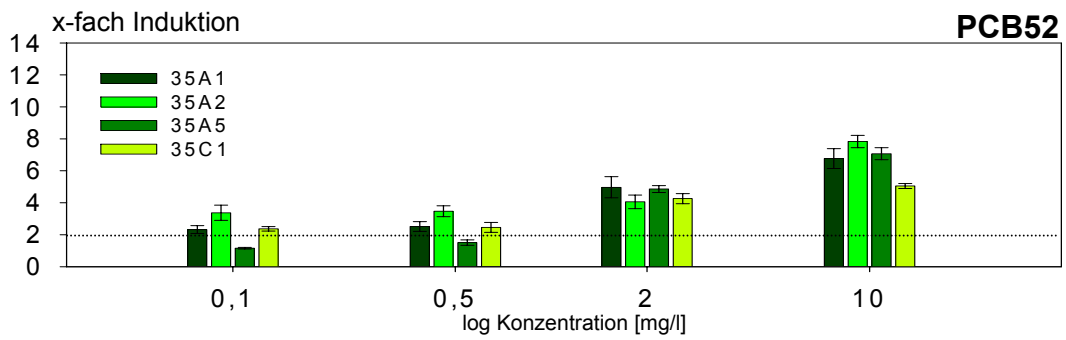
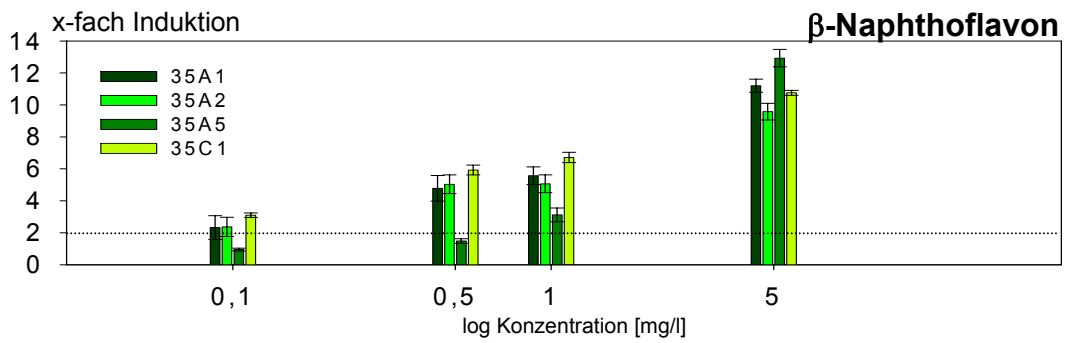
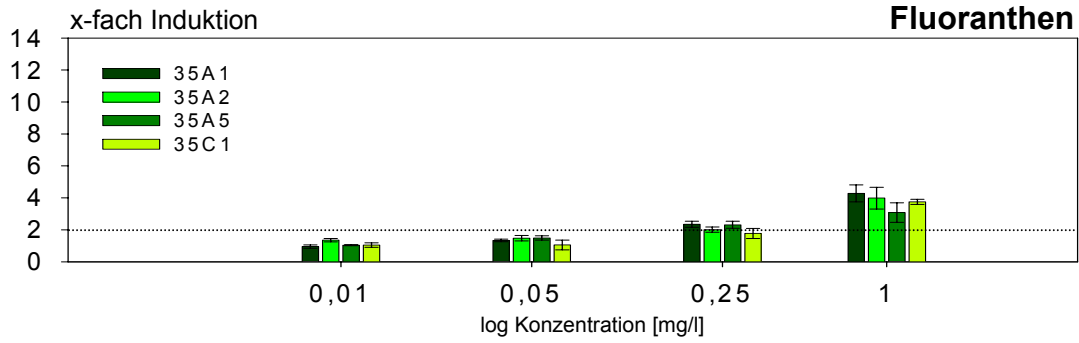


**Abb. 21:** Bestimmung der Expression von CYP35 Genen mittels semiquantitativer RT-PCR.

Als konstitutiv exprimiertes Kontrolle wurde *act-1* ( $\beta$ -Actin) gewählt. Die Bilder zeigen immer ein typisches Bild einer DNA-Gelelektrophorese.

0\* - Kontrolle ohne 0,3% DMSO im Ansatz.

0 - Kontrolle mit 0,3% DMSO im Ansatz.



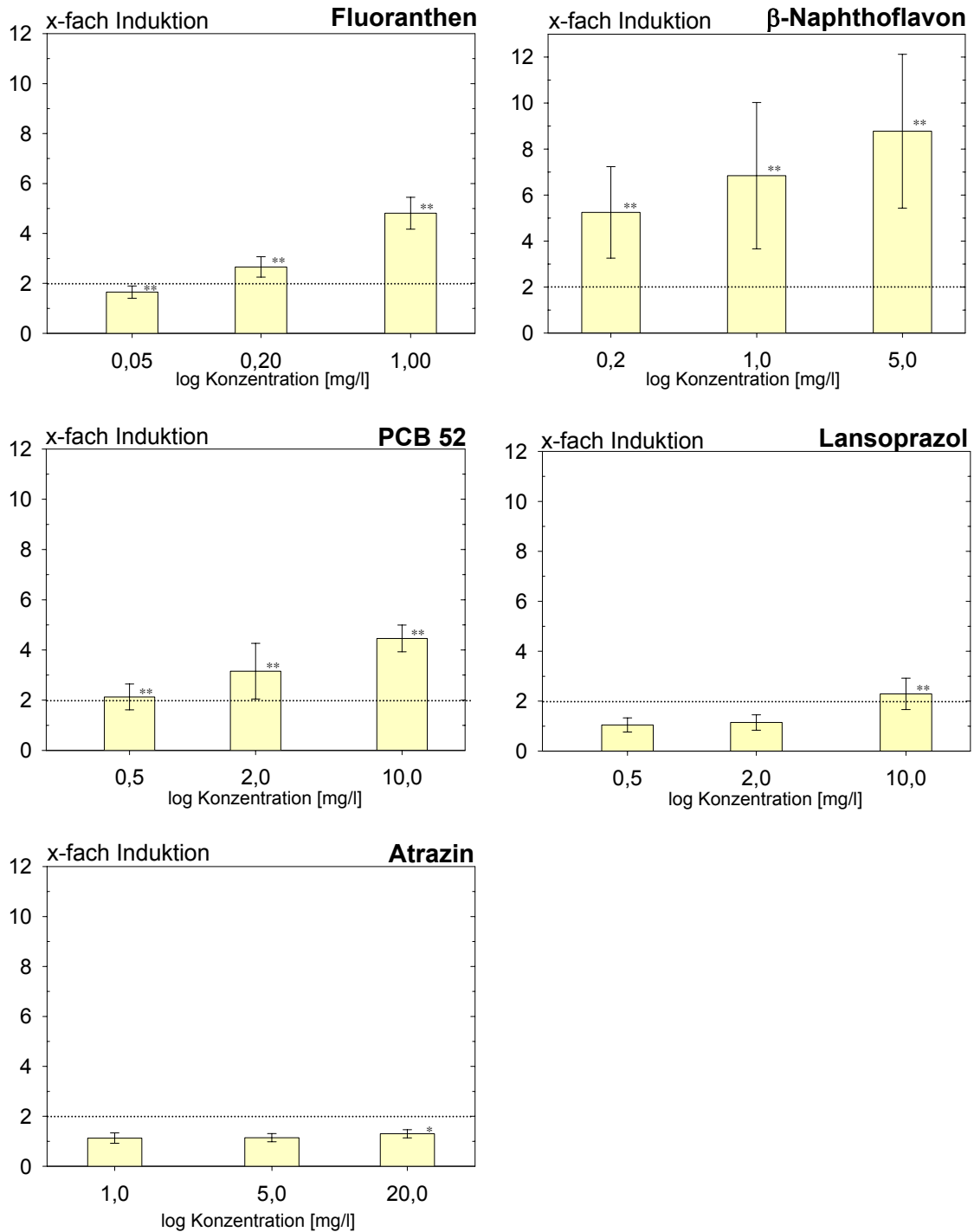
**Abb. 22:** Graphische Auswertung der semiquantitativer RT-PCR für die Gene CYP35A1, A2, A5 und C1 (n=3).

Für die hier dargestellte relative Auswertung wurde die jeweilige Kontrollprobe ohne Testsubstanz gleich 1,0 gesetzt. Die gepunktete Linie markiert eine Verdopplung der Genexpression, die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung. (Abb. auf der Seite zuvor).

#### 2.2.3.4.2. GFP produzierender *C. elegans* Stamm als Biomonitor

Als zweites neu entwickeltes Testsystem wurde ein transgener *C. elegans* Stamm hergestellt, dem das Gen für das „Grün Fluoreszierende Protein“ (GFP) unter Kontrolle des CYP35A3 Promotors eingesetzt wurde. CYP35A3 wurde für diese Zwecke ausgewählt, weil sich dieses Gen, wie auch 35A2, durch ein hohes Induktionspotenzial (PAKs, PCBs und weitere Substanzen) auszeichnet, jedoch andererseits über eine deutlich geringere Basalexpression verfügt. Folgende Testsubstanzen (in drei unterschiedlichen Konzentrationen) kamen zum Einsatz: Fluoranthen,  $\beta$ -Naphthoflavin, PCB52, Lansoprazol und Atrazin. Für den Test wurden jeweils 10 Tiere eingesetzt, die Experimente wurde jeweils zweimal durchgeführt (n=20). Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle (relative Auswertung), wobei die Werte für die Kontrolltiere gleich 1 gesetzt wurden. Die Chemikalien-induzierte GFP Produktion wird durch die einzelnen Balken repräsentiert.

Ähnlich wie bei den RT-PCR Tests erwies sich auch bei der Quantifizierung der GFP-Emission  $\beta$ -Naphthoflavin als der stärkste Induktor, gefolgt von Fluoranthen und PCB52. Eine Verdopplung der gemessenen GFP Lichtausbeute wurde nach  $\beta$ -Naphthoflavin und Fluoranthen Exposition bei 0,2 mg/l und bei PCB52 bei > 0,5 mg/l erreicht. Lansoprazol musste dagegen mit der vergleichsweise hohen Konzentration von 10 mg/l eingesetzt werden, um eine Verdopplung der GFP Produktion (bezogen auf den Mittelwert) zu erreichen. Atrazin bewirkte nur bei der höchsten Konzentration von 20 mg/l eine signifikante, 1,3-fache Induktion des GFP Reporterkonstruktes.



**Abb. 23** Induktion der GFP Produktion in Abhängigkeit der gewählten Testsubstanz-Konzentration im Medium im Vergleich zur Kontrolle.

Die Kontrollprobe ohne Testsubstanz wurde jeweils gleich 1,0 gesetzt. Die gepunktete Linie markiert die Verdopplung der gemessenen GFP Leuchtintensität. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung bei n=20. \* p<0,05, \*\*p<0,001

## 2.3. Diskussion

### 2.3.1. *Caenorhabditis elegans* Reproduktionstest

Ziel für die Entwicklung und Durchführung der Reproduktionstests im Projekt war die Schaffung eines Vergleichssystems für die Untersuchungen auf der Genexpressionsebene. Dabei wurden die Untersuchungen sowohl in Flüssigmedium (mit neun Substanzen) als auch im Boden (mit sechs Substanzen) durchgeführt. In beiden Fällen ließ sich für alle untersuchten Substanzen eine eindeutige Konzentrations-Wirkungsbeziehung nachweisen. Dabei wurde mit steigender Chemikalienkonzentration (mit Ausnahme von  $\beta$ -Naphthoflavon und Atrazin im Flüssigsystem und Fluoranthen und Lansoprazol im Boden) eine fast vollständige Inhibition der Reproduktion der Tiere erreicht.

Im Flüssigsystem erwiesen sich Tributylzinn, das PAK Fluoranthen und Endosulfan als die stärkeren Inhibitoren der Reproduktion, während  $\beta$ -Estradiol,  $\beta$ -Naphthoflavon und PCB52 im mittleren Bereich anzusiedeln sind. Bei den Pharmazeutika hemmte Lansoprazol die Reproduktion stärker, während Clofibrat nur eine sehr schwache Wirkung aufwies und hier erst ab ca. 300 mg/l die Reproduktion eingestellt wurde. Auch das Herbizid Atrazin erwies sich als eine relativ schwach wirkende Chemikalie.

Im Boden erwiesen sich vier der sechs eingesetzten Substanzen weniger wirksam als im Flüssigttest. Dies war insofern zu erwarten, da Bodenbestandteile (wie z.B. Huminstoffe) durch ihre heterogene Zusammensetzung eine Vielzahl von unterschiedlichen Substanzen binden können und somit ihre Bioverfügbarkeit zum Teil massiv herabsetzen können. Überraschend waren die Ergebnisse für das Herbizid Atrazin, welches im Boden um den Faktor 1,3 wirksamer war als im Flüssigmedium (bezogen auf die  $EC_{50}$ ). Das PAK  $\beta$ -Naphthoflavon war in beiden Testsysteme annähernd gleich toxisch. Anders als das zweite PAK im Test, Fluoranthen, welches im Flüssigsystem fast 50x toxischer wirkte als im Boden. Hier sollte im Bodensystem eine andere

Zugabemöglichkeit von Fluoranthren geprüft werden um eine bessere Bioverfügbarkeit für die Nematoden zu erreichen.

Die meisten der bisher veröffentlichten ökotoxikologischen Reproduktions- bzw. Mortalitätstests mit *C. elegans* behandelten den Einfluss von Schwermetallen, wohingegen die Wirkung organischer Schadstoffe noch relativ wenig untersucht wurde. Diese Lücke sollte das hier vorgestellte Projekt füllen. Eine Reihe von organischen Substanzen wurde bereits hinsichtlich der Wirkung auf die Reproduktion von *C. elegans* getestet. Dies erfolgte teils im Dienst der Grundlagenforschung, teils im Hinblick auf pharmazeutische Untersuchungen sowie auch in ökotoxikologischer Hinsicht. Auf diesen Untersuchungen basiert u.a. die Nutzung des Nematoden *C. elegans* als ökotoxikologischer Testorganismus im Projekt.

So wurde Fluoressigsäure als Inhibitor der Aconitase im Citrat- und Glyoxylatzyklus im Reproduktionstest mit *C. elegans* untersucht (Middendorf und Dusenbery, 1993). Hier wurde eine Inhibition der Reproduktion um 50% schon bei 0,025 mM Fluoressigsäure festgestellt. Untersuchungen zur Hemmung der Steroidsynthese mittels unterschiedlicher Pharmazeutika (z.B. Aminoglutethimid zum Einsatz gegen Brustkrebs) zeigen die Bedeutung von *C. elegans* hinsichtlich der Medikamentenentwicklung (Wang und Yamamoto, 2001). Während das Antiöstrogen Aminoglutethimid keine Auswirkungen auf die Reproduktion zeigte, führte das ebenfalls in die Steroidbiosynthese eingreifende Ketoconazol (Anti-Prostatakrebsmittel und Antimykotikum) zu signifikanten Reproduktionseinbussen. Das gegen Leukämie eingesetzte Aminopterin (Antagonist zur Folsäure bei der Bildung von Leukocyten) war Gegenstand einer Untersuchung der Reproduktion bei *C. briggsae* (Vanfleteren und Avau, 1977).

Hinsichtlich des Einflusses von Umweltschadstoffen wurden Untersuchungen mit Fungiziden durchgeführt. Dazu gehören Mancozeb und Maneb als Dithiocarbamate (Güven et al., 1999). Weiterhin untersucht hinsichtlich des Einflusses auf die Mortalität von *C. elegans* wurden: PCP (Pentachlorphenol;

Konservierungs-Desinfektionsmittel) und SDS (Natriumdodecylsulfat; Waschmittelgrundstoff), (Cressman und Williams, 1997). Zwei organophosphatische Pestizide, Malathion und Vapona, wurden bezüglich ihrer Neurotoxizität am Bewegungsverhalten von *C. elegans* untersucht (Williams und Dusenbery, 1990).

Für die im Test verwendeten Substanzen lagen in der Literatur für *C. elegans* noch keine Vergleichswerte vor, Tabelle XXII zeigt jedoch Angaben für andere wirbellose Tiere. Dabei fällt auf, dass auch für diese Invertebraten sich dieselbe Toxizität-Reihe wie für den Nematode *C. elegans* ergibt: Tributylzinn > Fluoranthen > Endosulfan > Atrazin.

**Tab. XXII:** Vergleichende Effektkonzentrationen für weitere Invertebraten.

Substanz	Art	Tox. Endpunkt	Konzentration [mg/l]	Quelle
Atrazin	<i>Lumbriculus variegatus</i>	LC50	37,10	a
	<i>Daphnia pulex</i>	EC50	5,00	b
	<i>Daphnia magna</i>	LC50	21,50	a
Endosulfan	<i>Daphnia pulex</i>	LC50	1,905	a
	<i>Daphnia magna</i>	LC50	0,255	a
Fluoranthen	<i>Lumbriculus variegatus</i>	LC50	> 0,178	c
	<i>Daphnia magna</i>	LC50	0,117	c
Tributylzinnchlorid	<i>Tubifex tubifex</i>	LC50	0,020	d
	<i>Daphnia magna</i>	LC50	0,0047	a

a [www.pesticideinfo.org](http://www.pesticideinfo.org) (Pesticide Action Network North America)

b Gunkel G. (1983)

c Spehar et al. (1999)

d Polster und Halacka (1971)

Erwartungsgemäß reagiert *C. elegans* jedoch weniger sensitiv gegenüber den aufgeführten organischen Substanzen als zum Beispiel der Wasserfloh (*D. magna* bzw. *D. pulex*). Für den in diesem Projekt vorgesehenen Vergleich zwischen Reproduktionstest und Genexpressionstest bleibt festzustellen, dass ersterer in allen durchgeführten Experimenten gut reproduzierbare und konzentrationsabhängige Datenreihen lieferte und die erhaltenen Effektkonzentrationen sich mit anderen Arten gut vergleichen lassen. Damit besteht



die gewünschte solide Grundlage für eine Einschätzung über die Aussagekraft der Effektkonzentrationen aus den Genexpressionstests.

### 2.3.2. Gesamtgenomischer DNA Microarray

Die Untersuchung mit Hilfe des gesamtgenomischen *C. elegans* DNA-Microarrays zeigte bei Einsatz von fünf verschiedenen Testsubstanzen in einer Konzentration, die annähernd mit der  $EC_{20}$  für die Reproduktion korrelierte, eine starke und differentielle Genexpression in Abhängigkeit der verwendeten Testsubstanz. Im Einzelnen konnten vor allem Gene, die für Proteine kodieren, die bereits bekannt dafür sind, dass sie in Phase I bzw. II des Biotransformationssystems involviert sind, durch die verwendeten Testsubstanzen induziert werden. Zu diesen Genen gehören vor allem CYP P450 Gene, UDPGs, GSTs, Carboxylesterasen aber auch Gene, deren Induktion als eine allgemeine Stressantwort gewertet werden kann, wie z.B. die HSP Gene. Weitere Gene, wie z.B. die Vitellogenine konnten ebenfalls gut durch die verwendeten Chemikalien induziert werden und bekamen dadurch gleichfalls eine hohe Relevanz für die Genauswahl des *Celegans* Toxchips. Basierend auf diesen Ergebnissen konnten Gene, die aus einem breiten Spektrum von Aufgaben des Stoffwechsels stammen, als schadstoffinduzierbar eingestuft werden. Dies war der erste Schritt, um mit dem *Celegans* Toxchip ein Nachweissystem für unterschiedliche Chemikalien aufzubauen.

### 2.3.3. Biomonitor-Tests mit dem *Celegans* Toxchip

Durch die Hybridisierungsexperimente mit dem *Celegans* Toxchip und den eingesetzten sieben Testsubstanzen konnten insgesamt 31 von den 66 Genen des *Celegans* Toxchip induziert werden. Von diesen 31 Genen gehören unter anderem 11 Gene zur Cytochrom P450 Genfamilie, das *vem-1* Gen zur Cytochrom b5 Familie, je drei Gene kodieren für UDP-Glucuronosyltransferasen, für Hitzeschockproteine, Carboxylesterasen und

Vitellogenine und je zwei Gene für Glutathion S-transferasen. Weiterhin wurde das Kollagen Gen *col-38*, das *sym-1* Gen und das Metallothionin Gen *mtl-1* durch mindestens eine der untersuchten Substanzen induziert. Zwei Gene, C29F7.2 und F58H1.2, deren Funktionen im Stoffwechsel noch unbekannt sind, konnten durch je zwei der eingesetzten Testsubstanzen induziert werden. Zur besseren Einschätzung der erhaltenen Expressionsmuster wird im Folgenden kurz auf die Charakteristika der induzierten Gengruppen eingegangen und ihre Induktion im Rahmen der *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimente diskutiert.

#### *CYP-Gene:*

Die Cytochrom P450 Gruppe gehört zu einer im Organismenreich sehr weit verbreiteten Supergenfamilie. Sie sind Monooxygenasen, enthalten Häm als prosthetische Gruppe und sind Teil eines MFO (Mixed-Function Oxidase)-Systems. Das Monooxygenasesystem zeichnet sich durch die Eigenschaft aus, ein Atom molekularen Sauerstoffs in ein Substrat einzubringen und das andere Sauerstoff-Atom zu Wasser zu reduzieren. CYPs machen die größte Enzymfamilie aus, die bisher in der Natur entdeckt worden ist (Snyder, 1998). Sie katalysieren viele anabole und katabole Reaktionen wie Entgiftungsprozesse, Biotransformationen und spielen eine wichtige Rolle bei der Lipid- und Cholesterinsynthese (Xu et al., 2001). CYP-Proteine katalysieren die Phase I der Biotransformationen, in denen die Polarität des Substrats durch Einführen reaktiver Gruppen erhöht wird (Pemberton und Barrett, 1989; Schuetz, 2001). CYPs aktivieren Sauerstoff, oxidieren das Substrat durch Einfügen eines Atoms molekularen Sauerstoffs und lösen anschließend die Bindung zum Produkt (Guengerich, 2001). Durch die erhöhte Löslichkeit kann der Stoff leichter vom Körper ausgeschieden werden oder andere Enzyme wandeln ihn in Phase II des Biotransformationssystems weiter um (Sheweita, 2000). CYPs spielen also eine entscheidende Rolle bei der Detoxifikation von Giften und chemischen Kanzerogenen, können aber auch harmlose Stoffe in

gefährlichere umwandeln, indem sie zum Beispiel Prokarzinogene aktivieren (Sueyoshi und Negishi, 2001).

*C. elegans* besitzt 80 P450 Gene (Gotoh, 1998), die durch verschiedenste Xenobiotika, wie zum Beispiel PAKs, induziert werden können (Menzel et al., 2001). Von den 10 durch die *C. elegans* Toxchip Experimente als induzierbar gezeigten CYP P450 Gene, wurden vier aus der Familie 35A1, 35B2 und 35C1 durch 5 mg/l  $\beta$ -Naphthoflavon induziert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Menzel et al. (2001) für RT-PCR Untersuchungen an diesen Genen. Neben  $\beta$ -Naphthoflavon wurde 35B2 auch durch alle verwendeten TBT Konzentrationen starkinduziert werden. Endosulfan konnte 14A5 und 34A9 in den Konzentrationen von 1,5 und 0,3 mg/l sowie bei 34A9 auch mit einer Konzentration von 0,06 mg/l induzieren. Das Gen 35C1 ist das durch Fluoranthen am stärksten induzierte Gen welches sich mit Ergebnissen deckt, die bereits mit einem Genfilter (Menzel et al., 2001) und mit den RT-PCR-Untersuchungen erzielt worden sind. Weiterhin konnte Fluoranthen das Gen 37B1 bei einer Konzentration von 0,5 mg/l induzieren. Bisher ist noch keine Induktion dieses Gens durch Fluoranthen bekannt geworden. Die Untersuchungen mit einem Genfilter zeigten auch keine Induktion bei Exposition mit dem starken Induktor  $\beta$ -Naphthoflavon (Menzel et al., 2001). Wird der Standardfehler mit einbezogen, so liegt der Wert jedoch nur knapp über dem Schwellenwert der Verdopplung der Genexpression. Das könnte auch ein Indiz für die hohe Sensitivität des Toxchips im Gegensatz zu anderen molekularbiologischen Methoden sein. Eine Überprüfung durch weitere Hybridisierungsexperimente und vergleichende RT-PCR Untersuchungen erscheint angezeigt. Durch TBT konnte desweiteren das Gen 35B1 durch die beiden höchsten verwendeten TBT Konzentrationen induziert werden. Da die P450-Gene bekannt für ihre Beteiligung an Schadstoff-metabolisierenden Prozessen sind, entsprechen die Expressionsergebnisse grundlegend den Erwartungen. Weiterhin führen die genannten Ergebnisse zu der Annahme, dass die genannten CYP Genfamilien am Metabolismus der eingesetzten Chemikalien beteiligt sind.

Für 35A3 wurde bei Atrazin, Clofibrat, Endosulfan und Fluoranthen, sowie für 35A5 bei Atrazin und Clofibrat und bei 35A1 durch Clofibrat eine Repression gefunden. Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, da für die Familie 35A in Genfilterexperimenten (Menzel et al., 2001) und in den RT-PCR Untersuchungen eine Induktion mit den Testsubstanzen Atrazin und Fluoranthen nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass 35A3 auch durch andere PAKs bzw. PCB stark induziert werden kann (Menzel et al., 2001). Eine Repression verschiedener CYP Gene ist bis dato für *C.elegans* noch nicht gezeigt worden, jedoch konnte bei Ratten und Mäusen durchaus eine Repression für verschiedene CYP Gene durch Clofibrat, Phenobarbital und dem PAK 3MC nachgewiesen werden (Gerhold et al., 2001; Cui et al. 2000). Eine Überprüfung der Ergebnisse durch weitere Hybridisierungsexperimente wäre angebracht.

#### *UDPGT-Gene:*

UDP-Glucuronosyltransferasen (UDPGTs) gehören zu den Phase II Enzymen, wobei das Substrat durch Erhöhung der Löslichkeit inaktiviert und die Exkretion erleichtert wird (Zhang et al., 1996). Lipophile Substrate werden mit Hilfe des Cosubstrats UDP-Glucuronsäure zu hydrophileren Glucuroniden transformiert (Tukey und Strassburg, 2000). Sie katalysieren die Addition der Glykosyl-Gruppe eines Nukleotid-Zuckers an verschiedene endogene und exogene Substanzen, darunter auch viele Xenobiotika wie Benzo(a)pyren (King et al., 2000). UDPGTs werden nach Sequenzhomologien in zwei Unterfamilien eingeteilt.

Für C10H11.3 konnte eine Expression durch  $\beta$ -Naphthoflavon, sowie durch Endosulfan gezeigt werden. C08F11.8 konnte nur durch  $\beta$ -Naphthoflavon exprimiert werden. C23G10.6 wurde durch Endosulfan exprimiert und durch Atrazin und Fluoranthen reprimiert, was nicht den Erwartungen entspricht, da UDP-Glucuronosyltransferasen einen Beitrag zur Detoxifikation in den Zellen leisten und bereits gezeigt wurde, dass sie durch viele Xenobiotika unter

anderem auch durch PAKs exprimiert werden können (Tukey und Strassburg, 2000). Eine Repression des Gens C23G10.6 durch Fluoranthren wurde bisher noch nicht untersucht. RT-PCR Analysen und Experimente mit *lacZ*- oder GFP-Fusionskonstrukten könnten zur Bestätigung der Ergebnisse hinzugezogen werden.

#### *GST-Gene:*

Glutathion S-Transferasen (GSTs) sind eine große Familie von löslichen Phase II Enzymen, die mit Hilfe von Glutathion Karzinogene, Medikamente und Produkte der Phase I Transformation metabolisieren (Board et al., 2001; Vondracek et al., 2002). Sie inaktivieren toxische und karzinogene Substanzen, indem sie die Bildung von Glutathion-Konjugaten katalysieren (Sheweita, 2000). Dadurch werden die Stoffe hydrophiler und können leichter eliminiert werden (Suzuki et al., 2001). Weiterhin spielen sie eine Rolle beim Transport von Hormonen und endogenen Metaboliten. GSTs werden unter anderem durch Schwermetalle und PAKs induziert.

In den Celegans Toxchip Experimenten konnten für Y48E1B10 mit Atrazin in den Konzentrationen von 25 mg/l und 5 mg/l, sowie für R03D7.6 mit  $\beta$ -Naphthoflavon bei einer Konzentration von 5 mg/l Induktionen gezeigt werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen.

Ebenfalls für R03D7.6 ergab sich durch den Einsatz von Clofibrat in einer Konzentration von 10 mg/l eine Repression des Gens. Eine Repression von GST Genen bei Ratten konnte durch Gerhold et al. (2001) gezeigt werden, wobei die Bedeutung dieser Repression noch unklar bleibt.

#### *Carboxylesterasen*

Carboxylesterasen gehören zu einer Multigenfamilie, deren Produkte im Endoplasmatischen Retikulum vieler Säugergewebe zu finden sind. Sie katalysieren die Hydrolyse eines großen Spektrums an Ester- und Amidverbindungen enthaltener Chemikalien. Weiterhin sind sie involviert in die

Detoxifikation und metabolische Aktivierung verschiedener Pharmazeutika, Umweltschadstoffe und Karzinogene (Satoh und Hosokawa, 1998). Carboxylesterasen können durch PAKs (Nousiainen et al., 1984), Clofibrat (Ashour et al., 1987; Hosokawa et al., 1988; Mentlein et al., 1986) und andere Chemikalien induziert werden.

In den Celegans Toxchip Hybridisierungsexperimenten konnte eine Induktion der beiden für Carboxylesterasen kodierenden Gene B0238.13 und F13H6.3 gezeigt werden, wobei beide durch  $\beta$ -Naphthoflavon in einer Konzentration von 5 mg/l exprimiert wurden. Dieses korreliert mit den Ergebnissen von Nousiainen et al. (1984) und entspricht den Erwartungen. Für B0238.13 konnte zusätzlich eine Induktion durch Endosulfan in den beiden Konzentrationen 1,5 mg/l und 0,3 mg/l gezeigt werden. Das Gen C17H12.4 zeigte bei einer Konzentration von 10 mg/l Clofibrat eine Repression. Da Carboxylesterasen durch verschiedene Stoffe inhibiert werden können (Satoh und Hosokawa, 1998), liegt die Vermutung nahe, dass Clofibrat u.a. zu diesen Stoffen gehört.

#### *HSP-Gene:*

HSP-Gene kodieren für Hitze-Schock-Proteine, die in allen Lebewesen hoch konserviert sind. Als Induktoren wirken beschädigte und falsch gefaltete zelluläre Proteine, welche durch Stress entstehen. Die Genexpression wird durch HSTFs (Hitze Schock Transkriptions Faktoren) reguliert, welche nach Stresseinwirkung (und daraus resultierende beschädigte Proteine) ihre Konformation ändern, an den HSP-Promotor binden und dann die Expression der HSP-Gene induzieren (Thakurta et al., 2002). Einige HSPs werden ständig exprimiert, andere nur unter bestimmten Bedingungen. HSPs dienen als molekulare Chaperone<sup>1</sup>, um bei der Proteinfaltung zu assistieren (Snyder et al., 2001; Köhler et al., 1998) und beim Proteintransport zu helfen (Power et al., 1998).

Die HSPs werden nach ihrem Molekulargewicht in 5 Gruppen eingeteilt (David et al., 2003). Die Celegans Toxchip Experimente wiesen Induktionen für

<sup>1</sup> Chaperon: Protein, das die Faltung anderer Proteine unterstützt

HSP70- und HSP16-Gene nach, wobei HSP70-Gene bekannt sind für ihre Induzierbarkeit durch extreme Temperaturen, osmotischen Schock, Schwermetalle oder organische Toxine (Hassanein et al., 1999), HSP16-Gene können durch extreme Temperaturen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ozon und pH-Wert-Schwankungen induziert werden (Link et al., 1999).

Die Testsubstanz  $\beta$ -Naphthoflavon induzierte in einer verwendeten Konzentration von 5 mg/l drei HSP-Gene des Celegans Toxchips, dabei gehören T27E4.2 und T27E4.3 zu den HSP-16 Genen und F44E5.5 zu den HSP-70 Genen. Für F44E5.5 konnten Custodia et al., 2001 eine Induktion durch Progesteron nachweisen. Die Induktion dieser Gene lässt darauf schließen, dass  $\beta$ -Naphthoflavon als PAK eventuell einen allgemeinen Stress auslöst, der sich dann durch die Überexpression dieser Gene manifestiert.

#### *Metallothionine:*

Metallothionine (MTs) sind cytosolische, nichtenzymatische Proteine mit geringem Molekulargewicht. Sie zeichnen sich durch große Hitzestabilität, hohen Cysteingehalt und durch das Fehlen von aromatischen Aminosäuren aus. Sie binden sowohl toxische als auch nicht toxische Metallionen, wie zum Beispiel Zink, Kupfer, Silber, Cadmium und Quecksilber (Hamza-Chaffai et al., 1996). Die wichtigsten Funktionen der Metallothionine sind Schutz vor Cadmium, Speicher für Zink und Kupfer und das Einfangen von Radikalen. Anhand von Strukturmerkmalen werden sie in drei Klassen eingeteilt (Klaassen et al., 1999).

Das in dieser Untersuchung durch  $\beta$ -Naphthoflavon und Fluoranthren induzierbare *mtl-1* Genprodukt wirkt bei der Metalldetoxifikation und Stress-Adaptation mit und wird in allen *C. elegans* Stadien bei Cadmiumzufuhr oder Hitzestress in den Darmzellen induziert. In drei Zellen des Pharynx wurde zudem eine konstitutive Expression beobachtet, indem ein *mtl-1::lacZ*-Fusionskonstrukt transgen exprimiert wurde (Freedman et al., 1993). Zusätzlich zu den Beobachtungen, dass die Expression durch Schwermetalle induzierbar

und zellspezifisch ist, wurde gezeigt, dass sie auch abhängig vom Entwicklungsstadium ist. In jungen Larvenstadien wird das Gen stärker exprimiert als in adulten Nematoden. Das Gen *mtl-1* besitzt viele Wiederholungen von GATA Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, an die sich der Transkriptionsfaktor *elt-2* binden kann. Es wurde vermutet, dass *elt-2* die Expression von *mtl-1* stetig induziert. Ein zweiter Metall-sensitiver Faktor sorgt möglicherweise für die Repression der *mtl-1* Transkription.

Obwohl  $\beta$ -Naphthoflavon und Fluoranthen keine Metalleigenschaften besitzen und nicht von Metallothioninen gebunden werden können, wird das *mtl-1* Gen durch sie induziert. Eventuell bewirken die beiden Chemikalien durch Proteinschädigungen einen Stresszustand in den Zellen. Sofern der reprimierende Faktor existiert, ist es wahrscheinlich, dass er durch  $\beta$ -Naphthoflavon und Fluoranthen inaktiviert wird. Um jedoch Näheres darüber zu erfahren, müssten die Auswirkungen beider Testsubstanzen auf die Zelle und die einzelnen Proteine studiert werden.

#### *Vitellogenine:*

Vitellogenine (VTGs) werden auch in *C. elegans* durch Östrogene bzw. östrogenartig wirkende Substanzen (endocrine disruptors) induziert (Custodia et al., 2001). Vitellogenine sind Eidotter-Proteine, die hauptsächlich in weiblichen Tieren zu finden sind (Kohra et al., 1999), sie wurden bereits in vielen Versuchsreihen als Biomarker eingesetzt. In *C. elegans* kommen sie in den Hermaphroditen vor. Die Expression findet insbesondere in den Zellen des Darmtrakts in jungen adulten Tieren statt (MacMorris und Blumenthal, 1993). Eine signifikant verstärkte Produktion der VTGs lässt darauf schließen, dass die eingesetzte Substanz östrogene Aktivität aufweist. In der Umwelt können solche Stoffe zur Störung Hormon gesteuerte Abläufe im Körper führen und eine „Verweiblichung“ von männlichen Tieren auslösen. Da eine große Ähnlichkeit zwischen Vertebraten- und Nematoden-Vitellogeninen gefunden



worden ist, könnten die durch Nematodenversuche erhaltenen Ergebnisse auch für die humane Forschung von Bedeutung sein (Spieth et al., 1985).

In den *Celegans* Toxchip Experimenten konnte für das Vitellogenin Gen *vit-3* (F59D8.1) eine Induktion durch  $\beta$ -Naphthoflavon in einer Konzentration von 5 mg/l sowie eine Repression durch Fluoranthen in einer Konzentration von 0,5 mg/l nachgewiesen werden. Eine Induktion des Gens konnte bereits in den Untersuchungen mit dem gesamtgenomischen *C. elegans* DNA-Microarray für Fluoranthen gezeigt werden. Eine Untersuchung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren könnte Aufschluss über die Art und Wirkung von PAKs auf die Vitellogenin Geninduktion geben und legt gleichzeitig die Vermutung nahe, dass PAKs Östrogenaktivität besitzen. Für das Gen *vit-6* konnte eine eindeutige Induktion für alle drei eingesetzten DES Konzentrationen gezeigt werden. Katchamart et al. (2002), wiesen durch Einsatz von DES eine deutliche Steigerung des Plasma Vitellogenin Spiegels bei der Regenbogenforelle nach. TBT in einer Konzentration von 0,06 mg/l bewirkte eine eindeutige Induktion des Vitellogenin Gens *vit-2*. TBT wird genauso wie DES als endokriner Disruptor angesehen (Alzieu, 2000; Fent, 2003). Endokrine Disruptoren ähneln in ihrem chemischen Aufbau sehr stark körpereigenen Hormonen und können durch unterschiedliche Wirkweisen in den körpereigenen Hormonhaushalt eingreifen und nachfolgend zu erheblichen Störungen führen. Alzieu (2000) formulierte die Vermutung, dass bereits TBT Konzentration unterhalb von 1 ng/l bei vielen weiblichen Gastropoden zur Ausprägung männlicher Geschlechtsmerkmale führen können. Konzentrationen über 1 ng/l können Effekte auf die Reproduktion von Muscheln und Fische haben. Die Induktion von Vitellogenin Genen durch DES und TBT unterstreicht ihr östrogen- bzw. androgenartig wirkendes Potenzial auch für *C.elegans*.

### *Kollagene*

Die Kollagene bilden eine Proteingruppe, die vor allem am Aufbau der Kutikula beteiligt ist. Das Gen *col-38* (F54C9.4) gehört zu dieser Kollagengenfamilie und

sein Produkt zeichnet sich durch 20 Kollagen-Tripel-Helix Wiederholungen aus. Durch RNA Interferenz Versuche wurde festgestellt, dass das Gen essentiell für eine normale Körper-Morphologie ist. Ein Ausschalten des Gens führte zu einem dpy (dumpy=untersetzt)-Phänotyp. Durch Microarray-Analysen wurde ermittelt, dass das Gen ohne Schadstoffinduktion erst ab dem dritten Larvenstadium abgelesen wird (Hill et al., 2000). Das Protein ist Bestandteil der Kutikula von *C. elegans* und erhöht wahrscheinlich die Stabilität und Flexibilität der Kutikula. Es sind jedoch keine Ergebnisse zur Regulation der Genexpression veröffentlicht.

Die Induktion durch Fluoranthen könnte bedeuten, dass das Gen möglicherweise indirekt durch den Schadstoff-Metabolismus induziert wird. Diese Vermutung wird bestärkt durch die Ähnlichkeit des kodierten Proteins mit einem *Saccharomyces cerevisiae* HSP-40 Protein. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die gefundene Induktion könnte sein, dass die Kutikula durch vermehrten Einbau des Proteins gestärkt werden soll, um weniger durchlässig für die Chemikalie zu sein.

### *Sym-1*

Das Gen *sym-1* (*sym* steht für synthetisch letal mit *mec-8*) kodiert für ein Protein mit 15 benachbarten Leucin-reichen Wiederholungen und einer Signalsequenz. RNAi Untersuchungen blieben ohne Auffälligkeiten. Es wurde jedoch eine funktionale Überlappung mit dem *mec-8* Gen entdeckt, welches für einen Regulator des alternativen RNA-Splicings kodiert (Davies et al., 1999). Bei einer *mec-8* loss-of-function Mutation zeigte sich kein auffälliger Phänotyp. Zusammen mit einer Nonsense-Mutation in *sym-1* entstanden jedoch letale Phänotypen mit einer Störung in der Bindung zwischen Muskeln und extrazellulärer Kutikula (Yochem et al., 2000). Aufgrund von GFP-Reportergen-Assays und Northern Blots wurde die Hypothese aufgestellt, dass das *sym-1*-Protein zur Muskelbindung an die Kutikula benötigt wird. Dieselbe Funktion besitzt vermutlich auch ein Protein, das durch alternatives Splicing entsteht.

Wenn beide Proteine fehlen, entsteht der beobachtete Phänotyp (Spike et al., 1999).

Das Gen *sym-1* wurde durch 0,5 mg/l Fluoranthen reprimiert. Eine Möglichkeit der Erklärung dieser Repression könnte sein, dass Fluoranthen Schäden an Transkriptionsfaktoren verursacht, die zur Expression von *sym-1* beitragen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Inhibitoren der Transkription durch Biotransformationsprozesse aktiviert werden. Anhand der bisher publizierten Ergebnisse können jedoch nur Vermutungen geäußert werden. Durch Promotordeletionskonstrukte könnte der für die Repression verantwortliche Promotorbereich identifiziert werden. Sequenzanalysen könnten Rückschlüsse auf den Transkriptionsfaktor zulassen und durch gezielte Deletion der Gene der Transkriptionsfaktoren und einer anschließenden Northern Blot Analyse könnte der korrekte Transkriptionsfaktor ausfindig gemacht werden, der die Expression von *sym-1* beeinflusst.

#### *C29F7.2:*

Die Funktion dieses Gens ist bislang nicht bekannt. Das Protein wird jedoch in allen vier Larvenstadien synthetisiert. Es wird angenommen, dass es sich um ein cytoplasmatisches Protein handelt (NCBI). Seine Induktion durch 5 mg/l  $\beta$ -Naphthoflavon, 0,5 mg/l Fluoranthen und DES in allen drei eingesetzten Konzentrationen weisen auf eine Beteiligung am Prozess des Schadstoffmetabolismus hin. Leider liegen zurzeit noch keine Ergebnisse aus RNAi-, Microarray- oder anderen aussagekräftigen Analysen vor, die diese Vermutung untermauern oder widerlegen würden.

#### *F58H1.2:*

Die Funktion des Genes ist bislang nicht ermittelt worden. Der RNAi-Phänotyp zeigt keine Störungen. Die bisher durchgeführten, entwicklungsabhängigen Microarray-Analysen zeigten, dass das Gen in den L1- bis L4-Larven stetig exprimiert wird (Hill et al., 2000). Die hohe Übereinstimmung (75,8%) mit dem Transkriptionsfaktor COE2 des Menschen und der Maus (*Mus musculus*) legt

die Vermutung nahe, dass es sich auch hierbei um einen Transkriptionsfaktor handelt. Das Gen wurde bei Atrazin Konzentrationen von 5 mg/l und 1 mg/l, sowie bei einer Fluoranthen Konzentration von 0,5 mg/l und den beiden höchsten verwendeten Clofibrat Konzentrationen reprimiert. Wenn es sich tatsächlich um einen Transkriptionsfaktor handelt, so könnte er an der Expression einer der zuvor beschriebenen Gene beteiligt sein. Das könnte mit einer loss-of-function Mutation oder RNAi und anschließender cDNA-Microarray Analyse überprüft werden. Ein Northern Blot wäre zur abschließenden Absicherung sinnvoll.

#### 2.3.4. Genexpressionstests mittels RT-PCR und GFP Reporterkonstrukt

Wie bereits im Ergebnisteil kurz erwähnt wurden diese beiden neuen Testsysteme in das Projekt eingeführt, um der technisch anspruchsvollen DNA Array Technologie zwei weitere Methoden zur Quantifizierung der Genexpression an die Seite zu stellen. Dabei waren beide Systeme eingegrenzt auf die Bestimmung des Expressionsstatus von Cytochrom P450 Genen, 35A1, A2, A5 und C1 im Fall der semiquantitativen RT-PCR, 35A3 als Promoter-GFP Reporter Konstrukt. Die CYP35 Formen wurden deshalb für diese Experimente ausgewählt, da hier bereits die meisten Untersuchungen durchgeführt wurden und es Hinweise darauf gibt, dass die kodierten Enzyme an der Biotransformation von Schadstoffen beteiligt sind (Menzel et al., 2001).

Die hier durchgeführten Versuche bestätigten eindrucksvoll die starke Induzierbarkeit der gewählten CYP Gene durch PAKs, PCB52 und Lansoprazol. Dabei stimmten die errechneten Induktionsfaktoren für die Vervielfachung der Genexpression (RT-PCR) sehr gut mit der gemessenen Steigerung der GFP Lichtemission überein. Als stärkster Induktor erwies sich  $\beta$ -Naphthoflavon, gefolgt von PCB52, Fluoranthen, Lansoprazol und Atrazin. Es ergaben sich weiterhin in jedem Fall (mit der Ausnahme von Atrazin im GFP Reporter gentest) klare Konzentrations-Effekt Abhängigkeiten, bei denen auch geringere Chemikalienkonzentrationen eine signifikante Wirkung zeigten. Ein Vergleich

der Ergebnisse der Genexpressionstests mit denen der Reproduktionstests erfolgt im nächsten Abschnitt.

Sind momentan DNA Array Experimente mit aus den Boden isolierten Nematoden aufgrund der geringen Individuenanzahl und damit zu geringer RNA Ausbeute noch unmöglich, könnten Single worm RT-PCR und GFP Messungen sehr einfach genutzt werden. Durch die Möglichkeit bei beiden Tests bereits schon von einzelnen Tieren eine ausreichend starke Antwort zu erhalten, bieten sie sich auch für das molekularbiologisch noch nicht untersuchte Bodensystem an.

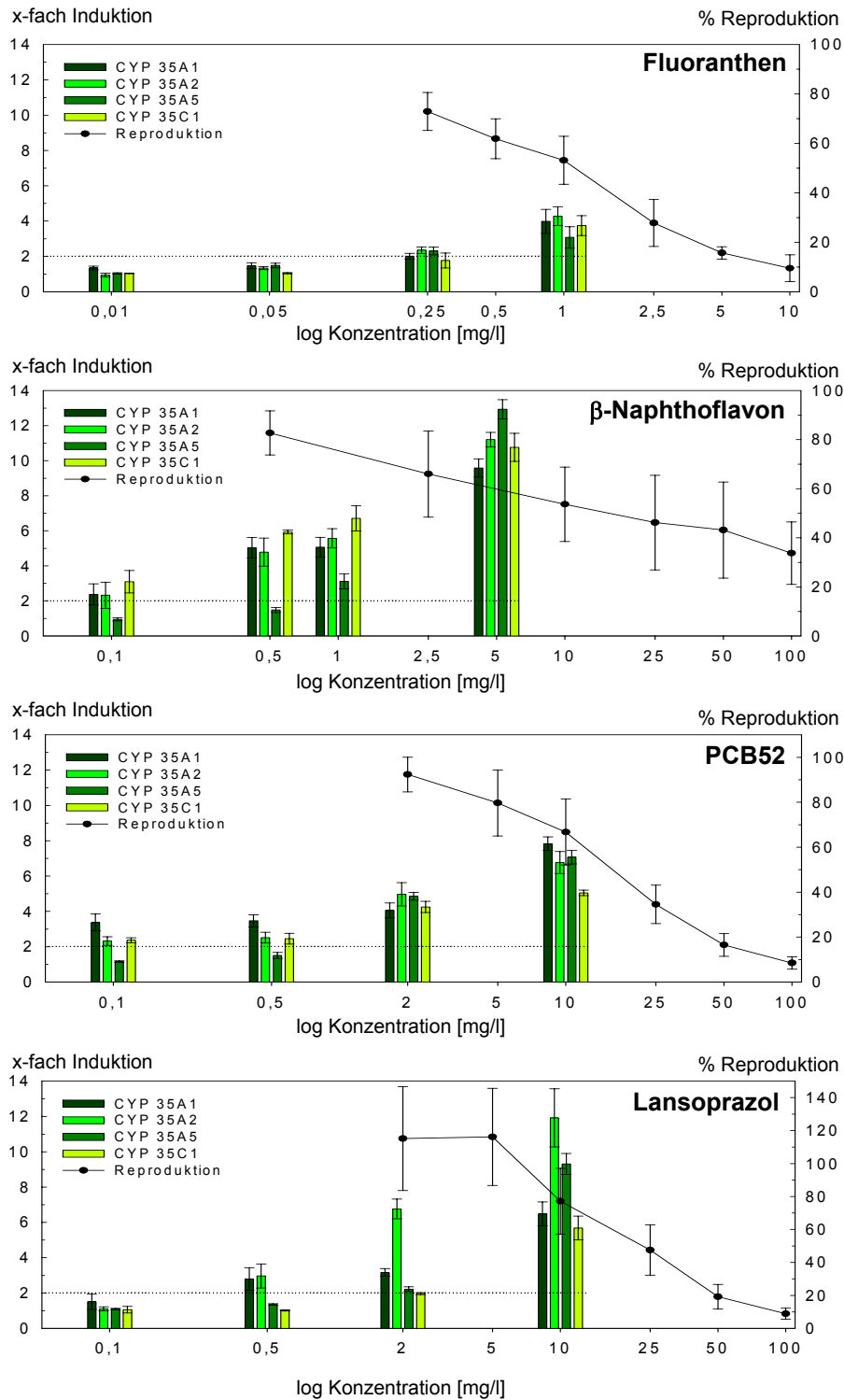
#### 2.3.5. *Vergleich zwischen Reproduktions- und Genexpressionstests und Verwertbarkeit der Ergebnisse*

Für die Nutzung der Genexpression von *C. elegans* als Biomarker existiert für bisher nur ein etabliertes System. P. Candido und Mitarbeiter entwickelten Genfusionen zwischen Promoterelementen des *hsp-16* Gens (kodiert für ein kleines Hitzeschockprotein in *C. elegans*) und dem Reporter gen *lacZ* (kodiert für  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli*) und exprimierten die Konstrukte transgen in den Tieren (Candido und Jones 1996; Power et al. 1998). In diesem System werden die transgenen Tiere (ähnlich wie im Projekt die Nutzung des CYP-GFP Konstruktes) selbst zum Stressmonitor; eingesetzt sowohl in aquatischen als auch terrestrischen Umgebungen. Dabei wird das Potential des *hsp-16* Promotors, auf eine Vielfalt unterschiedlicher Stressfaktoren (z.B. chemischer Stress, Kälte- oder Hitzestress, Mikrowellen) mit einer starken Induktion der Genexpression zu antworten, genutzt. Die Steigerung der Genexpression wird durch die verstärkte Expression des Reporterproteins optisch sichtbar gemacht (Blaufärbung der Tiere) und quantitativ erfasst. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass *C. elegans* auf die Präsenz von Hormonen (Estradiol-17 $\beta$ ) und anderen endokrinen Disruptoren (wie Bisphenol-A, Vinclozolin) mit einer massiv verstärkten Expression von Vitellogenin mRNA reagierte (Kohra et al. 1999).

Die im Projekt erhaltenen Ergebnisse zur schadstoffinduzierbaren Genexpression mittels RT-PCR und CYP35A3 Promotor-GFP Konstrukt zeigen das hohe Potenzial des Faktors Genexpression in *C. elegans* als möglicher Biomarker. In Abbildung 24 sind zum besseren Vergleich die Konzentrations-Effekt Daten zur Reproduktion einerseits und zur induzierten Genexpression von vier CYP35 Genen andererseits in jeweils einem gemeinsamen Diagramm für vier ausgewählte Substanzen dargestellt.

Nimmt man einerseits die Verdopplung der Genexpression und andererseits die Halbierung der Reproduktionsleistung, dann wird deutlich, dass die Induktion der ausgewählten CYP Gene wesentlich sensitiver auf die Schadstoffinkubation reagieren als der gesamtorganismische Endpunkt des Reproduktionserfolges. Für  $\beta$ -Naphthoflavon ist dieser Unterschied besonders anschaulich. Bewirkte hier bereits die geringste eingesetzte Konzentration von 0,1 mg/l eine Verdopplung der Genexpression von einem CYP Gen, lag die EC50 der Reproduktion bei 18,94 mg/l und damit knapp 200-fach höher. Weitet man diese Rechnung auf andere Substanzen aus, kommt man auf die Werte rund 150-fach für PCB52, gefolgt von knapp 50-fach für Lansoprazol und immer noch rund 5-fach für das deutlich toxischere Fluoranthen. Die Nutzung des transgenen, induzierbaren GFP exprimierenden Nematodenstammes erbrachte dabei einen vergleichbaren Sensitivitätssprung und eröffnet durch den Wegfall der PCR Analytik ein noch einfacher handhabbares Nachweissystem. Diese Ergebnisse bestätigen eindrucksvoll die Grundidee des Projektes, dass die schadstoffinduzierbare Genexpression in dem Nematoden *C. elegans* ein sehr sensitiver neuer Endpunkt in ökotoxikologischen Tests für die Erfassung von biologisch aktiven Schadstoffen in der Umwelt sein kann.

Ein wesentliches Ziel des Projektes bestand auch darin, dieses jetzt erwiesene Potenzial durch die parallele Testung einer Vielzahl von Genen mittels eines DNA Arrays soweit zu nutzen, dass durch die Erfassung der abgeleiteten Genexpressionsmuster eine stoffklassenspezifische Zuordnung der eingesetzten/vorhanden Schadstoffe möglich wird.



**Abb. 24:** Vergleichende Konzentrations-Effekt Plots aufgenommen für die Reproduktion und die induzierbare Genexpression von vier CYP35 Genen im Flüssigmedium.

Die nur bei rund der Hälfte der Gene des Celegans Toxchip gefundene Induktion durch die verwendeten Testsubstanzen entspricht jedoch nicht den großen Erwartungen an den Celegans Toxchip. Vergleicht man die Ergebnisse der Celegans Toxchip Untersuchungen mit denen der durchgeführten Reproduktionstests, so lässt sich zwar wieder feststellen, dass diese in Bezug auf die Sensitivität wiederum höher ist. Die Untersuchungen zur Induktion der Genexpression mit der RT-PCR-Methode zeigten jedoch z.B. für die CYP-Gene 35A1, 35A2, 35A5 und 35C1 noch eine Induktionen bei einer Konzentration von 0,1 mg/l  $\beta$ -Naphthoflavon was im Rahmen der Celegans Toxchip Experimente nicht bestätigt werden konnte. Des Weiteren konnte auch für die Testsubstanz Fluoranthen bei einer Konzentration von 0,5 mg/l eine Expression der CYP Gene 35A1-5, 35B1-2 und 35C1 gezeigt werden, welches in den Celegans Toxchip Experimenten nur für das Gen 35C1 ermittelt werden konnte. Für andere Gene ließ sich weder eine signifikante Induktion noch Repression nachweisen, obwohl dies aufgrund der gesamtgenomischen Array Experimente zu erwarten gewesen wäre.

Diese Abweichungen der Ergebnisse der Celegans Toxchip Experimente zu den anderen Untersuchungsergebnissen (den RT-PCR Untersuchung und den gesamtgenomischen DNA Array Experimenten) sind sehr wahrscheinlich durch technische Probleme bei der experimentellen Durchführung der Celegans Toxchip Experimente bedingt. Obwohl sich der *Celegans*-Toxchip in der grundlegenden Handhabung als relativ einfach erwies, sind Einbußen betreffend der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu machen. Auch ist deutlich zu bemängeln, dass, abgesehen von einzelnen Ausnahmen, keine klaren Konzentrations-Effekt Abhängigkeiten aufgezeigt werden konnten, obwohl dies aufgrund der anderen Genexpressionstests durchaus zu erwarten war. Der große Vorteil eines DNA Arrays, der darin besteht in jedem Experiment viele Gene parallel zu analysieren und damit eine große Zeitersparnis gegenüber anderen molekularbiologischer Methoden aufweist, konnte im Fall des Celegans Toxchip noch nicht ausgenutzt werden. Möglicherweise muss auch noch an der Reinheit der RNA-Proben gearbeitet werden, welche besonders bei



der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen sehr wichtig ist. Verunreinigungen wie Proteine oder Lipide können zu unspezifischen Bindungen der markierten cDNA an die Matrix-Oberfläche führen (Murphy, 2002).

Abschließend bleibt festzustellen, dass die induzierbare Genexpression in allen im Projekt eingesetzten Nachweissystemen ein signifikant sensitiverer Marker für den biologischen Nachweis der verwendeten Chemikalien war, als der im Vergleich verwendete Reproduktionstest. Der *Caenorhabditis elegans*-Toxchip sollte jedoch noch auf den technischen Stand gebracht werden, der reproduzierbare und konzentrations-abhängige Ergebnisse produziert. Das Potenzial des Faktors Genexpression in *C. elegans* konnte in diesem Projekt sehr deutlich gemacht werden.

Die Autoren setzen sich dafür ein, dass die schadstoffinduzierbare Genexpression von *C. elegans* als zusätzlicher Biomarker im Bereich der Ökotoxikologie stärkere Anwendung findet. So könnten Umweltproben mit Hilfe von *C. elegans* auf ihre Geninduktionswirkung in einer Art Vorscreening getestet werden. Darüber hinaus könnte ein optimierter Toxchip in begrenztem Umfang auch Hinweise auf die Art der Belastung geben. Weiterhin ist vorstellbar, dass mit Hilfe von Genexpressionstests Grenzwerte für Schadstoffbelastungen daraufhin überprüft werden, ob diese möglicherweise doch bereits eine Stressantwort auf der molekularen Ebene induzieren.

#### **2.4. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens von dritter Seite**

Während der Entwicklung des *Caenorhabditis elegans* Toxchips gab es basierend auf eigenen Bibliotheks- und Internetrecherchen zwei interessante Hinweise in Bezug auf die Genauswahl für den *Caenorhabditis elegans* Toxchip durch die Callard Arbeitsgruppe aus Boston auf Hormon-induzierbare Gene (Custodia et al, 2001) und durch Stuart Kims Gruppe in Bezug auf Hsp-Proteinen (Thakurta et al, 2002). Die Ergebnisse beider Arbeiten sind in den Genkatalog mit eingeflossen.

## 2.5. Veröffentlichungen der Ergebnisse

Nachstehend folgt eine Auflistung der wissenschaftlichen Veröffentlichungen der Ergebnisse, die im Rahmen dieses Projektes erarbeitet wurden. Mit einbezogen sind auch drei Diplomarbeiten, die im Rahmen des Projektes angefertigt wurden.

Darüber hinaus erfolgte eine Reihe von populärwissenschaftlichen Beiträgen, so in den Wissenschaftsbeilagen der Berliner Zeitung, des Handelsblatts, der Süddeutschen Zeitung, in der deutschen Ausgabe des National Geographic sowie kurze Fernsehbeiträge für die Wissenschaftssendungen „nano“ und „Einsteins Erben“.

Reichert, K. und Menzel, R. (2004) . (2004) Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray. *Chemosphere* (eingereicht).

Saul, N. Reichert, K. Rödel, M. und Menzel, R. (2003) Comparison of reproduction and xenobiotically induced gene expression as ecotoxicological test parameters in the nematode *Caenorhabditis elegans*

Tix A, Optimierung und Evaluierung eines Testverfahrens mit *Caenorhabditis elegans* für Böden und Bodenmaterial (2003) Diplomarbeit an der FUB, Institut für Biologie

Saul N. (2003) Verwendbarkeit des *Caenorhabditis elegans*-Toxchips (cDNA-Microarray) in der Ökotoxikologie - Untersuchungen mit dem PAK Fluoranthen Diplomarbeit an der FUB, Institut für Biologie

Menzel, R., Reichert, K. und Achazi R. (2002) Nutzung der induzierbaren Genexpression des Nematoden *Caenorhabditis elegans* als Biomonitor. *UWSF* 14, 18-23. *14<sup>th</sup> Int. C. elegans Meeting*, Abstract book p. 195.

Menzel, R., Reichert, K. and Achazi R. (2002) Wurm-Gene als Schadstoff-Detektive. *Umwelt Magazin*. 9, 74-75

Menzel, R., Rödel, M. and Achazi, R. (2002) Xenobiotically induced Cytochrome P450 gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *European C. elegans Meeting 2002*, Abstract book p. 66.

Reichert, K., Menzel, R. and Achazi, R. (2002) Development of a bio-monitoring screening system based on the xenobiotically induced gene expression of *Caenorhabditis elegans*: The *Caenorhabditis elegans* Toxchip. *European C. elegans Meeting 2002*, Abstract book p. 80.

Rödel M: Entwicklung eines Reproduktionstestes mit *Caenorhabditis elegans* in Flüssigkultur (2002) Diplomarbeit an der FUB, Institut für Biologie.

- Menzel, R., Bogaert T. and Achazi R. (2001) A systematical gene expression screen of the *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes revealed CYP35 as strong xenobiotic inducible. *Arch. Biochem. Biophys.* 395, 158-168
- Menzel R., Reichert K. and Achazi R. (2001) Entwicklung eines *Caenorhabditis elegans* Biomonitor-Tests auf Transkriptionsebene. *SETAC-GLB, Ökotoxikologie und Ökologie in Ballungsräumen*, Tagungsband p. 63.
- Menzel, R., Bogaert T. and Achazi R. (2001) A systematical gene expression screen of the *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes. *13<sup>th</sup> Int. C. elegans Meeting*, Abstract book p. 580.

### 3. Zusammenfassung

Ziel des vorgestellten Projektes war die Entwicklung eines Biomonitor-Tests auf Transkriptionsebene mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* zur Prüfung von Arzneimittel, Bioziden und anderen Umweltchemikalien im subletalen Konzentrationsbereich. Dabei sollte geprüft werden, ob Veränderungen im Genexpressionsmuster durch die eingesetzten Testsubstanzen hervorgerufen werden und inwiefern signifikante Effektschwellen früher als in einem klassischen Biotest überschritten werden.

Für die Erfassung der schadstoffbedingten Veränderungen in den Genexpressionsmustern wurden drei molekularbiologische Testsysteme entwickelt: eine semiquantitative Single worm RT-PCR, ein transgener GFP-Reporter Nematodenstamm und ein low density DNA Array, der „Celegans Toxchip“. Die Entwicklung und Validitätsprüfung des Celegans Toxchip stand dabei im Mittelpunkt der Arbeiten. Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden für eine stärkere Aussagekraft von Reproduktionstests im Flüssigmedium und im Boden begleitet. Die Reprötests wurden optimiert und für bis zu neun verschiedene Testsubstanzen standardisiert durchgeführt. Dabei zeigte sich für alle Testsubstanzen eine Konzentrations-Effekt-Beziehung. Dadurch wird die Eignung des Nematoden *C. elegans* als ökotoxikologischer Testorganismus bestätigt.

Basierend auf gesamtgenomischen Analysen gelang erstmalig die Identifikation von 64 potenziell schadstoffinduzierbaren *C. elegans* Genen, die Amplifikation bzw. Klonierung von entsprechenden cDNA Fragmenten und deren Reinigung. Mit Hilfe dieser Fragmente und einer Reihe von Kontrollproben wurde anschließend der *C. elegans* Toxchip als ein low density DNA Array durch Bespotten von poly-L-Lysin beschichteten Glas-Slides hergestellt und unter Einbeziehung von sieben Testsubstanzen intensiv getestet. Parallel dazu wurde die Expression von vier Cytochrom P450 Genen mittels RT-PCR quantifiziert und die Fluoreszenzemission eines transgenen Nematodenstammes gemessen, welcher unter Kontrolle eines Cytochrom P450 Promotors das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimierte. Dabei folgten die Hauptexperimente immer einem einheitlichen Schema: Die Nematoden wurden in An- und Abwesenheit der jeweiligen Testsubstanz inkubiert, anschließend geerntet, (die Fluoreszenz vermessen) ihre RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die jeweilige Quantifizierung der induzierten Genexpression zeigte, dass signifikante Effekte bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen auftraten als in den herkömmlichen Reproduktionstests. Insbesondere der GFP Test und die RT-PCR Untersuchungen zeigten eine signifikante und reproduzierbare Konzentrations-Effekt Abhängigkeit. Die verwendeten Untersuchungssysteme erwiesen sich als hochempfindliche und schnell einsetzbare Biomonitor-Test und bestätigten die hohe Nützlichkeit des Faktors der schadstoffinduzierten Genexpression als funktionalen Endpunkt in ökotoxikologischen Tests.

### 3. Literaturverzeichnis

- Alzieu, C. (2000): Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology* **9**: 71-76.
- Ashour, M.B.; Moody, D.E.; Hammock, B.D. (1987): Apparent induction of microsomal carboxylesterase activities in tissues of clofibrate-fed mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **89**: 361-369.
- Bartosiewicz, M.J.; Jenkins, D.; Penn, S.; Emery, J.; Buckpitt, A. (2001): Unique gene expression patterns in liver and kidney associated with exposure to chemical toxicants. *JPET* **297**: 895-905.
- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, P., van Den Heuvel, R., Verschaeve, L., Weltens, G., Schroeters, G. (1998): Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere* **37**: 2935-2947.
- Board, P.G.; Chelvanayagam, G.; Jermiin, L.S.; Tetlow, N.; Tzeng, H.-F.; Anders, M.W.; Blackburn, A.C. (2001): Identification of novel glutathione transferases and polymorphic variants by expressed sequence tag database analysis. *Drug Metabolism and Disposition* **29**: 544-547.
- Brenner SJ (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans* *Genetics*. **77**, 71-94.
- Briggs MP (1946): Culture methods for a free-living nematode. M.A. thesis, Stanford University, Stanford, CA/USA.
- Candido, E.P.; Jones, D. (1996): Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. *Trends in Biotechnol.* **14**: 125-129.
- Coller, H.A.; Grandori, C.; Tamayo, P.; Colbert, T.; Lander, E.S.; Eisenman, R.N.; Golub, T.R. (2000): Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *PNAS* **97**: 3260-3265.
- Cressman, C. P., Williams P.L. (1997): Reference toxicants for toxicity testing using *Caenorhabditis elegans* in aquatic media. In: „Environmental Toxicology and Risk Assessment.“, Dwyer, F. J., Doane, T. R., Hinman M. L., Eds., American Society for Testing and Materials, Standard Technical Publication 1317, 6, 518-532.
- Custodia, N.; Won, S.J.; Novillo, A.; Wieland, M.; Li, C.; Callard, I.P. (2001): *Caenorhabditis elegans* as an environmental monitor using DNA microarray analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **948**: 32-42.
- David, H.E.; Dawe, A.S.; de Pomerai, D.I.; Jones, D.; Candido, E.P.M.; Daniells, C. (2002): Construction and evaluation of a transgenic hsp16-GFP-lacZ *Caenorhabditis elegans* strain for environmental monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**: 111-118.
- Debouck, C.; Goodfellow, P.N. (1999): DNA microarrays in drug discovery and development. *Nature Genetics Supplement* **21**: 48-50.

- Davies A.G.; Spike, C.A.; Shaw, J.E.; Herman, R.K. (1999): Functional Overlap between the *mec-8* Gene and Five *sym* Genes in *C. elegans* 1999 International Worm Meeting. Abstract 259
- Dhawan, R., Dusenbery, D.B., Williams, P.L. (1999): Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health* **10**: 451-62.
- Donkin, S.G. und Dusenbery, D.B. (1993): A soil toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* and an effective method of recovery. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **25**: 145-151.
- Fent, Karl (2003): Ökotoxikologie. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Finney DJ (1971): Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, England
- Freedman, J.H.; Slice, L.W.; Dixon, D.; Fire, A.; Rubin, C.S. (1993): The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans* - structural organization and inducible, cell-specific expression. *Journal of Biological Chemistry* **268**:2554-2564.
- Gerhold, D.; Lu, M.; Xu, J.; Austin, C.; Caskey, C.T.; Rushmore, T. (2001): Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays. *Physiol. Genomics* **5**: 161-170.
- Gotoh, O. (1998): Divergent structures of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes suggest the frequent loss and gain of introns during the evolution of nematodes. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1447-1459.
- Guengerich, F.P. (1995): Cytochrome P450 proteins and potential utilization in biodegradation. *Environmental Health Perspectives* **103**, Supplement 5: 25-27.
- Guengerich, F.P. (2001): Uncommon P450-catalyzed reactions. *Cur. Drug Metab.* **2**: 93-115.
- Güven, K., Duce, D. A., de Pomerai, D. I. (1994): Evaluation of a stress -inducible transgenic nematode strain for rapid aquatic toxicity testing. *Aquatic Toxicology* **29**, 119-137,
- Gunkel G. (1983). Untersuchungen zur ökotoxikologischen Wirkung eines Herbizids in einem aquatischen Modellökosystem. I Subletale und letale Effekte. *Archive für Hydrobiologie Supplement* **65**:235-267.
- Hamza-Chaffai, A.; Amiard-Triquet, C.; El Abed, A. (1997): Metallothionein-like protein: is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the tunisian coast: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**: 53-62.
- Hassanein, H.M.A.; Banhawy, M.A.; Soliman, F.M.; Abdel-Rehim, S.A.; Müller, W.E.G.; Schröder, H.C. (1999): Induction of hsp70 by the herbicide Oxyfluorfen (goal) in the egyptian Nile fish *Oreochromis niloticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **37**: 78-84
- Hill, A.A.; Hunter, C.P.; Tsung, B.T.; Tucker-Kellogg, G.; Brown, E.L. (2000): Genomic Analysis of gene expression in *C. elegans*. *Science* **290**: 809-812.

- Hitchcock, D.R., Black, M.C., Williams, P.L. (1997): Investigations into using the nematode *Caenorhabditis elegans* for municipal and industrial wastewater toxicity testing *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**: 252-260.
- Hosokawa, M.; Maki, T.; Satoh, T. (1988): Differences in the induction of carboxylesterase isozymes in rat liver microsomes by xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 2708-2711.
- Katchamart, S.; Miranda, C.L.; Henderson, M.C.; Pereira, C.B.; Buhler, D.R. (2002): Effect of xenoestrogen exposure on the expression of cythochrome P450 isoformes in rainbow trout liver. *Environ. Toxicol. Chem.* **21** (11): 2445-2451.
- King, C.D.; Rios, G.R.; Green, M.D.; Tephly, T.R. (2000): UDP-Glucuronosyltransferases. *Current Drug Metabolism* **1**: 143-161.
- Klaassen, C.D.; Liu, J.; Choudhuri, S. (1999): Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 267-294.
- Klass, M.R. (1986): Cell-Specific gene expression in the nematode. *International Review of Cytology* **102**: 1-28.
- Köhler, H.-R.; Knödler, C.; Zanger, M. (1999): Divergent kinetics of hsp70 induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B(a)P, PCB52, gamma-HCH, PCP): suitability and limits of a biomarker. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36**: 179-185.
- Kohra, S.; Tominaga, N.; Mitsui, Y.; Takao, Y.; Ishibashi, Y.; Arizono, K. (1999): Determination of a screening system of endocrine disruptors by the induction of vitellogenin mRNA in *C. elegans* larvae. *J. Health Science* **45**: 37.
- Kördel W (2001): UBA-Abschlußbericht: Verbundvorhaben – Validierung und praxisnahe Erprobung biologischer und ökotoxikologischer Tests zur Beurteilung belasteter und sanierter Böden und Substrate AZ: 15716
- Krautwurst, R. (2000): Untersuchung zur Entwicklung eines schnellen ökotoxikologischen Reproduktionstests mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin.
- Larkin, P.; Folmar, L.C.; Hemmer, M.J.; Poston, A.J.; Denslow, N.D. (2003): Expression profiling of estrogenic compounds using a sheepshead minnow cDNA macroarray. *Environmental Health Perspectives Toxicogenomics* **111**: 29-36.
- Link, C.D.; Cypser, J.R.; Johnson, C.J.; Johnson, T.E. (1999): Direct observation of stress response in *Caenorhabditis elegans* using a reporter transgene. *Cell Stress & Chaperones* **4**: 235-242.
- MacMorris, M.A.; Blumenthal, T.E. (1993): In situ analysis of *C.elegans* vitellogenin fusion gene expression in integrated transgenic strains - effects of promotor mutations on RNA localization. *Gene Expression* **3**: 27-36.

- Mentlein, R.; Rix-Matzen, H.; Heymann, E. (1988): Subcellular localization of non-specific carboxylesterases, acylcarnitine hydrolase, monoacylglycerol lipase and palmitoyl-CoA hydrolase in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **964**:319-328.
- Menzel R, Bogaert T, Achazi R (2001): A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible *Arch. Biochem. Biophys.* **395**, 158-168.
- Middendorf, P. J., Dusenbery, D. B. (1993): Fluoroacetic Acid is a potent and specific inhibitor of reproduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Worm Breeders Gazette* **13**, 88.
- Murphy, D. (2002): Gene expression studies using microarrays: principles, problems and prospects. *Advances in Physiology Education* **26**: 256-270.
- Niemann, R., Debus, R. (1996): Nematodentest zur Abschätzung der chronischen Toxizität von Bodenkontaminatonen. *UWSF* **8**: 255-260.
- Nousiainen, U.; Torronen, R.; Hanninen, O. (1984): Differential induction of various carboxylesterases by certain polycyclic aromatic hydrocarbons in the rat. *Toxicology* **32**: 243-51.
- Pemberton, K.D.; Barrett, J. (1989): The detoxification of xenobiotic compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda: Filarioidea). *International Journal for Parasitology* **19**: 875-878.
- Peredney, C.L., Williams, P.L. (2000): Utility of *Caenorhabditis elegans* for assessing heavy metal contamination in artificial soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **39**: 113-118.
- Polster M, Halacka K, (1971): Beitrag zur hygienisch-toxikologischen Problematik einiger antimikrobiell gebrauchter Organizinnverbindungen. *Ernährungsforschung* **16**:527-535.
- Power, R.S.; David, H.E.; Mutwakil, H.A. Z.; Fletcher, K.; Daniells, C.; Nowell, M.A.; Dennis, J.L.; Martinelli, A.; Wiseman, R.; Wharf, E.; De Pomerai, D.I. (1998): Stress-inucible transgenic nematodes as biomonitors of soil and water pollution. *J. Biosci.* **23**: 513-526.
- Rödel M (2002): Entwicklung eines Reproduktionstestes mit *Caenorhabditis elegans* in Flüssigkultur. Diplomarbeit an der FUB, Institut für Biologie.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, NY.
- Satoh, T.; Hosokawa, M. (1998): The mammalian carboxylesterases: from molecules to function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 257-288.
- Schuetz, E.G. (2001): Induction of cytochromes P450. *Current Drug Metabolism* **2**: 139-147.
- Sherlock, G.; Hernandez-Boussard, T.; Kasarski, A.; Binkley, G.; Matese, J.C.; Dwight, S.S.; Kaloper, M.; Wenig, S.; Jin, H.; Ball, C.A.; Eisen, M.B.; Spellman, P.T.; Brown, P.O.; Botstein, D.; Cherry, J.M. (2001): The Stanford Microarray Database. *Nucleic Acids Research* **29**: 152-155.
- Sheweita, S.A. (2000): Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Current Drug Metabolism* **1**: 107-132.



- Snyder, M.J.; Girvetz, E.; Mulder, E.P. (2001): Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **41**: 22-29.
- Spehar RL, Poucher S, Brooke LT, Hansen DJ, Champlin D, Cox DA. (1999). Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light. *Arch Environ Contam Toxicol* **37**:496-502.
- Spieth, J.; Denison, K.; Kirtland, S.K.; Cane, J.; Blumenthal, T.E. (1985): The *C. elegans* vitellogenin genes: short sequence repeats in the promoter regions and homology to the vertebrate genes. *Nucleic Acids Research* **13**: 5283-5295.
- Spike, C.A.; Shaw, J.E.; Davies, A.G.; Herman, R.K. (1999): Functional overlap between the *mec-8* gene and five *sym* genes in *C. elegans*. 12th International *C. elegans* Meeting.
- Sueyoshi, T.; Negishi, M. (2001): Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 123-143.
- Suzuki, T.; Nishio, K.; Tanabe, S. (2001): The MRP family and anticancer drug metabolism. *Current Drug Metabolism* **2**: 367-377.
- Thakurta, D.G.; Palomar, L.; Stormo, G.D.; Tedesco, P.; Johnson, T.E.; Walker, D.W.; Lithgow, G.; Kim, S.; Link, C.D. (2002): Identification of a novel cis-regulatory element involved in the heat shock response in *Caenorhabditis elegans* using microarray gene expression and computational methods. *Genome Research* **12**: 701-712.
- Tix A. (2003), Optimierung und Evaluierung eines Testverfahrens mit *Caenorhabditis elegans* für Böden und Bodenmaterial Diplomarbeit an der FUB, Institut für Biologie
- Traunspurger W., Steinberg C., Bongers, T. (1995) Nematoden in der ökotoxikologischen Forschung. *UWSF*. **7**: 74-83.
- Traunspurger W. et al. (1996): Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda) – a method for testing liquid medium and whole-sediment samples. *Env. Tox. Chem.* **16**: 245-250.
- Tukey, R.H.; Strassburg, C.P. (2000): Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**: 581-616.
- Vanfleteren, J. R., Avau, H. (1977): Selective inhibition of reproduction in aminopterin-treated nematodes. *Experientia* **33**, 902-904,
- Vondracek, M.; Weaver, D.A.; Sarang, Z.; Hedberg, J.J.; Willey, J.C.; Wäringård, L.; Grafström, R.C. (2002): Transcript profiling of enzymes involved in detoxification of xenobiotic and reactive oxygen in human normal and simian virus 40 t antigen-immortalized oral keratinocytes. *Int. J. Cancer* **99**: 776-782.
- Wang, J. C., Yamamoto, K.R. (2001) Isolation of genes involved in the regulation of sterol metabolism. International Worm Meeting abstract 944,
- Williams PL, Dusenbery DB (1988): Using the nematode *Caenorhabditis elegans* to predict mammalian acute lethality to metallic salts. *Toxicol Industrial Health* **4**, 469-78.

- Williams, P. L., Dusenbery, D. B. (1990): A promising indicator of neurobehavioral toxicity using the nematode *Caenorhabditis elegans* and computer tracking. *Toxicology and Industrial Health* **6**, 425-440.
- Xu, W.; Bak, S.; Decker, A.; Paquette, S.M.; Feyereisen, R.; Galbraith, D.W. (2001): Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **272**: 61-74.
- Yochem, J.J.; Kari, C.K.; Cygnar, K.; Shaw, J.E.; Herman, R.K. (2000): Genetic analysis of gene redundancy. Midwest Worm Meeting Abstract 104.
- Zhang, D.; Yang, Y.; Leakey, J.E.A.; Cerniglia, C.E. (1996): Phase 1 and phase 2 enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. *FEMS Microbiology Letters* **138**: 221-226.

## 5. Anhang

ß-Naphtoflavon											
Konz.	5 mg/l				1 mg/l				0.2 mg/l		
GenID	1	2	3	9	4	5	6	9	7	8	9
1	6.6808	0.862	19.5097	0.0699	0.534	0.8875	0.1091	0.0407		0.3223	0.0344
1	4.846	0.873	18.9165	0.0721	0.7545	0.894	0.11	0.0454		0.3	0.0347
1	4.4206	0.8898	19.0793	0.0745	0.6559	0.9506	0.1514	0.0436		0.3225	0.0402
1	2.8459	1.3487	17.498	0.0762	0.4526	0.9514	0.1691	0.0377		0.3305	0.0381
2		1.385		0.8252	0.7656	1.1808	0.0863	0.2158	0.4883	0.6565	0.0822
2		1.3301		0.9625	0.868	1.2031	0.0919	0.1763	0.1259	0.7011	0.0668
2	118.1572	1.3444	11.9462	1.1613	0.8778	1.06	0.0926	0.1519	0.1128	0.8049	0.075
2	31.9152	1.4878	8.4163	1.3273	0.7605	1.1729	0.1205	0.1586	0.1835	1.1665	0.0843
4	39.7137	9.1549		0.4418	0.4852	1.1593	0.2116	0.1101	0.5876	0.2346	0.0301
4	28.7028	9.4604		0.4674	0.3236	1.2819	0.2066	0.0993	0.4742	0.2906	0.0285
4	26.4964	19.9588	15.8042	0.5543	0.6477	1.0821	0.2861	0.0944	0.4708	0.3223	0.0304
4	25.7963	9.2323	13.3386	0.8001	0.6691	1.1096	0.3186	0.0998	0.5274	0.4067	0.0364
5	0.9963	0.8457	4.3193	0.2044	0.6984	0.8917	0.3817	0.0277	0.3379	0.7203	0.0258
5	0.9149	0.8159	4.3064	0.2054	0.5941	1.9164	0.2541	0.0237	0.2965	0.6708	0.0218
5	0.9783	0.8111	4.0402	0.2157	0.9442	0.9033	0.1932	0.0323	0.2588	0.6384	0.0207
5	1.1638	0.9046	3.4999	0.2199	0.6944	0.8142	0.2297	0.0473	0.2685	0.619	0.023
7	97.371	8.935	42.7451	1.207	1.644	0.9581	0.1718	0.0272	4.3542	0.5676	0.0158
7	99.9472	6.4489	39.1756	1.2607	1.9669	0.9232	0.2429	0.0245	7.5036	0.4279	0.0173
7	63.864	8.0227	40.9016	1.1341	1.6362	0.8793	0.2568	0.0299	4.0145	0.5062	0.0209
7	59.8472	7.071	39.4074	1.1562	1.8543	0.9694	0.2714		6.7088	0.5395	0.0202
8	265.0673	28.1938	115.6203	11.655	5.9681	0.935	0.1819	0.3058	7.62	0.6031	0.0616
8	362.8882	29.1864	110.4972	7.2015	5.0917	1.085	0.2125	0.3059	6.6995	0.6265	0.0481
8	191.2575	27.1931	121.9758	9.0888	3.9431	0.8461	0.3475	0.2897	5.4997	0.729	0.0744
8	199.733	34.114	126.8325	14.1657	7.4506	0.9091	0.2814	0.2621	6.0652	0.9382	0.05
9	388.428	47.0636	78.1311	9.8878	2.8266	0.9905	0.5556	0.3055	16.7134	0.5352	0.03
9	357.0864	47.037	101.7648	2.0741	2.4515	0.9783	0.4212	0.3366	13.5363	0.522	0.0306
9	239.4967	43.1353	98.2423	2.3257	2.5104	1.0126	0.4229	0.4157	12.9935	0.5235	0.0275
9	469.3762	46.2952	121.9046	15.82	3.6194	1.0345	0.5208	0.3703	14.4618	0.675	0.0307
10	6.5561	26.46	40.546	1.4649	0.7315	1.0703	0.3368	0.0368	7.6339	0.3556	0.0228
10	7.7974		42.2207	1.5283	0.642	1.0993	0.2846	0.0437	7.3672	0.3499	0.0191
10	6.3912	25.3974	39.4013	1.547	0.5577	0.9708	0.2616	0.0351	4.7907	0.3101	0.0188
10	7.4298	22.6127	36.4762	1.8005	0.6875	1.0184	0.2272	0.026	5.7957	0.2967	0.0201
11	5.5279	5.9291		0.6737		0.7333				0.3714	
11	5.0179	6.3849		0.3156		0.8304				0.3473	
11	5.213	4.6901		0.2797		0.7573				0.3599	
11	2.5386	3.6084		0.2685		0.8605	0.3192			0.3484	0.1175
12	0.9259	1.9042	10.0085	0.0702		0.5732	0.1394	0.0217	0.0706	0.2401	0.0188
12	0.8361	1.7718	11.0853	0.1014		0.5797	0.1313	0.0572		0.2238	0.0188
12	0.9826	1.8164	9.1319	0.1004		0.6243	0.4252	0.0487		0.2164	0.0174
12	0.9612	1.893	7.4547	0.1861		0.7138	0.4289	0.0498		0.2586	0.0201
13	16.4391	6.6943	8.1261	0.4332	1.7007	1.0715	0.6138	0.1051	0.7496	1.3119	0.2552
13	17.3356	8.6429	7.3183	2.4153	1.9591	1.0429	0.5894	0.1354	0.7423	1.447	0.4497
13	17.1464	6.5683	6.7331	2.3698	1.6243	1.029	0.6375	0.1916	0.7784	1.5691	0.2065
13	16.5957	6.2458	6.1554	3.0331	1.5333	1.0174	0.6808	0.1067	0.7836	1.2962	0.2721
14	0.1453	1.7123	4.6871	0.224	1.1512	0.8905	0.9526	0.0759	3.9274	0.4837	0.0252
14	0.0942	1.6856	5.0382	0.2292	0.8814	0.7115	0.9497	0.0724	4.4965	0.4618	0.0283
14	0.1015	1.6957	4.7724	0.2473	0.7023	0.6802	0.3745	0.0603	3.9876	0.4806	0.0286
14	0.0979	1.6327	4.4034	0.2735	0.7905	0.6794	0.2883	0.064	4.9321	0.4972	0.0279
15	3.0549	4.3895			0.661	1.266	3.0137		0.0972		
15	3.9673				0.813	2.1212	0.921	0.3012	0.2865		0.416
15	2.7805			0.1093	0.4375	1.6064	1.8823		0.3252		
15	3.0195			0.1715	0.5193	1.6344	1.1211		0.3396		
16		48.0575	241.2844	2.1005	12.0717	0.533	0.3076	0.0439		0.7329	0.0125

16		61.154	229.2914	2.4697	10.7471	0.5288	0.1967	0.0467		0.6253	0.0118
16		53.2887	238.6746	2.4986	9.1452	0.6122	0.1925	0.0425		0.4843	0.0083
16	1972.2812	51.2304		3.4248	3.9599	0.3791	0.2446	0.0374		0.4565	0.011
17	1.4065	0.6406	1.3196		1.2812	0.9841	1.3076	0.0785	0.1989	1.0139	0.7285
17	1.4357	0.6161	1.4322		1.3205	1.0231	0.9985	0.0854	0.1998	1.0228	0.7394
17	1.4234	0.6402	1.4096		1.3291	0.9736	0.9752	0.1231	0.2055	1.0017	2.2544
17	1.3692	0.6177	1.536	6.0252	1.1394	1.0163	1.044	0.1066	0.2013	1.0132	0.6375
18	2.9143	0.1765		0.6749	0.7462	0.6177	0.3144		0.3421	0.6179	0.0803
18	3.212	1.5099		0.5302	0.8663	0.8083	0.5525		0.2304	0.6591	0.0862
18	2.8687	1.358		0.7776	0.8127	0.5899	0.4998		0.2675	0.7084	0.0587
18	2.7678	0.7167	3.9921	0.7295	0.8436	0.8832	0.4931			0.6206	0.065
19	9.6147	6.8802	12.5596	1.7527	0.5315	0.8402	0.5462	0.236	2.2933	0.6269	0.0664
19	10.6811	4.9996	14.2678	1.8763	0.4565	0.8433	0.4163	0.1713	3.1143	0.5914	0.0628
19	10.0299	4.5021	17.7295	1.7526	0.6075	0.7958	0.423	0.1556	4.0533	0.6421	0.059
19	9.7691	4.4488	19.0856	1.6624	0.7631	0.8474	0.6523	0.181	2.942	0.6361	0.0633
20	2.0391	1.6988		0.4437	0.9366	0.7757	1.0345	0.896	0.2379	2.7218	
20	1.9839	1.7304		0.4871	0.9794	0.8447	1.0921	0.9756	0.2563	3.495	
20	1.9376	1.9105		0.5241	0.938	0.8498	0.9722	0.9976	0.2136	2.785	1.0944
20	1.8703	2.1536	0.34	0.4546	1.0195	0.738	0.996	0.9659	0.2449	2.5396	1.618
21	4.0518	0.6378	9.3877	0.1038	0.4405	0.6938	0.3239	0.0391	0.2715	0.317	0.0335
21	3.8591	0.64	8.804	0.0954	0.4161	0.6735	0.2871	0.0355	0.1758	0.2973	0.0288
21	4.0034	0.5838	9.5152	0.0953	0.4952	0.8273	0.31	0.0348		0.3368	0.0297
21	4.0753	0.5945	9.1402	0.1155	0.6401	0.7367	0.3148	0.0295		0.3209	0.0296
22	2.0554	0.907	1.7227	0.1495	0.9332	0.8829	1.2752	2.5736	0.1454	1.1986	1.0259
22	2.0559	0.8923	1.6636	0.3829	0.8812	0.8403	1.241	2.5778	0.3402	1.8891	1.2304
22	2.055	0.9417	1.8454	0.2993	1.0175	0.8854	1.3052	2.1931	0.3503	1.8688	1.3808
22	2.0398	0.9099	1.669	0.3637	0.9927	0.803	1.1707	1.8426	0.3454	2.0238	1.7242
23	0.1335	0.6354	4.122	0.0806	0.9037	0.5722	0.6396	0.0142	1.397	0.3415	0.0183
23	0.1241	0.723	4.27	0.0771	0.5388	0.5888	1.6436	0.0139	1.3024	0.2239	0.0222
23	0.1418	0.6557	4.4595	0.0732	0.4319	0.5601	5.1686	0.0133	0.8871	0.3227	0.0198
23	0.1751	0.6457	4.8559	0.0706	0.5256	0.5353	1.482	0.0125	1.5117	0.2675	0.0219
24	2.0946	1.0458	1.6778	0.693	0.723	1.0055	1.5116	0.0639	0.56	1.2058	0.1378
24	2.0867	1.0579	1.6897	0.7302	1.1944	0.7411	1.4661	0.0637	0.5615	1.175	0.1137
24	2.0718	1.0444	1.8266	0.7567	0.9626	0.835	1.3468	0.0794	0.5477	1.2016	0.2209
24	1.9754	1.0643	1.7404	0.7943	0.7911	0.8485	1.4354	0.0764	0.5701	1.2307	0.1827
25	1.3047	1.4855	2.2027	0.3386	0.9674	0.8521	0.5342	0.0246	1.0098	0.6425	0.0435
25	1.4527	1.45	2.2729	0.3691	0.9735	0.8671	0.4971	0.0251	0.9597	0.6312	0.0525
25	1.3255	1.4436	2.3371	0.3677	1.0687	0.885	0.4898	0.0215	0.916	0.6454	0.0424
25	1.409	1.5437	2.4231	0.3978	0.9757	0.8823	0.608	0.021	0.9189	0.6781	0.0347
26	4.2248	4.0066		0.0881	0.5337	0.9965	0.8094		0.4196	2.6293	
26	18.7751	6.8231		0.1065	0.5108	1.039	0.6777	0.0138	0.4469		
26	16.2321	10.6272	9.2451	0.1018	0.5074	1.0225	0.7415		0.4356		
26	32.7346	12.5559	7.7993	0.0958	0.4796	0.9616	0.6429		0.3957		0.0636
27	4.9908	1.1012	9.0919	0.6479	0.9295	0.922	0.6233	0.1331	0.1904	0.6261	0.0873
27	4.9966	0.8731	8.8251	0.6202	1.2776	0.91	0.721	0.1324	0.1406	0.6693	0.0903
27	4.6203	1.0033	7.7696	0.6232	1.1686	0.9556	1.0262	0.1301	0.1649	0.6494	0.1008
27	5.2574	0.9013	7.8763	0.6544	1.0528	0.9432	0.7908	0.1374	0.1907	0.7168	0.1017
28		43.846		1.2456	0.6144	0.7312	0.0649	0.1223	2.1109	0.1949	0.0133
28		49.0758		1.4956	0.5291	0.7915	0.0681	0.1192	2.3855	0.1713	0.0134
28		37.0212		1.7084	0.659	0.9778	0.0665	0.0938	2.1283	0.2189	0.0124
28		43.8338		1.9312	0.4985	0.9072	0.0881	0.083	2.8175	0.2395	0.0126
29	6.8981	2.6203	9.1848	0.5955	0.7635	0.981	0.4249	0.0467	0.5794	0.36	0.0695
29	9.6112	2.6339	8.6166	0.6276	0.6215	0.9133	0.342	0.0472	0.5206	0.3616	0.0794
29	10.5281	0.7592	8.0404	0.7319	0.6829	0.8797	0.2561	0.0485	0.4634	0.4428	0.0671
29	10.7372	2.2388	7.3431	0.8317	0.6429	1.0285	0.3891	0.055	0.5265	0.5767	0.0617
30	286.7115	41.1024		5.3958	0.493	0.4616		0.0611	7.7795	0.2471	0.0172
30	244.6555	39.9201		5.2262	0.455	0.6851		0.0647	6.9933	0.2104	0.0145
30	270.0386	40.8983		5.4929	0.4819	0.4051		0.067	7.0416	0.2212	0.0153
30	341.3129	45.51		6.6741	0.6327	0.4386	0.0357	0.0786	7.0815	0.1716	0.016
31	8.4892	0.2189	2.0109	2.0178	1.0283	0.8264	0.621	0.3141	0.1344	1.0747	0.2454

31	8.5361	0.2188	2.1006	1.9174	0.8121	0.836	0.5979	0.2422	0.1419	1.0933	0.2511
31	8.6011	0.2136	2.1091	1.7333	0.7914	0.8579	0.6156	0.2466	0.1339	1.1021	0.2789
31	9.1228	0.2132	2.0957	1.6356	0.8421	0.8508	0.5889	0.2434	0.1348	1.1197	0.2329
32	5.2794	1.9821	6.9591	0.6331	0.6604	0.8492	0.5718	0.0477	0.6238	0.3854	0.0425
32	5.1933	1.9924	6.9246	0.7048	0.6465	0.8523	0.5549	0.0403	0.5149	0.3796	0.0384
32	4.9051	1.9931	6.8525	0.7445	1.0157	0.8133	0.5664	0.0447	0.5222	0.368	0.0393
32	4.7833	2.0026	6.6406	0.9119	0.7089	0.7849	0.6629	0.0476	0.6373	0.415	0.0361
33	0.9938	1.0027	1.0091	1.2333	1.0069	0.9795	1.3754	1.0321	0.5978	1.0066	1.0227
33	1.0043	1.0013	1.0094	0.9262	0.9485	0.9969	1.3888	0.9737	0.6043	0.992	0.9849
33	1.0015	1.0006	1.0086	0.9547	0.9884	1.0206	1.4602	0.9977	0.5906	1.0087	1.0084
33	1.0004	0.9951	0.9796	0.9489	1.0624	1.0103	1.418	0.9912	0.6095	0.9918	0.9885
34	1.7616			0.1097	0.3148	1.1719	0.3211	0.0377	0.2384	0.557	0.0251
34	1.6062			0.1153	0.2051	1.1192	0.2887	0.0314	0.2018	0.6008	0.0247
34	2.0711			0.1392	0.1562	1.1873	0.2378	0.0301	0.1638	0.5978	0.0217
34	1.9491			0.1562	0.1292	1.1328	0.1873	0.0298	0.2162	0.5815	0.0253
35	4.443	2.4154	5.57	0.2009	0.2376	0.9079	0.8706	0.0581	0.2279	0.1813	0.0256
35	4.135	2.4044	5.5872	0.2016	0.224	0.9526	0.9235	0.0587	0.1633	0.1868	0.0269
35	4.5727	2.0656	5.8695	0.1208	0.2456	0.9086	1.027	0.0343	0.1843	0.2114	0.0268
35	4.2478	2.0239	5.6929	0.1607	0.2673	0.8907	0.7431	0.0321	0.1952	0.265	0.0262
36	4.4201	5.4898	4.46	0.2749	1.138	1.1211	0.4005		0.3839		
36	4.5218	6.6393	4.1022	0.2894	1.5649	1.0625	0.4344		0.4696		
36	4.1389	7.3223	4.5927	0.3312	1.3079	1.0038	0.4513		0.4184		
36	4.0356	5.6025	4.4498	0.3554	1.2191	1.0344	0.4482		0.4017	2.7878	
37	1.915	1.2631	1.2691	1.1587	0.9524	0.854	0.967	0.4125	0.2623	1.0807	0.559
37	1.9511	1.2725	1.2836	1.1365	0.9439	0.8686	0.9638	0.5047	0.2702	1.0996	0.5726
37	1.9777	1.2824	1.2982	1.1302	0.9253	0.8551	0.9644	0.4912	0.2701	1.0625	0.5291
37	1.8948	1.275	1.327	1.119	0.952	0.8648	1.011	0.4825	0.2668	1.0708	0.5097
38	16.8435	0.4698		0.6829	0.8252	0.8302	0.3201	0.4366	0.2851	0.8281	0.4351
38	16.6519	0.5057	4.4565	0.6256	0.9026	0.7615	0.3867	0.4598	0.2603	0.8405	0.236
38	10.3333	0.4613	4.9125	0.6531	0.8078	0.7645	0.2689	0.4693	0.381	0.7579	0.193
38	6.6466	0.4653	3.5695	0.7152	1.0125	0.8641	0.2344	1.2671	0.2704	0.8558	0.1649
39	6.7888	1.3085	1.4848	0.1736	0.3702	0.9001	0.8635	0.0394	0.343	0.5894	0.0401
39	7.0532	1.566	1.7121	0.1925	0.8904	2.1687	0.9642	0.0336	0.3869	0.5624	0.0467
39	5.954	1.1953	1.7359	0.1934	1.1159	1.4441	0.6818	0.0228	0.2661	0.5673	0.0487
39	5.9441	1.6868	1.0136	0.2114	0.8722	1.8771	0.5765	0.0249	0.1493	0.6575	0.0587
41	0.3425	0.586	2.8144	0.6296	0.4958	0.7342	1.0963	0.09	0.3069	0.644	0.2046
41	0.4211	0.604	2.5777	0.6617	0.8587	0.7218	1.1455	0.1069	0.2993	0.6572	0.2182
41	0.3855	0.5997	2.442	0.6228	0.641	0.8194	1.1201	0.0906	0.3015	0.5779	0.2144
41	0.3283	0.6195	2.6185	0.6233	0.8397	0.8294	1.2995	0.0899	0.3818	0.7292	0.245
42	0.5653	2.852	0.9541	0.4139	0.7345	1.2429	1.5285		1.3847	1.0641	
42	0.4584	2.271	0.9649	0.4609	1.7484	1.1041	1.5215		1.19	1.0513	
42	0.5294	3.8352	1.0067	0.4779	0.8889	1.1962	1.4328		1.2641	0.9617	
42	0.4955	4.0426	1.0916	0.4505	1.1768	1.2925	1.3419		1.1444	1.1435	
43	2.2024	0.9668	8.1182	0.29	0.2021	0.6556	0.2906	0.032	0.0234	0.4591	0.1489
43	1.7537	0.9528	8.5095	0.3123	0.233	0.907	0.3743	0.0333	0.023	0.4928	0.1517
43	1.6114	0.9498	8.4012	0.3147	0.229	0.6047	0.3481	0.0283	0.0206	0.5471	0.1325
43	2.477	1.0257	8.5758	0.3351	0.2783	0.4421	0.3273	0.0294	0.0195	0.5006	0.123
44	2.33		8.7427	0.1598	0.7316	1.0572	0.399	0.048		0.4632	0.0507
44	2.8201		11.5041	0.1596	0.8148	1.1082	0.5376	0.0496		0.4875	0.0463
44	2.2573			0.1649	0.765	1.0125	0.5689	0.0383		0.6097	0.0387
44	2.4209		10.7385	0.1512	0.5298	0.8792	3.1651	0.035		0.5814	0.0484
45	24.7122	0.8328	2.44	0.878	2.1648	0.8837	1.1057	0.9975	2.5895	1.7595	0.3985
45	24.9984	0.8167	2.4565	0.8727	2.2033	0.844	1.0701	0.9774	2.6999	1.7296	0.3863
45	22.0994	0.8105	2.4776	0.8435	2.2629	0.8494	1.099	0.9883	2.919	1.7374	0.3795
45	20.1191	0.8203	2.484	0.844	2.17	0.8352	1.0883	0.9344	2.9912	1.6645	0.3658
46	3.2304	1.2805	1.7745	0.2542	0.8653	1.0421	0.4696	0.1126	0.2913	0.4547	0.0728
46	2.7281	0.992	1.7203	0.2375	1.2104	1.1549	0.4162	0.1119	0.2431	0.5781	0.0579
46	2.7773	0.9551	1.6111	0.3036	0.6758	0.9728	0.6733	0.1063	0.2578	0.5679	0.0529
46	2.2902	1.455	1.508	0.3891	1.4761	0.988	0.8144	0.1304	0.2394	0.5845	0.0517
47		1.5309	0.9674	0.8533	1.14	1.0347	2.8207		0.6374	1.0763	

47		1.4715	0.9932	0.8925	1.1016	1.0285	3.177		0.6658	1.0778	
47		1.5137	1.0258	0.8178	1.059	0.9811	3.0176		0.698	1.1625	
47		1.4633	1.0822	0.8757	1.1577	1.7256	3.0343		0.6585	1.1206	
49	1.1495	1.8522	1.4606	1.0766	0.8836	0.8509	1.1796	0.7667	0.4329	0.889	0.8497
49	1.4746	1.8344	1.4285	1.0978	0.8761	0.8262	1.3561	0.8643	0.4785	0.8777	0.8154
49	1.4982	1.8244	1.455	1.1123	0.872	0.841	1.4295	0.9016	0.4236	0.8941	0.8103
49	1.4977	1.8475	1.4867	1.1293	0.9988	0.8463	1.011	0.7483	0.5204	0.8911	0.8237
50	1.9359	1.0294	3.4388	0.5611	1.3652	0.9626	0.3293	0.2765	0.3407	0.4346	0.1436
50	1.8795	1.0423	3.6065	0.5936	1.1346	1.0322	0.4133	0.296	0.3648	0.4287	0.1462
50	1.9564	1.0633	3.456	0.6115	0.9969	1.0838	0.6266	0.3672	0.3272	0.4872	0.1877
50	1.9117	1.0074	2.7953	0.7261	1.182	1.0169	0.8177	0.2942	0.49	0.5619	0.1907
51	1.6435	0.468	3.2181	0.3938	0.9524	0.8387	0.6409	0.1075	0.1665	0.8862	0.1328
51	1.6852	0.4973	2.9044	0.4313	0.757	0.8552	0.4751	0.1019	0.1272	0.8325	0.1135
51	1.7295	0.4927	2.6862	0.4586	0.7105	0.853	0.5228	0.1046	0.1583	0.8345	0.0897
51	1.6455	0.4747	2.2162	0.5243	0.8988	0.8158	0.5537	0.1032	0.1553	0.8032	0.1057
52	5.0993	0.7704	4.3996	0.6692	0.7371	0.9175	0.6464	0.2214	0.0727	0.7758	0.1763
52	4.5693	0.7751	4.604	0.7364	0.6981	0.8007	0.6167	0.2183	0.0695	0.7914	0.2025
52	5.1558	0.7812	4.2954	0.7709	0.6578	0.8359	0.6208	0.1387	0.0697	0.7608	0.1905
52	5.4975	0.7895	4.0622	0.8371	0.6663	0.7769	0.668	0.1513	0.0692	0.802	0.1465
53	3.223		4.2106	0.9119	0.7984	0.987	0.3783	1.504	0.2195		
53	2.7979		4.2351	1.1473	1.1515	1.0217	0.4462	1.0914	0.141		
53	3.3541		3.7588	0.3519	1.3655	0.9167	0.4189	2.038	0.3599		
53	3.5442		3.8772	0.5006	1.0408	0.9565	0.3404	2.8555	0.3291		
54	2.5816	0.851	3.0495	0.4489	0.762	0.7891	0.5592	0.1651	0.4367	0.5301	0.1286
54	2.4981	0.835	2.5818	0.4916	0.8808	0.8293	0.5572	0.1451	0.3931	0.4892	0.1354
54	2.4731	0.851	2.7068	0.4932	0.8869	0.797	0.6258	0.1755	0.4629	0.4842	0.1433
54	2.4826	0.8215	2.7251	0.5241	0.8253	0.8255	0.6398	0.1582	0.4448	0.5074	0.1347
55	0.462	0.7148	1.2257	0.7861	0.8344	0.8572	1.1814	0.3163	0.6499	1.0066	0.2718
55	0.4957	0.7187	1.2493	0.8008	0.8383	0.8836	1.2906	0.3446	0.6598	1.0043	0.2597
55	0.4917	0.7243	1.1999	0.8089	0.856	0.8824	1.2248	0.3054	0.6851	0.9906	0.266
55	0.5119	0.7521	1.1922	0.8107	0.8717	0.8916	1.2461	0.2526	0.6982	0.9918	0.254
56	9.349	1.8541	2.4397	0.7387	3.0361	0.6825	0.9582	0.2233	4.5143	2.0546	0.085
56	15.0335	1.7735	2.5009	0.7409	4.6514	0.6244	0.6399	0.2861	8.4872	2.0864	0.0926
56	11.9817	1.803	2.3974	0.7643	4.3046	0.698	0.5779	0.2278	9.1148	2.1178	0.0833
56	14.0726	1.824	2.424	0.7342	4.8324	0.6647	0.4584	0.2319	5.8771	2.1301	0.0929
57	21.8313	1.3626	3.2692	0.6212	2.2023	0.7812	0.6433	0.7591	12.2733	1.4138	0.2138
57	20.7028	1.3804	3.2454	0.3234	1.977	0.797	0.6295	0.7324	10.458	1.4278	0.2084
57	21.2684	1.3649	3.3323	0.6407	1.9004	0.7797	0.726	0.7557	12.1894	1.4356	0.2134
57	20.7294	1.3653	3.4959	0.6211	1.6786	0.7761	0.7294	0.7295	12.845	1.3884	0.2022
58	0.2561	0.9264	6.0354	0.1138	0.8625	0.739	0.0854	0.0372	0.2136	0.2796	0.0177
58	0.2538	0.8928	6.2366	0.1475	0.8531	0.7152	0.0602	0.0277	0.2121	0.3263	0.0164
58	0.2295	0.9224	5.7111	0.1886	0.9152	0.994	0.0813	0.031	0.2303	0.3535	0.0199
58	0.2508	0.9178	4.8374	0.2664	1.1694	0.9527	0.2891	0.0366	0.155	0.4196	0.0174
60	27.7462	0.8288	2.3347	0.8689	2.5687	0.8852	1.1115	0.9761	3.7758	1.7632	0.382
60	35.6013	0.8402	2.3086	0.8484	2.286	0.8937	1.1387	0.9555	2.7794	1.7694	0.3806
60	40.1649	0.835	2.3919	0.8996	2.3099	0.8436	1.3885	0.9787	2.8027	1.748	0.365
60	15.9431	0.8351	2.3958	0.8622	2.2336	0.8821	1.2125	0.9828	2.7438	1.6967	0.3781
61	1.1081	2.438	0.9522	0.5436	1.0473	0.7722	1.4041	0.0295	1.4092	1.0126	0.0511
61	1.118	2.5123	0.9375	0.6394	1.0809	1.0754	1.3792	0.0511	1.714	0.9345	0.053
61	1.0286	2.5117	0.8141	0.6454	1.0108	0.8661	1.6139	0.0506	1.6325	1.0156	0.053
61	1.0574	2.5222	0.7915	0.7081	1.0429	0.7931	1.3362	0.0318	1.4902	0.938	0.0612
62	0.9126	1.1913	2.3054	0.7132	1.1816	0.9061	2.0128	0.2384	0.2698	0.6815	0.2145
62	0.9139	1.1994	2.083	0.6719	1.129	0.8951	1.7582	0.2505	0.7013	0.5993	0.2297
62	0.8921	1.121	2.28	0.6135	1.2522	0.8807	1.9497	0.2575	0.5818	0.597	0.2017
62	0.9229	1.1346	2.1083	0.5928	0.8534	0.8624	1.77	0.2598	0.5274	0.6562	0.1919
63	1.2314	1.3842	1.3305	0.7241	1.3551	0.9813	1.0586	0.5272	0.7155	1.1455	0.3863
63	1.2168	1.3984	1.3489	0.7305	1.3043	1.1628	1.0321	0.5547	0.9825	1.1828	0.4174
63	1.236	1.3724	1.3249	0.7387	1.4094	0.9585	0.9969	0.5663	0.7311	1.1471	0.4306
63	1.2483	1.4147	1.3438	0.7712	1.3854	0.9655	1.0972	0.5624	0.7527	1.1564	0.4606
64	0.9645	0.409	2.7711	0.2149	0.6803	0.812	0.2732	0.1042	0.3876	0.7036	0.0533

64	0.9345	0.3843	1.8881	0.2112	0.7903	0.8951	0.1788	0.1091	0.3749	0.6287	0.0432
64	0.938	0.4021	2.4064	0.2704	1.0778	0.774	0.179	0.133	0.3286	0.5899	0.0418
64	0.99	0.4166	2.1359	0.2975	0.9896	0.7281	0.1921	0.1535	0.3531	0.584	0.0449
65	2.3487	1.4699	3.5345	0.875	1.3921	0.9874	0.9415	0.5047	0.4637	0.9521	0.2882
65	2.2997	1.4265	3.637	0.9885	1.4444	1.0417	0.8935	0.4173	0.4372	0.9409	0.2391
65	2.2679	1.3711	2.9408	1.0006	1.3412	0.9532	1.0896	0.3861	0.4124	0.9771	0.1787
65	2.3573	1.3936	2.5106	1.078	1.4322	0.969	0.948	0.3495	0.4613	0.9617	0.1743
66	4.1266	0.7362	2.2531	0.7805	0.6383	0.9668	0.7126	0.5615	0.2138		0.5228
66	4.1185	0.7278	2.216	0.779	0.6713	0.9742	0.6397	0.5493	0.224		0.507
66	4.1199	0.7232	2.2548	0.6335	0.7054	0.978	0.6073	0.4866	0.24		0.5092
66	4.0901	0.721	2.2713	0.6808	0.715	0.991	0.6658	0.5251	0.2545		0.467
69	3.2742	3.4092	5.3822	0.5441	0.788	0.533	0.2366	0.1448	0.1671	0.3043	0.1297
69	3.2392	3.2899	5.4873	0.563	0.8337	0.5097	0.2717	0.1723	0.1601	0.2906	0.1244
69	3.1146	2.9927	5.3452	0.6108	0.7137	0.5363	0.3058	0.2178	0.1525	0.2894	0.161
69	3.3046	3.7663	5.2818	0.5996	0.822	0.6044	0.3428	0.2144	0.1574	0.3356	0.1434
70	2.3772	1.2066	5.0552	0.1851	0.7304	0.7925	0.6041	0.0232	0.5466	0.4505	0.0231
70	2.4568	1.2641	4.837	0.173	0.6978	0.8463		0.025	0.5095	0.4624	0.0215
70	2.5085	1.1949	4.9038	0.1689	0.7297	0.7723	0.6684	0.024	0.534	0.537	0.0217
70	2.4024	1.1539	6.2233	0.2121	0.7915	0.784	0.6581	0.0212	0.516	0.4858	0.0229
71											0.0396
71											
71											
71											
14-0	0.1958	1.8608	2.5359	0.5249	2.5075	0.8897	1.9214		6.8771	1.934	
14-0	0.1858	1.7903	2.5933	0.6882	2.5489	0.9019	1.9905		7.1257	2.8486	
14-0	0.196	1.7751	2.272	0.4727	2.9892	0.7705	2.3709		10.6734	2.5472	
14-0	0.2186	1.7844	2.7013	0.9703	2.8303	0.8144	1.3025	0.031	8.2477	2.4024	
14-1	0.1078	1.7671	2.4918	0.5428	2.6789	0.9729	1.7581	0.0379	13.1791	1.6556	
14-1	0.1187	1.7763	2.491	0.6218	2.5823	0.8415	2.0076	0.0257		2.2829	
14-1	0.1093	1.7413	2.6699	0.5104	2.0956	1.0084	1.043	0.0361		1.9706	
14-1	0.115	1.7304	2.7752	0.5239	1.7946	0.766	1.4928			1.3746	
14-2	0.2062	1.7153	3.2972	0.125	1.4207	0.857	1.4603	0.0525	2.4985	0.7004	0.0351
14-2	0.2291	1.7315	3.7285	0.5396	1.9017	0.8351	1.0337	0.0389	1.1991	0.737	0.0391
14-2	0.2422	1.7665	3.6324	0.4866	1.6181	0.8061	1.0618	0.052	1.7245	0.699	0.0512
14-2	0.2546	1.7234	3.3132	0.5483	1.4885	0.8558	1.0468	0.0521	1.6867	0.7481	0.0445
14-4	0.2181	1.659	3.6921	0.7225	1.166	0.8296	2.8004	0.0769	1.1493	0.6285	0.0257
14-4	0.2237	1.6286	3.9561	0.5719	0.9996	0.7523	2.9881	0.073	0.7212	0.5127	0.0278
14-4	0.2187	1.6314	3.9484	0.4208	0.8856	0.7565	2.2867	0.0792	0.8627	0.5534	0.0218
14-4	0.21	1.6551	3.7819	0.3724	0.9152	0.7547	2.2629	0.0666	0.9642	0.588	0.0261
56-0	18.8319	1.9051	2.4303	0.8918	3.9338	0.6746			19.8169	2.0409	0.0472
56-0	17.3955	1.8734	2.37	0.812	4.0431	0.6456			18.7128	2.0683	0.0544
56-0	16.5196	1.8453	2.3822	0.7852		0.645			19.4938	2.09	0.0616
56-0	9.5643	1.815	2.3875	0.7078	4.5395	0.6279			18.9807	2.0786	0.0518
56-1	11.8346	1.8849	2.4753	0.8513	3.6566	0.6669	1.0483	0.0521	15.4235	1.9957	0.0712
56-1	15.7987	1.8713	2.4237	0.8131	3.6772	0.6664	0.858	0.0513	14.5821	2.0168	0.0056
56-1	16.2983	1.8561	2.3723	0.8477	3.258	0.6995	0.8779		14.8717	2.0116	0.0662
56-1	11.2984	1.8885	2.3206	0.8998	3.4699	0.6518	0.8928	0.0725	15.527	1.9967	0.0492
56-2	11.5025	1.921	2.4178	0.8524	3.3494	0.7506	0.7566	0.1215	3.1746	1.9949	0.0762
56-2	13.6946	1.858	2.3613	0.7754	3.9668	0.5946	0.8918	0.1262	7.0715	1.9807	0.0618
56-2	13.4037	1.8465	2.3384	0.7745	4.2318	0.7217	0.9348	0.1177	4.5835	2.0115	0.0662
56-2	14.8617	1.8598	2.401	0.8995	3.1337	0.7065	0.889	0.1238	5.0355	2.0049	0.0564
K 1	0.7861	0.834	4.1027	0.0446		1.1615	0.1803	0.0241		0.2129	
K 1	0.8083	0.7469	4.0953	0.0313		0.7054	0.2112			0.1948	
K 1	0.9306	0.6079	3.5955			1.1077	0.2134			0.2318	
K 1	1.0244	0.5116	2.6884	0.0395		0.8928	0.2402			0.2796	
K0	1.0042	0.5083			0.198		0.1328			0.7677	
K0	1.4913	0.5391					0.1746			0.9873	
K0	0.8706	0.403		0.0703			0.2263			1.1595	
K0	1.2318	0.5499		0.0631	0.1848		0.571			1.5296	
K10	1.9099	0.9855	2.9466	0.1921	0.3158	1.3548	0.6739	0.0215	0.2209	2.0486	0.0342

K10	1.831	0.9445	2.6565	0.1939	0.2098	1.2634	0.6674	0.0213	0.3694	1.4635	0.0336
K10	1.8142	0.9661	2.7692	0.2012	0.2271	1.3583	0.7601	0.0238	0.2955	0.7605	0.0377
K10	1.9574	0.9123	2.7952	0.1892	0.2598	1.3832	0.7553	0.0243	0.3167		0.0353
K2	1.2517	1.019	10.0243	0.0601	0.5347	0.7475	0.2199	0.0158		0.2611	0.0233
K2	1.1109	0.8912	10.3504	0.0587	1.191	0.7058	0.2633	0.0145	0.2187	0.2286	0.0205
K2	1.2426	0.6524	10.6266	0.06	0.4814	0.7082	0.4339	0.016		0.2056	0.0227
K2	1.1528	0.5183	10.3003	0.0477	0.4679	0.6816	0.4213	0.0182		0.2488	0.0228
K4	1.6176	0.6083	3.8437	0.1133	0.3454	0.4345	0.3288	0.018	0.2714	0.6523	0.0206
K4		0.6471	4.0937	0.1232	0.3772	0.5127	0.3438	0.0143	0.2363	0.635	0.0212
K4	1.0044	0.5445	3.8439	0.1203	0.4753	0.5228	0.3456	0.0156	0.2297	0.6146	0.0262
K4	1.3418		3.9777	0.111	0.3579	0.4643	0.3245	0.0173	0.2556	0.6937	0.0247
K6	1.1367	0.83	3.4641	0.1154	0.2785	1.032	0.4969	0.019	0.2943	0.8384	0.0308
K6	1.0522	0.7885	3.3534	0.1172	0.2741	0.9314	0.4965	0.0184	0.3067	0.7958	0.0282
K6	1.0751	0.7582	3.4765	0.1286	0.3036	0.9316	0.4771	0.0189	0.3208	0.6861	0.0283
K6	1.0929	0.708	3.4117	0.1499	0.2461	1.0149		0.0182	0.3061	0.8166	0.0268
SP-1											
SP-1											
SP-1				0.0483							
SP-1											
SP-2											
SP-2											
SP-2											
SP-2											
SP-3	4.6731			0.2186		0.7884					
SP-3	4.6856			0.3156		0.5518					
SP-3	4.4326			0.3009		0.783					
SP-3	4.3659			0.1912		0.789					

Atrazin												
Konz.	25 mg/l				5 mg/l				1 mg/l			
Gene ID	1	2	3	10	4	5	6	10	7	8	9	10
1	1.7766	0.4545	0.6395	0.8629	1.7648	0.1713	0.8097	2.1345	0.2764	0.5185	0.4612	2.1654
1	0.6468		0.657	2.0661	1.3371	0.2437	0.6389	5.416	0.278	0.5103	0.4288	5.4838
1	0.3813	0.5543	0.9555	2.2863	1.3062	0.1645	0.603	2.4981	0.2855	0.3486	0.4166	2.7839
1	0.3826	1.6054	0.6008	2.0483	1.5626	0.1874	0.4589	2.6497	0.2772	0.3131	0.4662	3.2878
2	0.4037	0.3891	0.301	2.3826	2.5294	0.6052	1.7768	2.0834	0.729	0.1664	1.2951	1.791
2	0.4164	0.421	0.2864	2.5303	3.3108	0.4654	1.7262	1.9732	0.8191	0.1784	1.3732	1.6982
2	0.5562	0.7546	0.284	2.2341	3.1409	0.423	1.767	2.1083	0.8182	0.2008	1.2602	1.9594
2	0.506	0.7164	0.3959	2.3586	3.6294	0.378	1.6612	2.292	0.8328	0.3694	1.3818	2.0044
4	1.413	0.6293	0.419	1.2924	0.8298	0.2407	0.72	2.6059	0.4253	0.7511	0.5679	1.1234
4	1.0037	0.5208	0.4748	1.2763	0.8041	0.3084	0.7709	1.0485	0.4711	0.6891	0.6373	1.1326
4	1.2178	0.368	0.511	1.2834	1.0117	0.2776	0.7579	0.9708	0.4888	0.7336	0.883	1.1088
4	1.1801	0.4192	0.5489	1.3079		0.2273	0.7471	1.0779	0.4579	0.7078	0.9112	1.2927
5	0.8733	0.859	0.6054	0.8556	0.9334	0.5678	0.9937	0.8428	0.5392	0.8445	0.5	0.8748
5	0.8842	0.9059	0.6071	0.86	0.7689	0.4435	0.9814	0.8742	0.5339	0.778	0.4438	0.8019
5	0.8609	0.7585	0.6557	0.9623	0.8896	0.4993	1.0322	0.8668	0.4825	0.8419	0.5071	0.7649
5	0.8654	0.8556	0.7288	0.8921	0.8612	0.5151	1.0186	0.879	0.5204	0.849	0.5239	0.8506
7	0.535	0.8897	0.1193	0.3451	0.3686	0.0784	0.3165	0.8043	0.2871	0.1249	0.4402	0.5635
7	0.585	0.9359	0.1971	0.3095	0.3731	0.0893	0.2284	0.3273	0.3373	0.4422	0.4057	0.5207
7	0.7429	1.032	0.3173	0.3321	0.4293	0.0889	0.2784	0.3442	0.3313	0.1619	0.3921	0.5872
7	0.902	1.0785	0.3049	0.3064	0.2664	0.0864	0.2475	0.3304	0.3057	0.1258	0.3834	0.8215
8	0.4664	0.3132	0.392	1.0118	1.4119		0.8856	0.8718	0.7019	0.4872	1.1646	1.1181
8	0.4665	0.532	0.4281	0.954	1.3954	0.1928	0.7964	0.9521	0.7832	0.3731	1.0091	0.914
8	0.6003	0.4159	0.5008	0.959	1.434	0.2158	0.833	0.8449	0.8519	10.7306	0.9594	1.0062
8	0.4493	0.3384	0.4869	0.9726	1.5142	0.1958	0.8822	0.8304	0.8471	1.4544	0.7553	0.9476
9	0.7256	0.9852	0.3227	0.8653	1.4818	0.243	1.4483	0.9714	0.6541	0.5321	1.1333	0.9214
9	0.7502	0.7763	0.1948	0.886	1.1004	0.4333	1.7169	0.9559	0.7302	0.5224	0.8344	0.8674



9	0.7459	0.8369	0.4461	0.8611	1.6545	0.2093	1.4217	0.947	0.9263	0.6533	0.869	0.8493
9	0.8003	0.8034	0.4823	0.9199	1.7833	0.235	1.3216	0.9357	0.875	0.3555	1.0013	0.877
10	1.3131	1.403	1.6781	0.2217	0.9178	0.1375	0.6044	0.315	0.6029	0.3478	0.2452	0.3061
10	1.4753	1.2992	0.5153	0.2721	1.0206	0.1271	0.6921	0.321	0.4805	0.3631	0.2966	0.3589
10	1.2314	1.1868	0.5131	0.2628	1.1482	0.1544	0.7713	0.3116	0.5235	0.378	0.2659	0.3445
10	1.2318	0.7498	0.5791	0.3123	1.02	0.1664	0.8766	0.3286	0.5041	0.3262	0.3407	0.2721
11	0.9876	0.458	0.97	0.6686	0.8012		1.2472			0.0618	0.2503	0.1714
11	1.1518	0.7363	1.0141	0.4944	0.9902			0.1213		0.21	0.2806	0.4661
11	0.938	0.6665	0.7231	0.3371	0.7449		0.6189	0.1929		0.258	0.225	0.486
11	0.57	0.8869	0.8879	0.333	0.9368			0.1497	0.2611			0.336
12	0.4281	0.1365	0.9928	0.4222	0.2769	0.0908	0.2665	0.193	0.0568	0.0539	0.6302	
12	0.329	0.1467	0.8173	0.3739	0.2489	0.0961	0.2148	0.1769	0.0648	0.0345	0.6184	
12	0.3676	0.1236	0.9107	0.3696	0.2426	0.0617	0.2647	0.2142	0.0588	0.0335	0.6832	0.1812
12	0.4294	0.1646	0.8501	0.3839	0.211	0.0826	0.2788	0.2142	0.0557	0.125	0.7489	0.3511
13	0.8293	0.7045	1.587	3.036	3.334	1.3459	1.7997	1.9942		1.9442	0.6982	2.5853
13	0.7762	0.6573	1.6729	2.4413	3.3856		1.7574	1.8907	0.9112	2.2448	1.4687	2.4729
13	0.7617	0.4984	1.4613	2.9702	3.2625		1.7731	1.8272	1.2627	1.7062	0.9416	2.547
13	0.7773	0.5939	0.9818	3.0226		1.1323	1.7066	2.0156	1.6575	2.5887	0.7044	2.4459
14	0.5939	0.724	1.3935	0.1024	0.4308	0.0112	1.4337	0.1121	0.364	0.7401	0.1062	0.12
14	0.6949	0.6548	1.1892	0.1142	0.4576	0.0129	1.3203	0.0997	0.3574	0.6963	0.0979	0.1553
14	0.7098	0.6979	1.3069	0.1199	0.4055	0.0109	1.4105	0.0971	0.379	0.6333	0.084	0.1502
14	0.7199	0.6491	1.2556	0.0914	0.4675	0.0136	1.2274	0.0943	0.425	0.6624	0.0946	0.125
15	0.9289	1.3223		0.6665	5.5322		3.6843	0.6241	0.7942	0.6981	0.5796	0.5905
15	0.9051	0.5829		0.6475	5.2448	0.5405		0.5608	0.9226	0.8877	0.7068	0.7022
15	0.7823	0.6729		0.6363	5.78			0.6066	0.9606	0.6574	0.5419	0.6808
15	0.7007	0.8043		0.6608	5.3423		1.878	0.5705	1.0111	0.5661	0.0191	0.7627
16	0.3185	0.1123	0.4592	0.6791		0.1746	0.6539	0.3423	0.4319		0.1976	0.6192
16		0.0807	0.2748	0.5858			0.5284	0.3851			0.3856	0.5612
16	0.3928	0.0853	0.4319	0.5778		0.1679		0.3246		0.0715	0.3392	0.5116
16	0.2971	0.1099	0.2877	0.6267		0.2042	0.4335	0.3741	0.4096	0.0809	0.3466	0.4956
17	0.6239	2.2028	0.9782	1.3541	2.5209	1.7248	1.0851	1.2903	1.3213	3.0665	0.4411	1.2925
17	0.6273	3.0384	0.9964	1.3883	2.557	1.8769	1.0501	1.2689	1.3142	3.1898	0.4509	1.2144
17	0.6374	2.6854	0.9976	1.3705	2.5045	1.9829	1.0637	1.2787	1.3129	2.8368	0.426	1.2734
17	0.6458	2.7306	0.8685	1.4211	2.5164	2.3947	1.0635	1.2849	1.3081	3.2907	0.4707	1.266
18	0.832			0.7157	1.3779	0.1185	0.9542	0.4933	0.3484	0.4067	0.5295	0.6457
18	1.0281			0.6177	1.0726	0.1355	0.7709	0.5117	0.3533	0.5458	0.4949	0.6935
18	0.8867			0.6584	1.82	0.1764	0.8702	0.5171	0.4479	0.5552	0.4829	0.7332
18	0.8678			0.6347	1.5582	0.2097	0.8325	2.2748	0.3263	0.4436	0.496	0.721
19	0.8231	0.591	0.6966	0.4156	2.379	0.0838	0.6004	0.3801	1.9723	0.7699	0.5188	0.3365
19	0.8781	0.7206	0.695	0.3998	2.1715	0.1251	0.5274	0.3422	1.7954	0.6792	0.5576	0.3297
19	0.8556	1.067	0.6194	0.368	2.4055	0.1312	0.5301	0.3403	1.5979	0.6731	0.5268	0.3298
19	0.8662	1.7698	0.724	0.3946	3.0237	0.1854	0.6058	0.3418	1.5748	0.4252	0.5096	0.3747
20	0.8993	0.8015	1.6604	0.908	1.6143		1.1623	0.9451	2.8365	0.8583	0.9271	0.7789
20	0.8667	0.7422	2.1473	0.9384	1.5245	2.919	1.0144	0.9526	2.113	0.8541	0.7892	0.8863
20	0.8387	0.875	1.7747	0.8925	1.5744	2.9098	0.9998	0.9425	2.5406	0.8034	0.7073	0.8153
20	0.8405	0.737	1.6585	0.9175	1.5125	1.9221	1.0647	0.9195	1.8146	0.8286	0.6198	0.7806
21	0.645	0.2923	0.3857	0.6733	1.5699	0.3904	0.4745	0.8324	0.6855	0.6859	0.3509	0.8841
21	0.6509	0.3229	0.2921	0.8454	1.8117	0.3176	0.6568	0.805	0.6477	0.6433	0.3235	0.8573
21	0.6829	0.2673	0.4177	0.873	1.8394	0.2909	0.7355	0.7189	0.358	0.6254	0.3506	0.8604
21	0.6481	0.3276	0.5827	0.9536	1.9917		0.6261	0.663	0.7243	0.6153	0.6506	0.923
22	0.7506	1.2421	1.5952	0.8405	2.1557	0.8561	0.8081	0.6393	1.4968	1.5982	0.7067	0.9069
22	0.7371	1.4715	1.6501	0.8874	1.8544	0.9456	0.7025	0.689	1.5417	1.5556	0.7304	0.9134
22	0.7527	1.6568	1.5485	0.8624	2.4685	0.8984	0.5392	0.6664	1.4514	1.6651	0.7681	0.9258
22	0.7575	1.438	1.5669	0.8462	2.4739	0.9744	0.7763	0.6681	1.6687	1.5859	0.7092	0.9168
23	0.2936	0.4253	1.3362	0.078	0.6773	0.0296	0.2793	0.099	0.2122	0.3061	0.1235	0.1345
23	0.239	0.4392	1.3065	0.2015	0.7695	0.0484	0.2499	0.1139	0.1955	0.3126	0.1248	0.1545
23	0.3068	0.3906	1.2929		0.7305	0.0585	0.2575		0.1898	0.2903	0.121	
23	0.3166	0.4311	1.2278	0.1967	0.7453	0.0504	0.2487	0.1066	0.2068	0.2755	0.1179	0.133
24	0.7721	0.9383	1.2508	0.9534	0.9407	0.6547	1.6309	1.1425	0.8294	1.079	0.8427	1.001
24	0.9006	0.9273	1.2083	0.9579	1.0077	0.4377	1.6696	1.1079	0.8301	0.8636	0.8454	0.9806

24	0.9614	0.8731	1.1998		1.0525	0.3434	1.7123		0.8509	0.6918	0.8083	
24	0.9961	0.9432	1.177	1.0417	0.9549	0.3816	1.3824	1.0957	0.842	0.5349	0.7771	0.9962
25	0.7152	0.8032	0.8374	0.4898	1.565	0.1798	0.733	0.4226	0.6059	0.4693	0.6663	0.4269
25	0.7099	0.7951	0.8266	0.4835	1.5893	0.1686	0.6808	0.4217	0.5992	0.4532	0.6582	0.4328
25	0.6993	0.7474	0.8384			0.1423	0.6747		0.6021	0.4398	0.6488	
25	0.693	0.7739	0.8694	0.4985	1.5949	0.157	0.6651	0.4106	0.5904	0.5036	0.6937	0.4311
26			0.9377	0.7447	0.6922	0.162	0.4886	0.1837	0.1201	0.0912	0.2663	1.3898
26				0.7514	0.5866	0.1529	0.5043	0.5277	0.129	0.0909	0.4788	1.3456
26			5.7552		0.7853	0.1312	0.562			0.1414	0.5118	
26			3.2585	0.7417	0.7208	0.1147	0.9751	0.5463		0.1464	0.3487	1.5212
27	0.4137	1.4662	0.8095	1.8998	4.0286	0.6875	0.7724	1.9924	0.6717	1.6785	0.4002	2.6644
27	0.4682	1.0371	0.8319	2.3675	4.6093		0.5983	2.1111	0.7358	1.3799	0.4221	2.8244
27	0.4175	1.1097	0.8663		4.5166	1.0051	0.5058		0.6963	1.1409	0.4326	
27	0.5001	1.1098	0.8193	2.1725		1.4177	0.6678	2.1019	0.7532	1.4417	0.4206	2.6506
28		0.3146	0.3187	0.3134	0.2683	0.0477	0.154	0.1908	0.1575	0.0241	0.107	0.1517
28		0.3465	0.1931	0.2793	0.3602	0.0629	0.187	0.1877	0.1442	0.0229	0.1196	0.3391
28		0.4091			0.3907	0.036	0.2086		0.1388	0.0333	0.1015	
28		0.3747	0.5898	0.312	0.4189	0.0382	0.1888	0.1938	0.1404	0.0278	0.1035	0.3086
29	0.7895	1.0585	0.3889	1.062	1.7179	0.4372	0.8141	0.822	0.6542	0.7411	0.815	0.9467
29	0.7975	0.9793	0.3999	1.0286	1.8674	0.4362	0.9172	0.8378	0.7299	0.7158	0.896	0.8258
29	0.7921	0.9144	0.5004		1.1011	0.5233	0.838		0.7795	0.809	1.0961	
29	0.8023	0.8782	0.5722	1.0795		0.4628	0.8301	0.8661	0.7341	0.8498	1.1262	1.0472
30		0.1311	0.0598	0.1362	0.1732	0.0475	0.1623	0.1686		0.0786	0.0412	0.7785
30		0.193	0.0493	0.1647	0.0998	0.0475	0.1893	0.167		0.0778	0.037	
30		0.1902	0.0751		0.1443	0.0571	0.2461				0.0348	
30		0.1138	0.1062	0.1892	0.3459	0.0544	0.1922	0.1631		0.0539	0.0444	0.085
31	0.5152	1.0037	0.6263	2.3072	5.0092	1.1086	1.4944	1.9875	0.7586	1.4197	1.9521	1.8856
31	0.5266	0.9946	0.615	2.2753	5.0537	1.2049	1.4642	1.7836	0.7687	1.5208	2.0117	1.9489
31	0.5377	0.9602	0.6091		5.382	1.2495	1.5293		0.7774	1.8079	2.0078	
31	0.5407	1.0263	0.6051	2.2809	5.3814	1.097	1.6564	1.7268	0.7277	1.6911	2.0482	1.8848
32	1.2506	0.7295	0.5078	0.9924	2.4742	0.2812	0.9416	0.8158	0.7839	0.6719	0.855	0.8193
32	1.154	0.7492	0.5443	1.1599	2.3418	0.2196	0.9995	0.8699	0.7355	0.8079	0.8193	0.8349
32	1.2026	0.792	0.5187		2.5175	0.1687	0.9355		0.7041	0.6965	0.8282	
32	1.2656	1.0313	0.552	1.1071	2.5271	0.1335	1.227	0.8685	0.5943	0.4407	0.8987	0.8243
33	1.1157	1.2274	1.4551	0.9696	3.9585	8.6158	0.9532	0.9819	1.6179	1.2562	1.6652	0.9802
33	1.108	1.2485	1.4183	1.01	3.9731	8.2485	0.967	1.0018	1.7184	1.2546	0.962	1.0113
33	1.0858	1.2493	1.4189		4.2092	8.4635	1.127		1.8169	1.2453	0.956	
33	1.1281	1.2321	1.3663	1.0204	3.7532	7.3839	0.9693	1.0158	1.8255	1.3262	0.9612	1.0131
34			1.0217	0.6875	0.9629	0.1823	1.4613	0.5875	0.8305	0.2939	0.364	0.3487
34	1.1404		1.2223	0.5587	0.8954	0.194	1.541	0.6435	0.4235	0.3468	0.3686	0.3352
34	0.9588		0.5997		1.2089	0.1698	1.4364		0.5148	0.2909	0.2139	
34	1.0615		1.3274	0.6445	0.9185	0.2119	1.7329	0.6231	0.5063	0.3383	0.4931	0.3675
35	1.074	0.6565	0.5102	0.902	6.2619	0.0172	0.7471	1.2321	1.1082	0.7393	0.9296	1.3212
35	1.1526	0.7233	0.5324	0.9698	6.7559	0.0191	0.703	1.1194	1.1411	0.7909	0.9215	1.292
35	1.1888	1.0956	0.493		6.8426	0.0162	0.7098		1.0439	0.6417	0.8134	
35	1.2278	0.8717	0.5085	0.8881	7.058	0.0163	0.7608	3.0998	1.0604	0.6625	0.863	1.173
36	1.156	1.0409	0.8628	1.1382	9.4117	0.0073	0.818	1.1494	2.1822	0.9645	1.0944	1.0519
36	1.1976	0.5712	0.8132	1.1447	9.1318	0.0113	0.7906	0.9329	2.1749	0.9619	1.1268	1.0538
36	1.1918	1.0686	0.6602		8.8975	0.0089	0.7659		2.3207	0.9706	1.0837	
36	1.1652	1.1881	0.7167	0.9971	9.372	0.0103	0.8006	1.0849	2.2652	0.9921	1.0975	1.0096
37	0.9651	1.178	1.3641	0.9954	1.8465	0.7515	0.8988	0.9868	1.0358	0.8866	0.3967	1.0647
37	0.985	1.1809	1.3905	1.0204	1.9021	0.913	0.9027	0.969	1.0827	0.8478	0.3991	1.0581
37	0.9787	1.1965	1.38		1.8991	0.7861	0.9118		1.0652	0.8632	0.3957	
37	0.9712	1.1884	1.433	1.0188	1.9424	0.8244	0.9233	0.9638	1.0593	0.9083	0.4147	1.0164
38	0.618	19.3138	4.1972	1.8841	3.7611	3.633	1.4652	1.5538	1.4993	0.7818	2.3171	1.743
38	0.6861			1.8432	3.8478	2.6426	1.8138	1.6203	1.5534	0.7974	2.0259	1.7244
38	0.665		5.7279		4.1128	1.6978	1.845		1.4496	0.834	1.7096	
38	0.6605		1.0364	1.8683	4.4051	4.0451	1.4512	1.5939	1.4818	0.7868	1.7664	1.6384
39	0.9031	1.0247	0.4726	1.0371	12.4546	0.4357	0.635	0.5819	3.4552	0.4519	0.4583	0.9735
39	0.9215	0.9009	0.4581	1.0477	11.4675	0.6692	0.5891	0.5393	3.3162	0.4531	0.4747	0.9352





14-4	0.791	0.746	1.2643	0.1046	1.2345	0.1385	1.1674	0.1146	0.504	0.3201	0.2139	0.18
14-4	0.7858	0.7594	1.2509	0.102	1.2029	0.1411	1.1883	0.1036	0.5083	0.688	0.2047	0.1532
14-0	0.7638	0.8222	1.595	0.0946	0.8253	0.0157	1.7238	0.103	0.6348	0.4432	0.1093	0.0879
14-0	0.7766	0.6796	1.5877	0.0967	0.7712	0.0218	1.7281	0.0946	0.2215	0.4411	0.106	0.059
14-0	0.6775	0.6744	1.5462	0.1076	0.9569	0.0163	1.8715	0.1041	0.3031	0.4822	0.1173	0.0773
14-0	0.7756	0.7295	1.5106	0.0911	0.979	0.0188	1.5269	0.1073	0.291	0.492	0.1135	0.0578
56-0	1.2182	0.6135	0.7104	0.5327	0.1331	7.9264	2.2573	0.6747	0.6025	0.3529	0.8526	0.5499
56-0	1.2227	0.5827	0.6976	0.5151	0.1157	9.0449	2.2348	0.657	0.6152	0.2969	0.8433	0.5315
56-0	1.2647	0.5851	0.6416	0.5106	0.1677	7.9984	2.1335	0.6655	0.601	0.356	0.9399	0.5856
56-0	1.2389	0.582	0.6672	0.4917	0.1289	10.6889	2.3165	0.6626	0.6154	0.3084	0.9213	0.5344
56-1	1.2733	0.5742	0.6872	0.475	0.1255	9.4601	2.9297	0.6189	0.6132	0.2957	0.8886	0.5843
56-1	1.2023	0.6081	0.6919	0.464	0.1248	13.1376	2.2431	0.6762	0.6035	0.2525	0.6912	0.5609
56-1	1.2208	0.5851	0.6746	0.4927	0.1419	12.5651	2.2742	0.6403	0.6319	0.3046	0.8876	0.5687
56-1	1.2333	0.5955	0.6855	0.4798	0.1221	7.9349	2.2388	0.6143	0.6028	0.277	0.8935	0.5695
56-2	1.1694	0.6152	0.6488	0.5183	0.1373	0.9109	2.4868	0.7307	0.5502	0.2844	0.8947	0.6056
56-2	1.1693	0.5933	0.6468	0.5086	0.1188	0.6802	2.4189	0.7216	0.5331	0.3303	0.8822	0.6177
56-2	1.1753	0.6305	0.6447	0.5208	0.1494	0.4708	2.372	0.7138	0.547	0.2652	0.849	0.6102
56-2	1.2055	0.5891	0.6448	0.5185	0.1378	0.4087	2.4498	0.7336	0.5041	0.271	0.894	0.6265
K 1	0.5552	0.3661	0.3261	0.4111	0.9262		0.2896	0.3744			0.161	0.9681
K 1	0.5729	0.2556	0.386	0.461	0.8685	0.0838	0.3282	0.3556		0.0627	0.1352	0.8948
K 1	0.3779	0.3022	0.2837	0.3573	0.7691	0.1093	0.4401	0.3099		0.1894	0.1376	0.8285
K 1	0.6663	0.228	0.1923	0.3916	0.5715	0.1249		0.395		0.1293	0.1203	1.0287
K0	0.3056	0.3293	0.1723		0.4313	0.0976	0.4318					
K0	0.92	0.3108	0.4363		0.358	0.1171	0.6058	0.5832				
K0	0.9531	0.2744	0.3343			0.0826	0.4207	0.4001				0.5096
K0		0.3241	0.3059		0.4162		0.3666	0.2483			0.2126	0.3293
K10	0.8752	0.4775	1.2598	0.7337	1.7482	0.1045	0.8069	0.77	0.7691	0.3553	0.5153	0.8897
K10	0.7494	0.5789	1.4138	0.7571	1.797	0.0781	0.8659	0.8099	0.6813	0.3822	0.5466	0.8462
K10	0.7803	0.5466	1.3292	0.7347	1.8906	0.0839	0.9784	0.7494	0.6876	0.4164	0.5123	0.8487
K10	1.0068	0.8091	1.3252	0.7664	1.656	0.07	0.9519	0.7853	0.5298	0.3209	0.5164	0.8714
K2	0.9318	0.3504	0.5047	0.393	0.3074	0.0365	0.7032	0.428	0.3107	0.2141	0.2705	0.9586
K2	1.0137	0.3835	0.4455	0.3727	0.2983	0.0862	0.6872	0.4064	0.2947		0.3649	0.8172
K2	0.9338	0.4426	0.3725	0.3831	0.2602	0.059	0.4979	1.1975	0.2881	0.2488	0.3028	0.7535
K2	0.8619	0.4275	0.3597	0.3712	0.5202	0.0744	0.5273	0.4415	0.3478		0.3178	0.7219
K4	0.4598	0.4908	0.2871	0.1672	0.8793	0.1023	0.3862	0.4539	0.3279	0.2299	0.243	0.9896
K4	0.4806	0.5033	0.274	0.437	0.9097	0.1009	0.3902	0.4519	0.3248	0.2531	0.2129	0.7963
K4	0.4484	0.5675	0.3006	0.508	0.8104	0.115	0.4062	0.4589	0.3333	0.2981	0.2294	0.8644
K4	0.3421	0.6021	0.3349	0.5938	0.7946	0.1248	0.3941	0.531	0.3272	0.2908	0.225	0.9091
K6	0.6356	0.5534	0.5175	0.5981	1.0635	0.1405	0.544	0.5955	0.5738	0.4556	0.3674	0.8325
K6	1.6386	0.5644	0.5263	0.6021	1.0004	0.1486	0.6138	0.6311	0.4955	0.5001	0.3981	0.9824
K6	0.535	0.5248	0.4883	0.5898		0.1587	0.6364	0.5766	0.5059	0.4604	0.3827	0.9303
K6	0.9103	0.532	0.5576	0.6153	1.2892	0.0952	0.5386	0.5955	0.5188	0.4977	0.3692	0.8308
SP-1		0.0889										
SP-1		0.0517										
SP-1		0.0656										
SP-1		0.2755	0.2915			0.0275						
SP-2		3.2192										
SP-2		0.2426										
SP-2		0.077										
SP-2		0.1517										
SP-3				0.5243	3.1064			1.209				
SP-3				1.082	2.6857			1.5105				
SP-3		0.0004		1.4558	2.6931			1.8492				
SP-3		0.2769		1.5653	3.0849			1.3782		0.4658		

Endosulfan									
Konz.	1,5 mg/ l			0,3 mg/ l			0,06 mg/ l		
Gene ID	34	35	36	34	35	36	34	35	36
1	0.735			0.6739	0.0941	0.6031	0.5395	0.3576	

1	0.7242	0.2331	0.1915	1.3087	0.0811	0.7272	0.4858	0.357	0.4915
1	0.7639	0.2054		0.4593	0.0676	0.516	0.4067	0.3498	0.464
1	0.8543	0.2215		0.5308	0.0671	0.5752	0.4357	0.3241	0.467
2	4.247	4.1755	11.4299	5.2883	4.3975	19.5522	2.9177	2.9537	3.6658
2	4.265	3.0141	23.782	5.1216	5.5403	16.3017	2.8349	2.9406	5.1242
2	4.4481	2.5051	12.3108	5.2521	6.0661	16.3374	2.8608	2.8319	4.7496
2	4.6267	3.0094	12.7229	4.9299	6.9389	15.7759	2.8556	2.9412	5.4222
4	15.1572	2.8128	6.3812	3.4354	1.0555	12.0243	0.8352	0.7606	0.8651
4	13.3934	2.9941	3.7277	3.7185	1.1034	11.3999	0.8584	0.7568	0.9368
4	14.3132	2.6043	2.777	3.6608	1.079	11.6175	0.8471	0.7545	0.9086
4	14.3153	2.6717	2.8493	3.8864	1.3851	10.0869	0.885	0.7468	0.9255
5	1.0371	0.7134	1.0833	1.1099	0.6651	0.7597	0.9161	0.7776	0.8416
5	1.0429	0.6832	0.981	1.1101	0.5963	0.8155	0.8949	0.8092	0.8608
5	1.1528	0.6908	1.05	1.0929	0.5886	0.7966	0.8086	0.8597	0.9051
5	1.0947	0.8875	0.954	1.1785	0.6973	0.8039	0.8998	0.8266	0.887
7	0.7647	0.0221		0.7106		1.4678	0.3843	0.3087	0.3779
7	0.7709	0.0511	0.7884	0.8774		0.5895	0.3975	0.2787	0.826
7	0.787	0.0543		0.91		0.5678	0.3474	0.3063	0.3969
7	0.7547	0.2023		0.8782		0.6395	0.3923	0.3235	0.406
8	0.722	0.2827	0.6339	0.6454	0.1279	0.4168	1.0913	0.3708	0.3437
8	0.7697	0.0687	1.7979	0.6867	0.0963	0.4302	0.4017	0.3533	0.3023
8	0.7513	0.1641	0.478	0.7059	0.0572	0.3893	0.4183	0.3462	0.3188
8	0.7349	0.1247	0.4101	0.6872	0.0503	0.4233	0.4004	0.3542	0.3315
9	1.2069	0.5005	1.1989	1.6403	0.1307	1.2236	0.7283	0.5764	0.9897
9	1.2685	0.1016	2.1618	1.6283	0.0811	1.1653	0.7068	0.5253	1.074
9	1.1599	0.468	1.1248	1.7728	0.3782	1.1425	0.7639	0.5415	1.0645
9	1.1992	0.4802	0.9451	1.68	0.3903	1.2841	0.6788	0.5709	1.0541
10	0.6796	0.1346	0.0528	0.6872	0.1278	0.7194	0.2941	0.8214	0.3924
10	0.8678	0.3486	1.0628	0.2281	0.1763	0.539	0.3021	0.3219	0.8903
10	0.7336	0.2493	0.9196	0.6947	0.196	0.5673	0.234	0.3457	0.4126
10	0.7419	0.2375	0.9937	0.7162	0.1994	0.5577	0.2406	0.3268	0.454
11	27.2448	3.0758		10.8472	0.6192	9.4988	6.9036	0.5889	
11	24.4193	9.5437	4.8347	26.0549	0.3406	10.0186	4.8376	0.6406	1.9177
11	63.5559	1.3117		7.6712	0.5782	8.6383	2.3048	0.5435	2.1734
11	21.768	1.6559		9.4673	1.1578	9.8258	2.1845	0.6762	1.0972
12	2.9167	1.1199		3.082	1.0576	1.8572	0.8655	0.6263	1.8339
12	2.9627	1.4343		2.1408	0.9975	3.0316	0.6715	0.6715	0.7596
12	3.1324	1.6767	2.2377	2.5828	1.0306	2.7649	0.6711	0.7137	0.7562
12	2.8834	1.5048	4.3815	2.5324	1.1371	3.1011	0.6074	0.5909	0.8023
13	3.0538	0.9901	1.0585	1.6047	0.7366	1.6728	0.8673	0.5866	0.6219
13	2.9853	1.0372	1.1212	1.598	0.7432	1.7032	0.8638	0.5999	0.6061
13	3.0426	1.162	1.1095	1.5406	2.022	0.9881	0.8166	0.5825	0.6023
13	3.0492	1.0126	1.1083	1.6312	0.7495	1.6215	0.8671	0.6061	0.4931
14	1.0621	0.3671	1.6141	0.9855	0.4616	0.8242	0.4732	0.5946	0.6179
14	1.046	0.4035	1.9993	1.0008	0.4638	0.8618	0.4396	0.6133	0.6016
14	1.002	0.4217	1.743	0.9905	0.4914	0.8038	0.454	0.5725	0.6003
14	1.0859	0.4152	1.8156	0.9288	0.4882	0.8055	0.4057	0.5695	0.6199
15	0.828	0.3019	0.1327	0.7235	0.0984	0.8778	0.5022	0.1506	0.5569
15	0.8104	0.2638		0.7127	0.0901	0.8767	0.5178	0.3735	0.5433
15	0.8709	0.2631	3.2637	0.8007	0.0885	0.8504	0.4892	0.3785	0.5771
15	0.7688	0.3365	0.4056	0.7721	0.0838	0.9864	0.5108	0.3795	0.5354
16	0.5966	0.1941		0.4786	0.0374	0.3701	0.2515	0.1005	
16	0.7623	0.1656	1.2033	0.5001		0.3288	0.2236	0.1981	0.3656
16	0.6514	0.1948		0.495	0.0398	0.3693	0.2887	0.2174	
16	0.6685	0.0312		0.4906	0.061	0.46	0.3282	0.2545	0.2507
17	0.6844	0.2074	0.4843	0.6269	0.3705	0.7466	0.5715	0.4143	0.4094
17	0.673	0.158	0.5462	0.6224	0.3799	0.7394	0.5788	0.4419	0.419
17	0.6852	0.2032	0.5363	0.6411	0.3633	0.7237	0.5836	0.4384	0.4031
17	0.6727	0.1832	0.5669	0.6213	0.3309	0.7473	0.5795	0.442	0.3969
18	16.7263	11.7122	3.424	5.6304	6.9428	4.9015	2.8314	0.5133	1.1058

18	16.4063	12.2003	4.2666	5.7742	7.0339	6.0452		0.5052	1.0928
18	16.2812	12.6732	3.4856	5.0845	6.066	7.0682	4.4021	1.3957	1.1517
18	39.264	10.5791	7.0722	5.8515	7.4427	13.9893		1.3186	1.0225
19	1.079	0.1448	1.8938	0.8721	0.0302	1.0337	0.4237	0.325	0.5596
19	1.0735	0.0304	0.9698	0.8723	0.0102	0.9851	0.3912	0.3305	0.5491
19	1.0045	0.0236	0.5155	0.8213		0.9559	0.416	0.3418	0.5391
19	1.071		0.5208	0.8726	0.1003	0.9184	0.4122	0.3639	0.5367
20	0.9915	0.5509	0.8289	0.797	0.2482	1.0156	0.724	0.7748	0.8815
20	0.9836	0.5818	1.0063	0.8041	0.2254	1.0193	0.6961	0.7794	0.8964
20	0.949	0.5667	0.8739	0.7714	0.2291	1.0536	0.6855	0.7683	0.8948
20	0.995	0.5536	0.8964	0.8326	0.8577	1.0008	0.6706	0.788	0.8851
21	0.7647			0.8698	1.3288	1.009	0.6248	0.6939	0.7147
21	0.7704			0.9333	0.5692	0.9881	0.6372	0.6857	0.7985
21	0.7802		1.4919	0.8887	0.5616	1.0054	0.6318	0.6656	0.8052
21	0.7476	9.2548	1.1117	0.8754	0.556	1.0064	0.5996	0.7293	0.7765
22	0.9755	0.709	0.8984	1.0555	0.627	0.8699	0.6605	0.6607	0.6315
22	0.9716	0.7761	0.7822	1.0079	0.5836	0.921	0.7367	0.6168	0.6533
22	1.0195	0.7606	0.9088	1.0782	0.666	0.9098	0.6484	0.636	0.6369
22	1.0196	0.7191	0.7633	1.0828	0.5661	0.8938	0.6756	0.6931	0.642
23	0.4705	0.5095		0.5589	0.2483	0.6034	0.421	0.5914	0.5695
23	0.5985	0.4453	2.6133	0.5647	0.1896	0.6643	0.3647	0.5484	0.4869
23									
23	0.6539	0.4387		0.5542	0.1597	0.6852	0.3727	0.5364	0.5446
24	1.1094	0.6768	0.88	1.2645	0.7901	1.0934	1.0366	0.9368	0.9461
24	1.1526	0.7395	0.8077	1.185	0.8176	1.1152	1.0117	0.9249	0.9776
24									
24	1.0803	0.8489	0.8524	1.1559	0.8438	1.1023	1.0129	0.9068	0.9978
25	1.3436	0.6577	2.3606	1.1608	0.6652	0.9022	0.7128	0.8565	0.9639
25	1.3419	0.4669	0.8859	1.1428	0.6535	0.8787	0.739	0.7857	0.9538
25									
25	1.3377	0.5673	2.2688	1.1704	0.6593	0.9161	0.6918	0.8354	0.9568
26	0.319			0.6118		0.4044	0.4031	0.4515	
26	0.6316	0.1996		0.4956	0.0975	0.3267	0.3384	0.3637	0.2246
26									
26	2.2092	0.7394		0.4979	0.3732	0.3714	0.3138	0.2737	
27	0.6231	0.1847	0.6048	0.6548	0.0967	0.3868	0.8285	0.6193	0.5923
27	0.6476	0.2467	0.5835	0.6435	0.108	0.384	0.7947	0.6418	0.562
27									
27	0.6193	0.2527	0.458	0.6531	0.1153	0.4025	0.8034	0.6244	0.5478
28	0.7234		1.4655	0.4033	0.1094	1.9931	0.2692	0.2765	0.883
28	0.644	0.0388	0.4505	0.5041		0.4673	0.274	0.2455	0.2978
28									
28	0.7575		3.2508	0.5129	0.0543	0.4305	0.2867	0.6669	0.3157
29	2.0439	1.1388	1.7195	1.3324	0.6643	1.5213	0.7522	0.7183	0.793
29	1.917	0.9712	1.5054	1.1931	0.6964	1.4048	0.6962	0.6777	0.7845
29									
29	2.0017	1.1455	4.7357	1.3534	0.6583	1.427	0.7214	0.7893	0.7613
30			0.9651	0.2512					0.2061
30	0.3295	0.0879	0.3379	0.2173	0.0741	0.1649	0.0913	0.043	0.2538
30									
30	0.3463		1.0718	0.2144	0.0873	0.2001	0.1794	0.0337	0.2286
31	1.4307	0.592	0.583	1.1631	0.5131	0.6792	0.9171	0.7125	0.5685
31	1.3989	0.6119	0.6378	1.1653	0.4687	0.6724	0.9379	0.7802	0.5594
31									
31	1.414	0.4419	0.3155	1.2111	0.4945	0.7401	0.9102	0.7526	0.6171
32	1.6683	1.385		1.2539	0.2942	6.8568	0.8911	0.934	1.114
32	1.6448	1.4408	1.5231	1.2669	0.9271	2.1718	0.8884	0.8666	1.0646
32									
32	1.9126	1.4815	1.7406	1.2975	0.8336	2.1676	0.9473	0.8674	1.1772
33	1.0046	0.9167	0.9957	1.0003	1.0373	0.9891	0.9872	0.9913	1.0307

33	1.0096	1.0971	1.0126	0.9811	0.9463	0.9952	0.9707	0.9986	0.9854
33									
33	0.9858	0.9636	0.9917	1.02	1.018	1.0159	1.0433	1.0105	0.9833
34	1.6641	0.268	0.998	1.4581	0.2353	1.5113	0.5855	0.3828	0.5438
34	2.2264	0.3432	1.1444	1.3671	0.2339	1.4676	0.5795	0.3371	0.5513
34									
34	0.962	0.2555	0.997	1.4063	0.2483	1.4998	0.5292	0.3251	0.5297
35	2.5316	1.4537		1.2374	0.1223	1.5517	0.457	0.6142	0.5957
35	2.1363	1.1816		1.2896	0.1146	1.1288	0.4915	0.4183	0.6241
35									
35	2.4913	1.1734		1.5035	0.122	1.1279	0.4398	1.2521	0.6621
36	2.2959	1.6464	7.2013	1.5881	0.5143	1.8621	0.559	0.7676	0.891
36	2.1528	1.1887	1.2902	1.6396	0.4917	1.6687	0.5228	0.902	0.8495
36									
36	2.2404	1.4126	3.5232	1.6223	0.4806	1.9319	0.5305	0.8807	0.8525
37	0.8315	0.8589	2.6878	0.8133	0.8024	0.9921	0.7093	0.8546	1.0122
37	0.8502	0.8661	1.2047	0.7928	0.7191	1.0048	0.7098	0.8593	0.9993
37									
37	0.8751	0.8686	1.2156	0.8188	0.7964	1.0199	0.6912	0.8373	1.0197
38	1.0305	0.7124	1.9329	1.1668	0.1563	0.9244	0.8741	0.4542	0.7571
38	1.0355	0.4632	1.2585	1.0971	0.1609	1.1424	0.7264	0.3974	0.7737
38									
38	1.0668	0.6143	2.2118	1.1478	0.4165	1.1638	0.844	0.3762	0.7467
39	0.999	0.6535	0.483	1.2648	0.3412	0.3825	1.8079	1.0319	0.5659
39	0.9831	0.5979	0.4954	1.2122	0.3742	0.385	1.7916	1.0032	0.569
39	0.987	0.5492	0.4679	1.2454	0.3996	0.376	1.7915	0.9952	0.5837
39	1.0259	0.5541	0.4744	1.2166	0.4494	0.3659	1.829	0.9762	0.5691
41	0.697	0.3595	0.7636	0.7023	0.2967	0.8981	0.4226	0.5205	0.5735
41	0.7263	0.3212	0.7141	0.705	0.3261	0.9095	0.4288	0.4949	0.5399
41	0.6806	0.3513	0.8134	0.6921	0.2845	0.8938	0.4175	0.5033	0.5411
41	0.7213	0.2669	0.7596	0.6794	0.2989	0.9062	0.4019	0.4763	0.591
42	0.7216	0.4601	2.3347	0.6887	0.6108	0.8835	0.5087	0.6018	0.5865
42	0.7358	0.4303	1.5088	0.7187	0.5774	0.7085	0.4723	0.6056	0.5671
42	0.8114	0.485	1.0441	0.7579	0.5725	0.7319	0.4534	0.5666	0.5609
42	0.7286	0.4902	0.8027	0.7107	0.5702	0.7637	0.5007	0.5256	0.5844
43	0.8472	0.3865	0.4841	0.7504	0.3016	0.4109	0.389	0.4744	0.3159
43	0.7064	0.3214	0.7257	0.8089	0.2773	0.4262	0.4049	0.4889	0.289
43	0.8805	0.3158	0.3169	0.7994	0.2512	0.3995	0.4012	0.4597	0.2931
43	0.838	0.297	0.3375	0.52	0.3145	0.4117	0.3944	0.5749	0.2977
44	1.1738	0.1288	1.0347	0.7189	0.0808	0.7451	0.3647	0.2904	0.3486
44	1.2221	0.1749	1.0445	0.7251	0.0698	0.7113	0.363	0.2916	0.3636
44	1.2602	0.1062	0.4163	0.7148	0.0736	0.6921	0.3566	0.2684	0.3615
44	1.2606	0.2176	0.7911	0.8901	0.1108	0.7305	0.3323	0.2882	0.7371
45	1.1256	0.7564	0.9932	1.713	0.9475	1.4707	1.7214	1.0035	1.1801
45	1.1363	0.7563	0.9667	1.7544	0.9412	1.167	1.7622	1.0227	1.1695
45	1.1364	0.7534	0.9816	1.6434	0.8003	1.2043	1.7556	1.0353	1.1174
45	1.1647	0.7281	0.9873	1.7859	0.7716	1.2139	1.7266	1.0194	1.1428
46	1.1116	0.1782	0.7137	0.782	0.2854	0.7225	0.3426	0.3878	0.4752
46	1.0985	0.1731	0.9971	0.7838	0.2579	0.7301	0.3365	0.3781	0.4679
46	1.099	0.1774	0.747	0.8063	0.2646	0.7291	0.3223	0.385	0.4437
46	1.0957	0.2246	0.6504	0.7888	0.2397	0.7448	0.3329	0.3782	0.4617
47	1.2091	0.893	1.5749	1.3434	0.8582	1.053	0.8851	0.9587	1.0451
47	1.267	0.9164	1.1064	1.3416	0.8246	1.0387	0.8754	0.9293	1.0401
47	1.2854	0.9587	1.0489	1.3752	0.5499	1.0697	0.8576	0.9693	1.0446
47	0.4996	0.9636	1.1065	1.33	0.8319	1.0352	0.877	0.9987	1.0723
49	1.3497	1.1106	1.1197	1.2524	0.8934	1.2983	1.0018	0.9631	1.0384
49	1.3386	1.1805	1.0312	1.1728	0.7998	1.2731	1.0205	0.9482	1.0892
49	1.3638	1.2033	0.9386	1.2187	0.8821	1.2402	0.9828	0.9578	1.06
49	1.3707	1.2082	0.9623	1.1636	0.9899	1.2109	1.0101	3.026	1.072
50	1.214	0.5552		1.161	0.6027	1.0091	0.7349	0.7472	0.7693



50	1.2909	0.5406	1.1704	1.1488	0.6008	1.0009	0.7562	0.7284	0.7729
50	1.2417	0.5941	0.9704	1.1229	0.5953	1.0239	0.7498	0.72	0.7801
50	1.2353	0.544	0.9405	1.1042	0.6251	1.0085	0.7634	0.7206	0.7719
51	1.0021	0.325	0.9524	1.0131	0.7122	1.082	0.7363	0.7077	0.8819
51	0.9978	0.3825	1.0923	1.0286	0.7159	1.0626	0.7285	0.6863	0.8863
51	1.0274	0.5023	0.9563	0.9788	0.7011	1.0641	0.7332	0.7095	0.7932
51	1.0429	0.3255	0.9818	1.0258	0.6694	1.0428	0.7391	0.7169	0.8955
52	0.9205	0.1715	0.5884	0.6724	0.2433	0.8232	0.3468	0.3023	0.3569
52	0.9279	0.1716	0.6039	0.7058	0.268	0.8324	0.3662	0.304	0.3767
52	0.8559	0.1787	0.6096	0.6883	0.2737	0.8	0.3468	0.3077	0.3412
52	0.9773	0.178	0.6191	0.7037	0.2514	0.8293	0.3829	0.3303	0.3402
53	1.3408	0.3524	1.3583	1.007	0.2198	1.0246	0.3886	0.389	0.3943
53	1.3352	0.3772	1.481	1.0271	0.1906	1.1578	0.3995	0.4098	0.3856
53	1.3539	0.3368	1.5443	1.006	0.1911	1.1063	0.3774	0.3977	0.3988
53	1.3666	0.357	2.1121	1.0409	0.2746	1.0112	0.3835	0.4268	0.398
54	1.1043	0.6192	1.1075	1.0631	0.5935	1.0918	0.7904	0.7208	0.9571
54	1.1036	0.6439	0.8705	1.0785	0.5677	1.103	0.7864	0.733	0.9718
54	1.169	0.6356	0.963	1.1079	0.6022	1.0952	0.7643	0.7239	0.9359
54	1.1129	0.6333	1.0022	1.0799	0.5995	1.1067	0.7617	0.7481	0.9276
55	0.9114	1.1152	1.5313	0.9749	0.7107	1	0.7094	0.8379	1.0688
55	0.8782	1.1662	1.3577	1.002	0.6806	1.0177	0.7108	0.8494	1.0817
55	0.9256	1.119	1.373	0.96	0.7201	1.0036	0.742	0.7955	1.0658
55	0.9055	1.1498	1.3074	0.9849	0.7718	1.0709	0.7467	0.8107	1.0931
56	0.3821	0.5025	0.5006	0.8653	0.2239	0.5359	1.3846	1.2531	0.7203
56	0.4101	0.2242	0.5723	0.8596	0.2304	0.5564	1.3805	1.2702	0.7351
56	0.3924	0.1776	0.5168	0.7994	0.2334	0.5394	1.4261	1.281	0.7015
56	0.4027	0.1929	0.5193	0.8305	0.2706	0.5316	1.4196	1.265	0.7326
57	0.9683	0.5842	1.0187	2.1671	0.7249	1.4327	1.7681	1.3537	1.3079
57	0.9762	0.6013	1.0488	2.1933	0.6766	1.423	1.7727	1.3543	1.3332
57	0.9915	0.5597	1.0224	2.1943	0.6728	1.376	1.6883	1.3669	1.2924
57	1.0007	0.5571	0.9846	2.0902	0.6521	1.3257	1.7151	1.3754	1.3286
58	1.083	0.9434	1.9004	1.2902	0.5233	1.1099	0.7529	0.6271	0.9534
58	1.0514	0.9131	1.6745	1.3766	0.4896	1.0955	0.7533	0.6316	0.9707
58	1.0325	0.7542	1.6589	1.3932	0.11	1.0174	0.757	0.6657	0.9426
58	1.0851		1.5463	1.34	0.1759	1.0597	0.6762	0.6368	0.9744
60	1.0656	0.758	1.0162	1.7286	0.9717	1.2403	1.5661	1.0179	1.1619
60	1.1033	0.7346	1.0157	1.731	0.9655	1.2403	1.5688	1.0423	1.1165
60	1.0954	0.788	1.0014	1.7644	0.9999	1.2378	1.6351	1.0414	1.1296
60	1.0726	0.7459	1.0294	1.7557	0.9624	1.216	1.6205	0.9879	1.1445
61	1.0447	0.4488	0.6576	0.9221	0.5924	1.1086	0.7076	0.6632	0.7586
61	1.0521	0.4557	0.8065	0.9379	0.3779	1.1397	0.7203	0.6627	0.7462
61	1.053	0.4455	1.1037	0.9289	0.3771	1.1195	0.6692	0.6815	0.7493
61	1.0548	0.4409	1.1432	0.9421	0.6716	1.2384	0.6853	0.6935	0.7777
62	1.2493	1.0202		1.1221	0.6975	1.163	0.83	0.8524	1.032
62	1.1893	0.9857	1.0675	1.1109	0.4388	1.1338	0.8191	0.3534	1.0193
62	1.223	1.0094	0.9889	1.0906	0.4072	1.0936	0.8316	0.8638	1.0438
62	1.2241	0.9951	0.8968	1.0718	0.1938	1.1042	0.832	0.8584	1.0477
63	1.0608	1.0235	1.2929	1.097	0.915	1.4056	1.0445	0.8739	1.3413
63	1.0571	1.0117	1.2771	1.0939	0.9169	1.3899	1.1001	0.8855	1.3519
63	1.0848	1.0337	1.31	1.1224	0.9159	1.4214	1.1134	0.8529	1.3838
63	1.0623	1.0157	1.2422	1.1078	0.9288	1.4086	1.0977	0.8755	1.317
64	1.0212	0.5795	1.2406	1.0339	0.1136	1.2077	0.5511	0.6908	0.9154
64	1.0301	0.5501	1.1795	1.016		1.2167	0.5565	0.6416	0.93
64	1.0245	0.4237	1.3032	0.9964		1.1045	0.5707	0.6668	0.9812
64	1.0448	0.2714	1.3133	1.0332		1.1604	0.5464	0.7034	0.9494
65	0.8405	0.5503	0.8003	0.8011	0.4854	0.6757	0.6466	0.5605	0.7132
65	0.8997	0.5567	0.9612	0.8193	0.4976	0.7207	0.6498	0.5485	0.6881
65	0.8768	0.5359	0.8314	0.8487	0.5064	0.6934	0.6556	0.5886	0.7061
65	0.8442	0.4924	0.8365	0.8344	0.5029	0.7294	0.6653	0.5581	0.703
66	1.2153	1.3485	1.193	1.1948	0.8813	1.2152	1.3981	0.9119	1.2186

66	1.2466	1.2969	0.9972	1.1867	0.7041	1.2208	1.3647	0.8908	1.1545
66	1.2443	1.3563	1.1557	1.2081	0.7898	1.252	1.3469	0.8851	1.3093
66	1.2257	1.2997	1.1174	1.1553	0.6591	1.1959	1.3356	0.9234	1.2261
69	1.2481	0.2629	0.8897	1.0122	0.2767	0.8195	0.3502	0.3047	0.3101
69	1.2218	0.2609	0.8063	0.9574	0.2735	0.89	0.3391	0.3217	0.3295
69	1.2372	0.2728	0.4425	0.9765	0.2645	0.8517	0.3468	0.3382	0.3141
69	1.2281	0.2731	0.4295	0.9438	0.1833	0.8219	0.3424	0.3175	0.305
70	0.5179		0.8112	0.4978		0.5135	0.2303	0.3055	0.4384
70	0.4774		1.1255	0.4919		0.5055	0.2328	0.3002	0.4579
70	0.5122		0.9513	0.498		0.5211	0.2422	0.2976	0.4705
70	0.4937		1.0243	0.499		0.5017	0.2439	0.2938	0.4725
71	0.1707		4.2402	0.5517		0.6111	0.1363	0.1679	0.3097
71	0.4135		0.6588	0.4492		1.2362	0.1248	0.1633	0.2505
71	0.4183		2.1801	0.5628		0.2701	0.1248	0.1616	0.2657
71	0.4355		1.0403	0.5213		1.2533	0.1384	0.1575	0.253
14-1	1.1512	0.507	4.4037	1.0769	0.5223	0.8596	0.5134	0.6553	0.3064
14-1	1.1834	0.5649	2.4972	1.0088	0.0181	0.9436	0.5508	0.6559	0.5437
14-1	1.1346	0.5078	1.8442	1.1457		0.9718	0.4936	0.5981	0.5522
14-1	1.1612	0.3107	1.9408	1.1135		0.8607	0.438	0.6545	0.2292
14-2	1.299	0.3386	1.4942	1.1179	0.524	0.9355	0.5769	0.6716	0.6139
14-2	1.2779	0.2041	2.4554	1.1237	0.4636	0.9499	0.6395	1.0614	0.6079
14-2	1.3974	0.3669	1.8517	1.1158	0.4645	0.9903	0.5878	0.6273	0.6107
14-2	1.4125	0.4554	1.797	1.1478	0.4281	0.9019	0.499	0.6438	0.6192
14-3	1.4636	0.4136	3.3925	1.0132	0.1656	0.9126	0.5594	0.6001	0.6066
14-3		0.4289	1.638	1.1204	0.1672	0.8484	0.5733	0.6194	0.6091
14-3		0.3941	1.4531	0.9658	0.1421	0.9214	0.5991	0.6024	0.6314
14-3		0.4109	1.5282	1.1146	0.1791	0.8924	0.5471	0.6348	0.6088
14-0	1.0455	0.677	3.3473	2.0431	0.5981	0.7041	0.9635	1.396	0.5836
14-0	1.317	0.547	2.6556	2.1665	0.6966	0.8221	0.3317	0.5828	0.5332
14-0	1.0179	0.5111	1.904	1.7615	0.4943	0.7431	0.1888	0.5708	0.552
14-0	1.1255	0.476	4.2704	3.0243	0.7557	0.7747	0.3106	0.6289	0.5979
56-0	0.3575	0.2751	0.5342	0.8179	0.233	0.4664	1.3946	1.332	0.7585
56-0	0.3617	0.4928	0.4973	0.7992	0.2245	0.4842	1.4199	1.3258	0.7666
56-0	0.3981	0.3528	0.48	0.8769	0.1972	0.4816	1.4788	1.2202	0.7762
56-0	0.3904	0.3234	0.5127	0.8156	0.2263	0.4937	1.4849	1.3405	0.7564
56-1	0.413	0.4265	0.2382	0.8563	1.0078	0.6047	1.4924	2.6045	0.7431
56-1	0.407	0.3806		0.8583	0.9902	0.6132	1.4959	1.4843	0.7699
56-1	0.4005	0.3877	0.6712	0.8755	0.9667	0.6334	1.4902	1.4438	0.7499
56-1	0.4011	0.4141	0.6096	0.8557	0.9763	0.6328	1.4839	1.3831	0.7588
56-2	0.3947	0.3564	0.513	0.8527	0.8767	0.6518	1.4702	1.2682	0.8252
56-2	0.3948	0.3488	0.5615	0.8742	0.9044	0.5674	1.5293	1.3076	0.7948
56-2	0.4009	0.3686	0.5602	0.8703	0.833	0.5814	1.5518	1.3522	0.8029
56-2	0.4032	0.3233	0.5375	0.8275	0.8952	0.5645	1.4224	1.3255	0.7882
K 1	0.5951	0.9642	1.412	0.6013	0.2572	2.2451	0.8911	0.3144	1.3327
K 1	0.5958	0.9399		0.4538	6.7402	1.4832		0.4434	0.5175
K 1	0.5212	0.8846	1.7906	0.5543	0.8401	0.7764	1.144	0.3863	0.438
K 1	0.3244	0.8315		0.5223	4.1647	0.7504	0.6505	0.942	0.4353
K0	0.4339	0.9565		1.2294	0.0385		0.2378		0.3682
K0				0.5496	0.0318	0.5539	0.4457	0.4976	0.3929
K0	1.0025	0.7693		0.4399	0.0379	1.2182	0.6628	0.4501	0.1678
K0	0.7772			0.4656	0.0421	0.6528	0.4155	0.5811	0.3743
K10	0.6826	0.8747	3.1676	0.6382	0.7576	0.9546	0.456	0.5139	0.7477
K10	0.66	0.8731		0.7173	0.7559	0.9469	0.5143	0.535	0.7206
K10	0.7557	0.827	2.5522	0.7089	0.7765	0.8754	0.4524	0.4711	0.767
K10	0.6539	0.8778	2.1592	0.6488	0.78	0.9197	0.4934	0.5059	1.051
K2	0.6601	0.844		0.5447	0.4881	1.6418	0.2917	0.4393	0.3108
K2	0.5289	0.8203		0.5717	0.6204	0.9497	0.3638	0.4318	0.7563
K2	0.5362	0.8108		0.57	0.6421	0.8624	0.4408	0.4221	0.6277
K2	0.5463	0.7597		0.5038	0.5502	2.0235	0.2985	0.4495	0.794
K4	0.5857	1.0744		0.5528	0.8201	0.6664	1.9174	1.4893	0.4854

K4	0.6001	0.7924		0.7927	0.9848	0.5982	0.6843	0.4355	0.5483
K4	0.5581	0.8048	1.0967	0.5398	0.9736	0.7117	0.9766	0.5518	0.5773
K4	0.6497	1.0956	0.502	0.6112	0.8995	0.7846	1.2099	0.4769	0.5345
K6	0.6533	0.9801	0.9415	0.6843	0.7955	0.9524	0.4113	0.4104	0.6292
K6	0.6205	0.8959	0.9173	0.5812	0.7745	0.7986	0.3501	0.4213	0.6576
K6	0.6552	0.8169	3.4859	0.6083	0.7574	0.88	0.3518	0.4133	0.5303
K6	0.8401	0.9428		0.6232	0.8382	0.7311	1.0662	0.5879	0.5952
SP-1							0.2386		
SP-1				0.611		0.4746			
SP-1	0.349			0.6012					
SP-1									
SP-2	0.3928								
SP-2	0.7868			0.5073	0.2512				
SP-2	0.6438								
SP-2	1.066								
SP-3			1.6306						
SP-3									
SP-3			1.6293						
SP-3									

Fluoranthen														
Konz.	0.5 mg/ l						0.1 mg/ l				0.02 mg/ l			
Gene ID	1	1	1	2	3	10	4	5	6	10	7	8	9	10
1	0.4257	0.1803	0.3874	0.6522	0.9301	0.284	0.1566	0.5989	0.3272	0.1631	0.7226	0.2667	0.3902	0.0907
1	0.4112	0.1523	0.4705	0.6286	0.7349	0.345	0.1717	0.6886	0.3282	0.1532	0.8144	0.2695	0.3341	0.1084
1	0.3628	0.1868	0.3908	0.7755	0.6285	0.395	0.2222	0.7015	0.3399	0.1547	0.7458	0.2736	0.3664	0.1048
1	0.446	0.192	0.3998	0.939	0.6207	0.512	0.1778	0.7539	0.3215	0.153	0.8481	0.2411	0.4133	0.0927
2	0.7614	0.3824	0.446	1.085	0.8183	0.517	0.1988	1.2969	0.9766	0.3244	1.5987	0.5173	0.3704	0.138
2	0.836	0.4011	0.4413	0.9812	0.8497	0.559	0.1992	1.3738	0.9975	0.2674	1.6619	0.5244	0.3335	0.1321
2	0.9207	0.4432	0.558	1.3626	0.9149	0.647	0.1954	1.3189	0.9539	0.2749	1.3831	0.5378	0.7031	0.1467
2	1.1635	0.4079	0.6297	1.6905	1.8331	0.679	0.1802	1.4392	0.8453	0.1877	1.6827	0.5022	0.6944	0.253
4	1.0912	0.5648	0.8407	0.7379	0.603	0.821	0.2835	0.6424	0.5841	0.3191	0.9539	0.4717	0.3227	0.3734
4	1.1279	0.5441	0.856	0.6076	0.4654	0.757	0.2226	0.7549	0.576	0.2438	1.1165	0.3534	0.3975	0.4125
4	1.1483	0.5789	0.8519	0.5859	0.4954	0.788	0.2325	0.6873	0.5175	0.2253	1.0467	0.4843	0.4546	0.2476
4	1.5062	0.6586	0.719	0.6806	0.6078	0.853	0.2888	0.8062	0.5518	0.1822	1.2392	0.5348	0.4002	0.2166
5	0.5171	0.2506	0.3846	0.3783	0.4788	0.425	0.1479	0.448	0.249	0.5076	0.8435	0.2041	0.3195	
5	0.3597	0.2849	0.4062	0.4817	0.5542	0.432	0.1559	0.4927	0.3512	0.4815	0.9399	0.2486	0.304	
5	0.442	0.2775	0.5115	0.4345	0.4462	0.441	0.1491	0.435	0.2633	0.4691	0.8786	0.3137	0.3206	
5	0.4512	0.2594	0.5323		0.4903	0.439	0.1529	0.4345	0.2839	0.465	0.8305	0.292	0.3983	
7	2.4582	0.6515	1.7211	0.6501	0.538	1.502	0.2773	0.4506	0.3854	0.422			0.3027	0.1681
7	2.723	0.4496	1.9139	0.6355	0.3846	1.440	0.2502	0.456	0.3657	0.4453	0.4909		0.301	0.1688
7	2.9032	0.4352	2.1878	0.6465	0.4427	1.392	0.2425	0.4664	0.3623	0.4682	0.4029		0.2846	0.1574
7	2.783	0.5225	2.0084	0.7417	0.4857	1.547	0.2582	0.5419	0.4171	0.4714			0.3579	0.1803
8	2.4282	0.9623	2.9634	1.4701		1.348	0.5591	0.9068	0.332	0.6102	0.9304	0.5672	0.4638	0.3028
8	2.286	0.9814	2.5396	1.2171	1.248	1.301	0.4889	0.8234	0.6735	0.5971	1.1034	0.6126	0.5628	0.3023
8	2.4899	0.9595	2.6775	1.5843	1.4281	1.361	0.5125	0.7422	0.6947	0.566	0.9053	0.5894	0.5208	0.2853
8	2.5494	1.0792	2.5948	1.9611	1.5461	1.351	0.5679	0.7642	0.7588	0.5757	0.9784	0.6545	0.637	0.2957
9	9.0522	4.5093	8.511	2.3187	1.6626	2.095	0.7368	0.5733	0.6673	1.3763	1.2161	0.8682	0.8315	0.6493
9	8.5641	4.9871	8.4816	2.9746	1.5301	2.152	0.7197	0.5026	0.6812	1.3465	1.1857	0.8358	0.7867	0.5481
9	9.4883	4.631	8.7709	2.8862	1.3876	2.146	0.7249	0.5903	0.7728	1.3425	1.1513	0.7786	0.7313	0.4958
9	10.2271	4.942	9.2066	1.562	1.4595	2.166	0.8552	0.5797	0.7729	1.3166	1.0566	0.8403	1.8855	0.5188
10	0.5058	0.361	0.6725	0.403	0.2032	0.797	0.7599	0.5363	0.5656	0.6191	0.5847	0.5034	0.3391	0.2902
10	0.4676	0.3945	0.6459	0.476	0.2207	0.958	0.7173	0.5317	0.4577	0.4648	0.7777	0.495	0.3019	0.2775
10	0.477	0.4278	0.8102	0.3249	0.2089	0.902	0.636	0.4767	0.4981	0.431	1.7411	0.5509	0.269	0.2328
10	0.4737	0.4843	0.6353	0.2915	0.2362	0.892	0.8066	0.5563	0.5437	0.4361	0.6274	0.4954	0.3068	0.2806
11	0.6943		0.6314	0.4779	0.5441	0.454					0.1081			0.1789
11	0.8237		0.6217		0.4672	0.426					0.1565			0.2382
11	0.7146		0.6626	0.4468	0.3245	0.365					0.102			0.1312
11	0.8502		0.4997	0.5705	0.5643	0.395					0.1135			0.2102









56-1	0.6483	0.4603	0.6149	0.1408	0.1571	0.300	0.0271	0.5014	0.2072	0.218	0.8221	0.4257	0.4983	0.2585
56-1	0.6493	0.4209	0.5905	0.1231	0.1772	0.286	0.0281	0.5146	0.1944	0.2111	0.8115	0.4351	0.5534	0.2533
56-1	0.6328	0.4955	0.6027	0.1121	0.178	0.285	0.0267	0.4964	0.1924	0.2169	0.7957	0.4274	0.4759	0.2584
56-1	0.6686	0.4785	0.5497	0.1191	0.1574	0.293	0.0286	0.4922	0.1996	0.2182	0.7282	0.418	0.4558	0.2547
56-2	0.4147	0.4933	0.6078	0.1632	0.1429	0.305	0.0523	0.5833	0.2232	0.2263	0.7393	0.6662	0.7174	0.2589
56-2	0.4335	0.4757	0.5403	0.1769	0.2009	0.306	0.0256	0.5693	0.2071	0.2236	0.7626	0.764	0.7374	0.2563
56-2	0.5195	0.455	0.6352	0.1671	0.1527	0.301	0.0443	0.5652	0.2578	0.2275	0.7361	0.6702	0.7739	0.2434
56-2	0.4039	0.4593	0.5627	0.1846	0.2428	0.303	0.0424	0.5965	0.3212	0.2234	0.6947	0.6661	0.6541	0.2547
K 1		0.2108				0.184	0.164			0.1164	0.6845			0.0843
K 1		0.216				0.211	0.121			0.1078	0.6259			0.0744
K 1		0.2278				0.247	0.1246			0.1206	0.5551			0.0619
K 1		0.2285				0.238				0.1331	0.6865			0.0683
K0		0.3859				0.224	0.0849			0.097				0.0732
K0	0.7144	0.5078				0.128	0.0751			0.1145				
K0	0.7556	0.3802				0.195	0.0535			0.1531				0.0892
K0		0.3837				0.257	0.0636			0.1029				0.1058
K10	0.7635	0.624	0.6491	1.1995	1.4104	0.283	0.4474	1.1625	0.5802	0.2684	1.7456	0.8477	0.8219	0.2012
K10	0.5738	0.5967	0.5767	1.1539	1.5024	0.276	0.4906	1.1444	0.4956	0.3023	1.8955	0.7773	0.5736	0.2048
K10	0.7831	0.5796	0.6181	1.0498	1.3512	0.291	0.4556	1.3133	0.4878	0.2722	1.9001	0.8444	0.5842	0.2062
K10	0.7364	0.6601	0.649	1.0092	1.3649	0.295	0.4572	1.2291	0.5383	0.32	1.7426	0.8834	0.5373	0.1973
K2	0.5813	0.2337	0.3067		0.8114	0.241	0.0725	0.3872		0.2725	0.7983			0.0957
K2	0.5783	0.2397	0.3321	0.4155	0.9114	0.144	0.0714	0.3464		0.1667	0.785			0.0932
K2	0.5611	0.2068	0.3855	0.4996	0.7424	0.193	0.0758	0.3672		0.3364	0.6936			0.0902
K2	0.6888		0.4488			0.168	0.0883			0.1627	0.5726			0.091
K4	0.5183	0.3608	0.4163	0.6659	0.8439	0.182	0.2915	0.5654		0.1797	1.0114	0.5432	0.2911	0.0817
K4	0.5459	0.3684	0.3422	0.5809	0.7449	0.176	0.2857	0.4674		0.209	1.0673	0.4874	0.354	0.0748
K4	0.6852	0.4237	0.8186	0.6168	0.863	0.135	0.2374	0.461	0.4089	0.1669	0.9823	0.5574	0.3447	0.077
K4	0.5381	0.3826	0.6506	0.5773	0.8288		0.2321	0.5116	0.3978	0.1465	1.059	0.5118	0.4207	0.0747
K6	0.6481	0.4584	0.4936	0.6338	1.0004	0.195	0.2956	0.4931	0.4737	0.2476	1.1003	0.6331	0.3909	0.1256
K6	0.6257	0.5058	0.5008	0.6701	1.086	0.168	0.2853	0.586	0.4404	0.2705	1.1138	0.5978	0.4166	0.124
K6	0.5799	0.5249	0.4297	0.7996	1.1361	0.188	0.3113	0.5815	0.4539	0.231	1.1371	0.647	0.4837	0.1206
K6	0.5747	0.5401	0.4319	0.7285	1.0394	0.180	0.3087	0.5714	0.4629	0.2548	1.1266	0.7193	0.3756	0.118
SP-1														
SP-1														
SP-1								0.5973						
SP-1														
SP-2														
SP-2						0.276								
SP-2						0.338								
SP-2														
SP-3	0.4356		0.3169	0.5359										
SP-3				0.6914										
SP-3				0.5958										
SP-3				0.5493										

Clofibrat								
Konz.	10 mg/l			2 mg/l			0,4 mg/l	
Gene ID	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1.1228	0.234		0.513	0.3869	0.1792	0.4748	1.614
1	0.6307	0.2275	0.0275	0.2933	0.3255	0.1928	0.5476	1.6658
1	0.4949	0.1931		0.1354	0.3368	0.2648	0.5739	1.2885
1	0.5762			0.1069	0.3427	0.2643	0.5552	1.559
2	0.8411	0.3339		0.4234	0.4966	0.6149	0.3197	1.5227
2	0.7932	0.368		0.3842	0.3037	0.6844	0.3571	1.5091
2	0.7801	0.396		0.4235	0.6449	0.9057	0.4675	1.4999
2	0.9759	0.4507	0.0861	0.4148	0.7334	1.1949	0.5354	1.4297
4	0.6586	0.1761		0.7203	0.1106	0.3503	0.3504	2.5851
4	0.7941	0.1985	0.0271	1.016	0.2227	0.367	0.3734	2.1971
4	0.7765	0.2038		1.101	0.2786	0.3787	0.3097	2.5413



4	0.6548	0.2267		1.1101	0.3712	0.5136	0.3729	2.8804
5	0.8173	0.6216	0.4777	0.8013	0.2635	0.354	0.836	0.492
5	0.8486	0.6592	0.3927	0.8307	0.263	0.3642	0.7816	0.4973
5	0.8935	0.6535	0.3571	0.9494	0.2531	0.4021	0.687	0.5287
5	0.8526	0.6718	0.342	0.9521	0.3185	0.5931	0.5858	0.5754
7	0.1308	0.304	0.4106	0.5214	0.1473	0.5787	0.9454	0.2422
7	0.1368	0.3596	0.3648	0.2622	0.1486	0.6292	0.853	0.2438
7	0.1414	0.3918	0.3926		0.1469	0.5668	1.0191	0.1894
7	0.206	0.2562	0.4655	0.1086	0.1616	0.7748	1.0235	0.1843
8	0.2433	0.5648		0.686	0.2129	1.0146	0.903	2.7196
8	0.2367	0.5531		0.4625	0.2664	1.4586	0.7093	2.7798
8	0.3431	0.6679		0.7135	0.2727	1.3301	0.8735	2.7033
8	0.4097	0.8012		1.0515	0.3176	1.4404	0.9709	2.7053
9	0.519	0.8302	0.3656	0.9504	0.4468	0.9652	1.9482	0.6267
9	0.6274	0.5899	0.2565	0.9777	0.4231	0.9339	1.7272	0.5888
9	0.621	0.4662	0.2431	1.0831	0.4753	1.0851	1.269	0.5256
9	0.7289	0.6398	0.2885	1.1169	0.5097	1.3014	1.35	0.478
10		0.8923	0.3179	0.6299	0.2422	0.2854	0.8943	0.8079
10	0.3981	0.8635	0.2149	0.2149	0.1903	0.7276	0.9077	0.7938
10	0.4588	1.0067	0.1436	0.9274	0.1783	0.9088	0.8026	0.9477
10		0.9812	0.1686	0.9524	0.0598	0.7154	0.8405	1.0349
11		0.2115		0.8038	0.5887	0.4337	0.2428	0.5304
11		0.2155			0.8907	0.5291	0.4724	0.8912
11		0.1604	0.4448		0.6298		0.3284	0.4481
11					0.5928		0.5358	0.8711
12	0.0794	0.1411		0.686	0.0842	1.3353	0.3769	6.9512
12		0.1606		0.8578	0.1323	0.8111	0.4001	7.1572
12		0.1938		0.7396	0.3716	0.8941	0.4287	7.3966
12		0.1543		0.871	0.5109	0.8874	0.5864	7.8402
13	2.123	1	0.2745	0.83	0.9618	0.3659	1.2818	1.7881
13	2.0188	1.2997	0.3136	0.9144	0.9379	0.3961	1.1827	1.8121
13	2.2069	1.4094	0.19	0.8886	1.0791	0.3779	1.3471	1.8469
13	2.1652	1.2346		0.7682	1.2979	0.3772	1.268	
14	1.5612	0.3175	0.055	0.7959	0.2135	0.4911	0.9779	0.5958
14	1.8412	0.329		0.657	0.1616	0.4068	0.9878	0.5863
14	1.6888	0.3346		0.7282	0.1308	0.3773	0.8409	0.5816
14	1.79	0.3213		0.7685	0.1929	0.3919	0.7721	0.6591
15	0.152	2.4088		0.5557	0.4639	1.0987	1.1488	1.0139
15	0.1216	1.7032			0.3916	1.3601	0.5474	1.1336
15	0.1057	0.7081			0.8785	1.6021	0.828	1.0086
15	0.1877	0.7583			0.3909	1.1735	0.8853	1.0005
16	0.0669	0.1884		0.6896	0.1316	0.6944		2.1936
16	0.0289	0.184		0.6702	0.1236	0.6905	0.2993	1.6114
16	0.0675	0.2159		0.6941	0.1215	0.7112	0.6338	1.1116
16	0.0462			0.6274	0.1506	0.7857	0.6773	0.9387
17	1.0077	0.8172	0.5778	1.3831	0.6427	4.2931	1.2146	0.7122
17	0.9978	0.6649	0.4711	1.4354	0.6467	3.8402	1.1571	0.7347
17	1.0264	0.6617	0.4266	1.3836	0.657	7.7101	1.1214	0.6885
17	0.9879	0.6264	0.5474	1.4078	0.7091	5.9031	1.1959	0.6996
18	0.3227			1.0505	0.1489	1.6107	0.6603	28.6558
18	0.2557			1.0139	0.1501	1.1463	0.6139	26.6436
18	0.3421			0.9285	0.1297	1.2941	0.7313	20.8669
18	0.3414			0.895	0.1138	1.1942	0.6847	20.9009
19	0.3867	0.4219	0.9911	0.4882	0.5561	1.519	1.007	1.1717
19	0.3412	0.4398	0.9366		0.546	1.5601	0.9211	1.0222
19	0.3042	0.3932	0.9895	0.0979	0.5443	1.7284	0.9344	1.0343
19	0.3189	0.4089	1.0464	0.0786	0.6157	1.9467	0.9523	0.9068
20	0.7096	1.7507	0.3703	0.9636	1.0253	1.4263	1.2327	1.1895
20	0.7551	1.258	0.3131	0.9005	0.9346	1.5537	1.1786	1.1803
20	0.9136	1.3326	0.3522	0.8811	1.2267	1.642	1.0322	1.0777

20	0.9879	1.1934	0.3438	0.8105	0.9624	1.3684	1.1129	1.1287
21	0.6284	0.1983	0.1733	0.7326	0.2731	0.6451	0.3361	1.5559
21	0.6405	0.1969	0.2135	0.5597	0.2904	0.6919	0.2288	1.5482
21	0.6303	0.1972	0.2544	0.4537	0.2787	0.6573	0.3355	1.4688
21	0.7265	0.2037	0.2868	0.4645	0.2959	0.6879	0.2812	1.5746
22	1.0862	0.3776	1.3718	0.9973	1.0607	4.1708	0.8403	2.3105
22	1.0204	0.3959	1.5774	0.9811	1.1204	4.1104	0.8169	2.4515
22	1.0322	0.4047	1.2294	0.9738	1.1825	3.2923	0.91	2.3546
22	0.9841	0.4349	1.739	1.0342	1.253	3.8725	0.8917	2.4995
23	0.3374	0.1397		0.4444	0.1571	0.1233	0.622	0.945
23	0.3994	0.1304		0.2362	0.1543	0.15	0.5835	0.8806
23	0.3418	0.0331			0.1521	0.1345	0.5775	0.7064
23	0.2284				0.1542	0.1583	0.5795	0.7536
24	0.8242	0.9851	0.6998	0.8371	0.6895	1.2393	1.1532	
24	0.7733	0.9929	0.8472	0.8507	0.7239	1.3013	1.2272	0.5495
24	0.8373	0.8435	0.8661	0.7862	0.7519	1.4197	1.179	0.4987
24	0.8758	0.9587	0.9182	0.7833	0.767	1.3478	1.1415	0.3951
25	0.4219	0.4081	0.3733	0.9602	0.6252	0.8846	1.024	1.3846
25	0.4134	0.3968	0.3607	0.9726	0.6546	0.76	0.9075	1.3276
25	0.403	0.3932	0.3839	0.9329	0.6915	0.7992	0.9496	1.398
25	0.4024	0.4334	0.4908	0.9459	0.7221	0.7114	0.9528	1.301
26	0.8097	0.4169		0.6013	0.8652	1.3298		0.6286
26	0.9312	0.5852		0.5131	0.2678	1.0875		0.6658
26	0.7522	0.5861		0.4071	2.304	1.5093		0.6377
26	0.8368	0.7409		0.5183	1.5133	1.0948	0.2518	0.6281
27	0.4922	0.1684		0.5221	0.2733	1.1546	0.6269	0.7781
27	0.4614	0.18		0.3557	0.2582	1.1328	0.5746	0.8217
27	0.5409	0.1818	0.0212	0.428	0.2387	1.2329	0.5631	0.831
27	0.6015	0.0457	0.0991	0.0922	0.0901	1.4075	0.6331	0.8168
28		0.2198		0.1071	0.1649		0.2171	0.3978
28	0.0552	0.1404		0.2171	0.1473	0.2446	0.1567	0.3548
28	0.0857	0.2013		0.2602	0.1511	0.2934	0.2285	0.4
28	0.0621	0.2889		0.3402	0.1931	0.3549	0.2586	0.3498
29	0.6266	0.3413	0.1032	0.6353	0.3855	0.4737	0.5598	2.011
29	0.7509	0.3075	0.0577	0.7182	0.4655	0.4468	0.4071	2.076
29	0.5927	0.1738	0.0664	0.9085	0.4527	0.4769	0.38	2.1368
29	0.7367	0.3928	0.0632	0.7884	0.62	0.5302	0.3806	2.2246
30	0.1125	0.2487		0.3785	0.1007	0.2705		0.2311
30		0.2507		0.3067	0.0924	0.2532		0.2222
30	0.1682	0.2505		0.3238	0.0811	0.2615		0.3028
30	0.2055	0.2561		0.3977	0.0931	0.3189		0.2928
31	1.3503	0.1899	1.1467	0.4982	0.8169	1.5658	0.5446	2.5313
31	1.4172	0.1667	1.2486	0.2679	0.7461	1.6085	0.5209	2.6315
31	1.9655	0.1737	1.3259		0.1913	1.7092	0.5021	2.547
31	1.8582	0.1704	1.6109	0.1526	0.9572	1.7173	0.4838	2.5328
32	0.2615	0.3174	0.1267	0.7711	0.3534	0.7273	0.7802	2.2635
32	0.0437	0.3212	0.118	0.7758	0.3639	0.6863	0.7787	2.2295
32	0.0251	0.3108	0.0864	0.7982	0.3507	0.7455	0.807	2.0889
32	0.0905	0.3593	0.1702	0.7866	0.4339	0.8162	0.806	2.1326
33	1.1723	0.7022	0.9822	0.9662	2.1094	0.9661	0.9279	0.9876
33	1.1044	1.0962	0.9793	0.988	2.0681	1.023	1.0475	0.9828
33	1.0681	1.0812	1.0299	1.0294	2.1091	0.9902	1.0447	0.9948
33	1.0509	1.1383	1.0241	1.0136	2.079	1.0264	1.0215	1.0251
34	0.4601	0.6204		1.1159	0.1449	0.6874	0.7439	0.7624
34	0.3602	0.6042		1.2899	0.1426	0.5325	0.5633	0.7509
34	0.4101	0.6839		1.048	0.1324	0.5119	0.5547	0.7954
34	0.5437	0.7503		1.1148	0.0972	0.7513	0.5261	0.8237
35		0.0483		0.9355	1.279	0.618	0.552	33.3608
35	0.088	0.0449		0.1013	1.3034	0.6043	0.6533	26.1976
35	0.1059	0.032		0.0876	1.2276	0.6558	0.8189	25.676

35	0.1065	0.0142		0.1035	1.2086	0.6747	0.9423	28.4439
36	0.153			1.3766	1.6084	1.078	1.2015	10.4388
36	0.1167	0.0527		1.3655	0.9365	1.4484	1.225	13.6458
36	0.1692			1.391	1.1038	1.1069	1.0018	20.7169
36	0.1858	0.0341		1.4235	1.854	1.2745	1.3019	28.8172
37	0.8752	0.7504	0.9306	1.0324	0.9527	1.6032	1.1893	2.0704
37	0.8487	0.743	0.9036	1.0121	0.9719	1.5602	1.2222	1.9539
37	0.8389	0.7518	0.8977	0.9925	0.9702	1.5423	1.1733	1.9491
37	0.845	0.7554	0.9199	1.0112	0.9887	1.5559	1.207	1.9592
38	0.8562	0.3521	1.6067	0.419	0.7119	2.152	0.2565	1.8283
38	1.6862	0.3945	1.7549	0.4368	0.6653	2.197	0.3079	1.782
38	1.5479	0.4333	1.6228	0.4353	0.2348	2.474	0.3184	1.7996
38	1.5206	0.362	1.5842	0.4293	0.7306	2.3277	0.4106	1.9922
39	1.9021	0.2455	0.7195	0.2669	0.1517	0.4736	0.3737	0.4978
39	1.0087	0.2308	0.7334	0.2385	0.1489	0.4782	0.3975	0.5065
39	1.21	0.2607	0.7791	0.1341	0.1528	0.5193	0.3889	0.5592
39	0.5313	0.1965	0.8994	0.127	0.1661	0.4911	0.3928	0.2972
41	0.248	0.6036	0.3186	0.8573	1.1127	0.4729	1.025	0.8637
41	0.1608	0.5854	0.3242	0.7598	1.1109	0.4607	1.2709	0.8158
41	0.2533	0.6566	0.3784	0.8634	1.1989	0.4535	1.1459	1.1287
41	0.3122	0.6791	0.4418	0.9	1.2499	0.4574	1.1993	1.2331
42	0.2727	1.5456	0.5363	0.8568	1.3185	1.2824	1.0471	0.7994
42	0.1918	1.4804	0.5185	0.9369	1.3159	1.1213	0.9582	0.8177
42	0.1918	1.4793	0.5099	0.8441	1.2128	0.8501	0.944	0.8747
42	0.198	1.3627	0.4317	0.9141	1.3453	1.062	1.0261	0.8239
43	0.7034	0.0441	0.0841	0.7763	0.8372	0.6891	0.4505	4.6891
43	0.7394	0.0469	0.0771	0.7981	0.905	0.6765	0.4211	4.683
43	0.7875	0.0463	0.0349	0.7632	0.904	0.6589	0.4125	4.5351
43	0.7985	0.0493	0.0153	0.7759	0.9368	0.6636	0.4104	5.1878
44	0.1515	0.3802		0.7013	0.2629	0.3573	0.8669	0.9566
44	0.098	0.3601		0.3212	0.3117	0.4318	0.8528	1.1467
44	0.102	0.325			0.2949	0.419	0.951	1.2299
44	0.0936	0.2454	0.058	0.2103	0.3602	0.454	0.9399	1.1974
45	1.8309	1.5086	0.8993	1.453	1.7309	0.3636	2.8496	0.3055
45	3.0018	1.4698	0.8369	1.4309	1.7419	0.3903	2.7912	0.2842
45	1.7655	1.5106	0.8442	1.4402	1.729	0.3598	2.7324	0.2788
45	1.2329	1.4654	0.8896	1.4625	1.7399	0.4065	2.4737	0.292
46	0.4829	0.3814	0.2146	1.0326	0.0882	0.5943	0.8648	2.6544
46	0.4576	0.3473	0.0993	0.9278	0.3471	0.5972	0.8431	2.493
46	0.5606	0.3432	0.1096	0.9376	0.5523	0.6351	1.0218	2.6925
46	0.587	0.4103	0.1319	0.9127	0.6427	0.6825	0.7687	2.7502
47	1.0435	0.6689	1.4112	1.6565	1.3048	1.8915		1.4597
47	0.8933	0.6768	1.2101	1.6497	1.2896	1.8212		1.4819
47	0.8353	0.6996	1.3011	1.5575	1.2306	1.6903		1.501
47	0.7518	0.7106	1.1666	1.622	1.4851	1.8239		1.5664
49	0.7146	0.6163	0.8622	1.0005	1.08	1.4486	1.1658	1.1104
49	0.9332	0.5997	0.8645	0.6254	1.0215	1.4343	1.1045	1.1168
49	1.0195	0.5833	0.9126		1.0352	1.4539	1.1787	1.122
49	0.5497	0.539	0.8954		1.0266	1.3815	1.1403	1.1418
50	1.1891	0.4861	0.1152	0.8992	0.3873	0.4266	0.7617	1.3861
50	0.3937	0.5058	0.0819	0.8984	0.1041	0.4641	0.9066	1.3575
50	0.0992	0.5394	0.0651	0.9558	0.3306	0.4835	0.9607	1.3535
50	0.1377	0.5693	0.106	0.9515	0.2049	0.7514	1.0674	1.3498
51	0.7476	0.7261	0.2219	0.7511	1.0746	0.6646	0.9495	1.5802
51	0.7266	0.667	0.1533	0.8148	1.0465	0.6726	0.8784	1.6833
51		0.5443	0.1644	0.855	1.0362	0.6275	0.8235	1.66
51	0.8132	0.4791	0.2029	0.8643	1.1506	0.7925	0.8877	1.6761
52	1.4802	0.381	0.5408	0.8516	0.3225	0.9909	0.8424	2.1123
52	1.6818	0.3906	0.4261	0.8387	0.2009	0.7704	0.8887	2.1131
52	1.5556	0.3955	0.4504	0.8376	0.1716	0.8895	0.8512	2.1772

52	1.6949	0.3984	0.4606	0.7549	0.3967	0.7472	0.8786	2.1955
53	0.208	0.0396		1.4389	2.5141	0.7007	1.1632	43.8879
53	0.1799	0.029			2.4181	0.7104	1.162	39.2474
53	0.1188	0.0303			2.4134	0.7005	1.1758	34.8792
53	0.2921	0.0198			2.4509	0.765	1.1496	35.8846
54	0.5639	0.4541	0.4081	0.959	0.7894	0.8368	0.991	1.6154
54	0.591	0.4229	0.2411	0.938	0.8149	0.8033	1.0397	1.759
54	0.622	0.49	0.2703	0.9179	0.7306	0.8085	1.1939	1.8385
54	0.7314	0.5655	0.3828	0.9435	1.012	0.9625	1.2768	1.9066
55	0.518	1.419	0.7991	1.0305	1.7221	0.4482	1.0908	0.9181
55	0.5341	1.369	0.8516	1.0291	1.7736	0.474	1.0972	0.9135
55	0.5626	1.4305	0.8744	1.0371	1.7666	0.4059	1.1126	1.0279
55	0.4611	1.3792	0.9228	1.0202	1.7434	0.4827	1.0832	1.1157
56	1.285	3.897	0.1801	0.8762	0.5838	0.166	1.7699	0.2414
56	1.0278	4.4476	0.1829	0.7364	0.598	0.1643	1.8151	0.2125
56	1.1941	4.5416	0.1814		0.5902	0.1815	1.8329	0.1962
56	1.3301	4.6831	0.1858		0.5966	0.193	1.7533	0.1659
57	0.3058	3.0381	0.505	1.408	1.6173	0.2813	2.3357	0.1449
57	0.3175	2.9758	0.4924	1.5094	1.5852	0.2906	2.3656	0.1421
57	0.2807	3.1918	0.501	0.1066	1.5661	0.6491	2.3618	0.1428
57	0.2363	2.9928	0.5214	0.1125	1.5768	0.2823	2.2528	0.1371
58	0.2868	0.913		0.8839	1.2663		2.6373	0.4654
58	0.3272	1.1453		1.079	1.4016	0.0895	2.5487	0.4418
58	0.3	1.2728		1.1076	1.2009	0.1084	2.6709	0.4361
58	0.3265	1.3521		1.0682	1.4409	0.2312	2.8356	0.4278
60	1.3429	1.5545	0.8828	1.4995	1.4957	0.3716	2.9249	0.3007
60	1.5014	1.5812	0.8823	1.447	1.1605	0.4199	2.7804	0.3044
60	1.989	1.5782	0.9203	1.5421	1.7608	0.3667	2.8161	0.3109
60	1.9164	1.5552	0.8882	1.6364	1.679	0.2577	2.8667	0.3163
61	0.5585	0.9643	0.348	1.1196	0.1366	1.9225	1.0785	0.7236
61	0.683	0.9868	0.3288	1.0854	0.114	1.9013	1.0952	0.6932
61	0.6588	1.0241	0.3155	0.8899	0.1285	1.7479	1.2011	0.7505
61		1.0344	0.3011	1.3293	0.3167	2.2902	1.2336	
62	0.5737	0.7711	0.4176	0.9846	0.7866	1.2083	1.1845	0.9705
62	0.5629	0.7423	0.3876	0.1123	0.3821	1.1877	1.225	0.9512
62	0.5674	0.7062	0.4468	0.1221	0.7439	1.197	1.2331	0.8636
62	0.4861	0.6658	0.5673	0.1023	0.7485	1.2704	1.2282	0.5756
63	0.4682	0.8669	0.559	0.9257	0.8699	3.5167	1.2314	0.9
63	0.2862	0.8314	0.5542	0.8892	0.8236	3.8471	1.257	0.9059
63	0.1403	0.8345	0.5447	0.9186	0.8286	4.9714	1.219	0.906
63		0.8661	0.606	0.948	0.8445	5.2703	1.2084	0.9094
64	0.5324	0.5569	0.0239	0.599	0.7306	0.4909	0.8298	1.4977
64	0.4071	0.5111		0.6249	0.6789	0.5091	0.8492	1.5309
64	0.4917	0.4618		0.5991	0.7887	0.4796	0.7782	1.5213
64	0.5189	0.4099	0.0859	0.6518	1.1863	0.6154	0.7899	1.5488
65	0.9756	0.4239	0.8916	0.7428	0.135	1.9716	0.7521	2.0059
65	1.0047	0.4301	0.7947	0.7487	0.3615	1.4897	0.7403	1.9196
65	1.0685	0.4493	0.7781	0.709	0.3996	1.3144	0.7428	1.8937
65	1.0667	0.4871	0.9262	0.7184	0.4186	1.0436	0.716	2.1194
66	0.8865	0.3078	1.5254	0.6354	0.7427	4.7629	0.9464	1.4833
66	0.8669	0.3212	1.4541		0.727	4.8465	0.9598	1.3098
66	0.8881	0.3167	1.4358		0.7576	4.7979	0.9697	1.2722
66	0.9326	0.3223	1.4069		0.7486	4.9683	0.9997	1.2015
69	0.198	0.0664		1.4623	1.6674	0.6294	0.6974	14.1931
69	0.2131	0.0883		1.2154	1.671	0.6373	0.7427	16.3867
69	0.2373	0.0671		1.2077	1.7761	0.6731	0.8113	18.8242
69	0.3378	0.0772		1.1688	1.8766	0.6415	0.6	19.6416
70	0.625	0.9099	0.4719	0.9564	0.7756	0.4509	1.0019	1.2076
70	0.6652	0.8703	0.5144	0.9181	0.7897	0.442	1.0488	1.2275
70	0.6931	0.8244	0.5772	0.7917	0.8113	0.6275	0.9902	1.2543

70	0.6918	0.9003	0.5986	1.0612	0.8298	0.709	1.0028	1.3214
71		0.6965		0.503	0.594	1.0487	0.2672	0.6097
71					0.4052	1.3839	0.3241	0.8048
71		2.6092		0.8445	0.6535	1.2351	0.3439	0.7044
71	0.217			1.1759	0.3487	2.2247	0.3283	0.6195
14-0	1.1116	0.4131	0.0909	0.775	0.4252	0.5606	0.9745	0.5283
14-0		0.4421		0.9129	0.6376	0.5236	0.9672	0.5852
14-0	1.124	0.4634		0.833	0.7852	0.5165	0.9407	0.6232
14-0	1.8159	0.4496	0.2223	0.7088	0.7758	0.4682	0.8495	0.66
14-1	3.2234	0.5479	0.099	0.7397	0.6999	0.4327	1.537	0.8574
14-1	3.4592	0.5639	0.1171	0.7202	0.8332	0.4575	1.3786	0.8766
14-1	3.3575	0.6894		0.863	0.5924	0.4177	1.3143	0.8661
14-1	2.546	0.5197		0.8812	0.6028	0.4346	1.4805	0.9301
14-2		0.8633	0.1335	0.8473	0.5057	0.9394	1.1762	0.9558
14-2	0.2445	0.4417	0.081	0.845	0.5139	1.0604	1.2346	0.9308
14-2		0.5041	0.1442	0.848	0.5639	1.0745	1.2074	0.8683
14-2		0.5698	0.1843	0.8489	0.5746	1.1532	1.1845	0.8804
14-4	0.4847	0.4245	0.5346	0.9126	0.635	0.7596	0.9133	0.8949
14-4	0.8746	0.4187	0.476	0.1616	0.5728	0.7055	0.9475	0.8251
14-4	0.7166	0.4187	0.4997	0.1369	0.4979	0.7349	0.9568	0.8451
14-4	0.4797	0.403	0.592	0.1204	0.5902	0.7075	0.9684	0.9026
56-0	1.1466	3.9322	0.1678	0.7853	0.434		1.706	0.1195
56-0	1.234	4.4235	0.1741	0.8627	0.6432		1.7023	0.1318
56-0	1.6304	4.3772	0.154	0.871	0.7002		1.7326	0.1274
56-0	1.3016	4.3949	0.1597	0.809	0.6223		1.738	0.1077
56-1	1.1394	4.926	0.1743	0.8158	0.5974	0.1035	1.9376	0.1423
56-1	1.1653	4.7168	0.188	0.8306	0.6227	0.0923	1.9689	0.1377
56-1	1.1593	5.1812	0.1867	0.8779	0.6195	0.0791	2.0237	0.1429
56-1	1.1787	4.8362	0.1914	0.8567	0.6341	0.0822	1.9405	0.1452
56-2	1.2082	4.2709	0.1837	0.9338	0.5962	0.0978	2.1265	0.1428
56-2	1.2537	4.4513	0.1779	0.9347	0.5999	0.1066	1.8963	0.1098
56-2	1.1391	4.6016	0.19	0.8423	0.6322	0.0944	1.9721	0.2102
56-2	1.0185	4.7047	0.1926	0.8768	0.6205	0.1102	1.9334	0.1678
K 1		0.4514	0.1012				0.4193	
K 1		0.3989	0.0833				0.5672	
K 1		0.4748					0.4832	
K 1		0.5936						
K0	0.234	0.7347	0.0604		0.2175		1.5604	0.162
K0		0.7953	0.2098		0.2239		1.0131	0.1625
K0		0.6134			0.2019		0.5878	0.2455
K0		0.6066			0.2185		0.9309	0.1517
K10	0.3108	0.6055	0.4484	0.9298	0.4786	1.2174	0.9259	0.8269
K10	0.2529	0.6088	0.4335	0.9036	0.444	1.2906	0.8477	0.8997
K10	0.2837	0.6452	0.4392	0.9208	0.4379	1.2373	0.8364	0.877
K10	0.3018	0.6252	0.4608	0.8488	0.4211	1.3155	0.9147	0.8581
K2	0.1437	0.8251	0.0934	0.5171	0.2522		1.1234	0.6337
K2	0.1242	0.6982	0.0886	0.7784	0.2972	0.1976	1.5277	0.4481
K2	0.0705	0.8131	0.0471	0.4298	0.2538	0.2108	1.5452	0.6661
K2	0.0593	1.1539		0.2692	0.2447	0.2473	1.5199	0.5066
K4	0.7925	0.2371		0.5492	0.277	0.5401	0.3566	0.8342
K4	1.0033	0.2568		0.5114	0.2536	0.583	0.3497	0.9157
K4	0.6613	0.2593		0.5664	0.2281	0.6326	0.3345	0.8341
K4	0.625	0.2925		0.6258	0.2002	0.5678	0.2916	0.9964
K6	0.4142	0.4194	0.3612	0.7837	0.323	0.8496	0.5405	0.9635
K6	0.2694	0.413	0.2876	0.7417	0.3181	0.9095	0.6343	1.0151
K6	0.344	0.4536	0.3394	0.9078	0.315	0.9324	0.5725	0.9374
K6	0.3068	0.4357	0.3531	0.7694	0.3047	0.7952	0.4698	0.9137
SP-1								
SP-1								
SP-1								

SP-1									
SP-2									
SP-2									
SP-2									
SP-2									
SP-3		0.4804		0.3764	0.3322			0.2138	
SP-3		0.5431		0.3219	0.9141			0.2359	
SP-3		0.7782		0.4823	0.8959			0.2514	
SP-3		0.561		0.1844	0.9119			0.2361	

DES									
Konz.									
Gene ID	30b	32b	40b	30c	32c	40c	30d	32d	40d
1	0.9338	0.5639		0.7975	0.5006		0.9384	0.4862	
1	1.0055	0.5537		0.3916	0.6343		0.466	0.4883	
1	1.0882	0.5919		0.8908	0.565		0.8671	0.51	
1	1.1756	0.5673		0.9057	0.56		0.7282	0.4864	
2	0.748	0.8595		1.1256	0.7324		1.1291	0.6846	
2	0.7564	0.9368		1.109	0.741		1.1293	0.7035	0.1553
2	0.7398	0.9371		1.177	0.7225		1.0624	0.7322	0.1925
2	0.818	0.9353		1.2171	0.7192		1.2225	0.707	0.7038
4	0.7524	0.9413	0.7676	0.9167	0.8606		0.8689	0.8617	0.5096
4	1.089	0.931	0.8857	0.8667	0.8782		0.7573	0.8628	0.8858
4	0.8023	0.9777	1.2728	0.9181	0.8419		0.7528	0.8567	0.5281
4	0.7356	0.7222	1.2038	0.9413	0.8898	0.7755	0.7653	0.8642	0.8566
5	1.6469	0.8311	0.5875	1.335	0.8593	0.3287	1.4479	0.8965	0.7493
5	6.6464	0.7783	0.5394	1.3306	0.9709		1.2225	0.9141	0.5851
5	1.3229	0.8057	0.6004	1.2752	0.8982	0.2126	1.2515	0.9005	0.5039
5	4.5367	0.8679	0.5188	1.3383	0.9523	0.5672	1.0823	0.8331	0.5489
7	4.5847	0.5355		0.9877	1.635		1.8552	0.3365	
7	2.0295	0.8924		0.9222	0.692		2.4011	0.3504	
7	2.2485	0.691		1.0077	0.6608			0.3566	
7	1.8493	0.6861		1.0178	0.6396	0.1615		0.3303	
8	0.6524	0.5874	0.3236	0.8625	0.6946	0.5711	0.6137	0.5274	
8	1.1163	0.541	0.3763	0.8857	0.7121	1.689	0.6776	0.5224	
8	1.0244	0.7746	0.0625	0.8683	0.735	0.5983	0.7852	0.5321	
8	1.0313	0.7107	0.1397	0.9341	0.7595	0.6454	0.9852	0.5514	
9	1.0737	1.0886		1.2734	1.0986	0.5345	1.3687	0.9476	0.5851
9	0.9966	1.4586		1.1968	1.0551	0.5976	1.4891	0.9223	
9	1.0691	1.3611		1.2923	1.0823	0.6691	1.3812	0.9771	
9	1.4165	1.6161		1.279	1.123	0.8095	1.4289	0.9501	
10	2.7406	0.8762		1.5886	0.6041	0.3498	1.1078	0.4262	0.176
10	1.1949	0.9261		0.9925	0.5628	0.3869	0.5152	0.4165	0.4082
10	1.1068	0.762		0.9812	0.4705	0.3851	1.6057	0.4158	0.3923
10	0.9444	0.2551		0.9567	0.4867	0.4046	1.7463	0.4401	0.1496
11	3.969	0.4364		3.2205	0.6908			0.2387	0.3902
11	4.5783	0.5611		1.0182	0.5007			0.2808	0.4551
11	3.4574	0.4972		1.1284	0.3363			0.3363	0.5209
11	1.3238	0.6353	0.4387	1.0655	0.3844			0.2251	0.4664
12	1.6091	0.332	0.243	0.7992	0.4148		3.2571	0.9225	1.7329
12	0.642	0.4238	0.0963	0.8608	0.4817			0.2924	1.1724
12	0.4677	0.4267		0.7408	0.4124			0.2861	0.7076
12	0.5076	0.2864	0.2073	0.8379	0.397		1.3906	0.3159	0.7891
13	1.0952	0.7406	0.7292	1.0031	0.7986		0.9787	0.8959	0.8692
13	0.9717	0.7871	0.6964	0.952	0.8214		1.0239	0.8946	0.7869
13	0.9002	0.7723	0.6068	0.9533	0.8544	0.99	0.9975	0.9249	0.6462
13	0.919	0.8294	0.6976	0.941	0.7705	0.6497	1.0251	0.9061	0.8234
14	1.58	1.7494	0.8516	1.4164	1.1967	1.5782	1.7243	0.902	1.9792
14	1.3662	1.4528	0.8356	1.2784	1.0553	1.5681	1.5763	1.2453	1.9819

14	1.3581	1.0279	0.8462	1.3227	1.1581	1.4858	1.7018	1.1241	1.8966
14	1.5045	1.0817	0.8537	1.4559	1.2136	1.5209	1.6791	1.1194	1.9247
15	1.0725	0.7092		0.828	0.7417		0.7792	0.5774	0.9662
15	1.1192	0.7346		0.8229	0.7254		0.6006	0.5803	0.2347
15	1.1167	0.7781		0.8994	0.6232		2.5255	0.5998	0.2127
15	1.0888	0.8501	0.1611	0.9319	0.726		0.7554	0.5737	0.2643
16	0.991	1.2049		0.8684	0.4894		0.6252	0.3233	0.263
16	1.0545	0.1043		0.8062	0.5885		0.6243	0.3875	0.1683
16	1.2475	0.559		0.9076	0.5232		0.5078	0.3175	0.1484
16	1.2462	0.4869		0.9198	0.5017			0.348	0.0721
17	0.6081	1.1956	0.9168	0.8561	1.11		0.7884	1.0504	0.9207
17	0.7277	1.2137	0.9372	0.8579	1.1147		0.8399	1.0809	0.9368
17	0.605	1.2395	0.9412	0.8823	1.1297	0.6134	0.755	1.1139	0.8534
17	0.2395	2.8368	0.9378	0.8887	1.1347	0.5823	0.7647	1.1136	0.8887
18		0.655	0.9334	1.1847	0.7078		1.0598	0.6363	1.0535
18	1.0442	0.7997	1.0139	1.1045	0.7057	0.1506	1.0934	0.7079	0.9029
18	3.7298	0.5597	1.0568	1.0614	1.3777	0.5041	1.1257	0.7209	0.9369
18	1.2723	2.4062	1.0853	3.2693	0.7275	0.7261	9.2062	0.68	0.9394
19	0.7166	0.8769		0.7044	0.5338		0.5803	0.5106	
19	0.6914	0.8742		0.7013	0.5176		0.6171	0.5552	
19	0.722	0.8665	0.0144	0.7061	0.5263		0.6561	0.512	
19	0.7557	0.841	0.428	0.7554	0.5175		0.6471	0.5122	
20	0.7795	1.3206		0.7622	1.2117		0.7925	1.2094	1.0001
20	0.7941	1.322		0.7847	1.3228		0.86	1.2702	0.9447
20	0.8007	1.2595	0.3562	0.7847	1.4	0.1737	0.857	1.2914	0.9135
20	0.7807	1.3892	0.7312	0.8224	1.2734		0.8374	1.2283	0.3898
21	2.5922	0.9843	0.4751	0.9645	0.9466	0.8449	1.0209	0.7039	
21	1.0687	1.0005	0.6241	0.9598	1.1239	0.9435	1.0716	0.7274	
21	1.8639	0.3408	0.6253	0.962	1.025	0.3296	1.1351	0.7311	
21	1.1311	1.0475	0.7079	0.9183	0.9604	0.9383	1.013	0.7273	
22	0.9371	1.0908	0.7698	1.1	1.1551	0.5584	0.8689	0.906	0.8665
22	0.9448	1.1927	0.8465	1.1589	1.149	0.8309	0.9237	0.9904	0.9177
22	0.9094	1.1619	0.8084	1.0877	1.1187	0.9134	0.9023	0.8372	0.8975
22	0.9518	1.1196	0.799	1.1215	1.0917	0.9165	0.8569		0.9112
23	1.5412	0.7827	0.5636	1.1982	0.525	0.9668	0.897	0.5369	
23	1.6015	0.5608		1.3485	0.4541		0.6744	0.4693	
23									
23	1.5983	1.9364		1.2918	0.4466		0.7689	0.4757	
24	0.9457	0.8706	0.6167	1.1351	0.9851		1.2156	0.831	1.0524
24	0.9357	0.8882	0.143	1.1288	0.9795	0.8598	1.1862	0.8673	0.7173
24									
24	0.8953	0.8684	0.4027	1.1195	1.0255		1.2066	0.817	
25	1.028	0.9957	0.5518	1.0215	0.7425	0.6717	1.0949	0.8372	0.7101
25	0.9628	0.9395	0.5447	1.1345	0.7457	0.6146	0.9842	0.8848	0.6928
25									
25	0.9981	0.9342	0.5543	1.0875	0.7516	0.5895	1.14	0.8704	0.1859
26			0.7204	1.2329	0.5732			0.3367	
26	1.4188	0.9933	1.005	0.9915	0.5315	0.1179		0.3925	0.2379
26									
26	1.6615	0.6114	0.4185	1.1761	0.6156	0.3753		0.3915	0.1654
27	0.7991	1.084		0.9177	0.9424		0.6555	0.7678	
27	0.8424	1.0204		0.8854	0.9236		0.7227	0.7947	
27									
27	0.8466	1.1041		0.9141	0.9539		0.634	0.6987	
28	0.7693			0.637	0.1406		0.5651	0.2398	
28	1.76	0.4294		0.6716	0.4598		0.4858	0.2645	
28									
28	0.7216	1.3206		0.6271	0.4618		0.4351	0.2459	
29	1.511	1.0265		1.2782	0.8049		3.3927	0.8397	0.2244
29	1.5634	0.7932		1.2942	0.7759		1.0572	0.8018	





45	1.4294	2.0583	1.2365	2.4273	1.5191	1.9398	3.5693	1.3634	1.9761
45	1.4303	2.1309	1.3086	2.4726	1.5004	1.9409	3.6003	1.3567	2.0352
46	0.9592	0.4561		1.0788	0.9232		1.1171	0.9045	1.0234
46	0.6544	1.0879		1.0431	0.9894		1.2183	0.8679	0.2208
46	0.7083	1.034	0.1595	1.0847	0.9426		1.0437	0.8709	0.2065
46	0.6898	0.9199	0.2393	1.0949	1.0279		1.1758	0.817	0.0841
47	0.9596	1.0414	0.9262	1.0962	1.0603	1.1184	1.0944	0.9524	0.9608
47	0.9866	0.2316	0.9314	1.0447	1.0922	1.1695	1.0896	0.9503	0.9814
47	0.9545	1.0767	0.9449	1.1243	0.8033	1.1443	1.1242	0.9382	1.0428
47	1.0436	1.0505	0.9349		1.1791	1.0942	1.1543	0.9297	1.016
49	0.7775	1.0082	0.9857	0.8206	1.1172	1.2854	0.9038	1.0691	1.5335
49	0.7949	1.0351	1.0122	0.8351	1.1186	1.2473	0.9197	1.0141	1.296
49	0.8056	1.0416	1.0076	0.84	1.0848	1.2471	0.8846	1.0333	1.3802
49	0.7689	1.05	1.0182	0.831	1.0616	1.1971	0.9008	1.0312	1.1744
50	1.0291	1.2334	0.8996	0.985	1.1467	1.1185	1.2531	0.514	0.3736
50	1.0146	1.2253	1.0751	1.188	1.0568	0.4942	1.1417	0.8696	0.8048
50	1.0575	1.1865	0.8726	1.1892	1.1216	0.6928	1.2194	0.9508	0.9515
50	1.0199	1.2023	0.8905	1.2377	1.1681	0.9983	1.2332	0.9576	0.8845
51	0.9178	0.7587		1.2905	0.7662	0.6979	1.2277	0.7744	
51	0.9148	0.7788		1.263	0.8117	0.7581	1.2511	0.7829	
51	0.9678	0.3409		1.2969	0.7862	0.9222	1.2293	0.7789	
51	1.0267	0.6859		1.3392	0.7601	0.9105	1.2377	0.7745	
52	0.6999	0.8035	1.0391	0.8857	1.038	0.8438	0.7445	1.0212	1.3041
52	0.6725	0.8219	1.0249	0.9341	1.0417	0.8065	0.836	0.971	1.0392
52	0.6613	0.831	1.1389	0.911	1.0206	0.8421	0.8016	0.9997	1.0885
52	0.6964	0.7812	1.0822	0.9185	1.1441	0.8593	0.8339	0.9896	1.0798
53	1.1062	1.0634	2.0251	1.3738	1.3127	0.9006	1.1956	0.79	1.074
53	1.1275	1.0602		1.368	1.3	0.9149	1.1933	0.7508	1.1091
53	1.1011	0.9908	2.8556	1.4394	1.237	0.9259	1.2267	0.7655	1.0889
53	1.1396	1.0613	1.0819	1.4025	1.1225	1.4586	1.2885	0.7764	1.1296
54	1.0361	1.3671			1.1455		1.3159	1.1696	0.2154
54	1.0294	1.4154		1.2491	1.1354		1.3521	1.1942	0.2666
54	1.0625	1.4419		1.2846	1.1372		1.3026	1.185	0.2382
54		1.5017		1.3189	1.1734		1.3538	1.183	0.9956
55	1.3957	1.2502	0.9884	1.3605	0.9112	1.2208	1.4011	1.1599	1.3359
55	1.3547	1.3155	0.9773	1.4071	0.7174	1.2001	1.4079	1.2292	1.3412
55	1.3271	1.2685	0.9905	1.3672	0.9479	1.1991	1.4204	1.1579	1.3772
55	1.3536	1.261	0.9891	1.3946	0.9401	1.2087	1.4256	1.2127	1.2674
56	2.6413	1.9335		3.6506	1.2308	2.4349	7.1058	1.1377	0.8221
56	2.7239	1.7913		3.7241	1.3309	0.7521	6.4038	1.1035	
56	2.6636	1.78		3.6994	1.2647	1.9394	7.0179	1.1144	
56	2.9167	1.164		3.7082	1.34	2.1405	6.2818	1.0649	0.1508
57	4.0563	2.6025	2.351	5.7858	1.6543	2.8937	13.6535	1.3793	2.6593
57	4.3494	2.7074	2.1281	7.3277	1.6484	1.0619	13.1235	1.3581	3.1025
57	3.8487	2.7424	1.4463	6.9322	1.6035	3.0733	13.9867	1.3228	1.3174
57	3.9813	2.7054	2.1001	6.7826	1.6632	2.973	14.0041	1.3025	3.419
58	1.3851	3.9175	0.5391	1.3848	1.0076	1.2939	2.2678	0.9104	0.2402
58	1.2618	5.5573	0.0962	1.5739	0.9518	1.3099		0.9528	
58	1.4093	2.2754	0.4595	1.4744	1.0578	1.4515		0.9057	0.559
58	1.2104	1.6581	0.1508	1.6893	1.1043	1.5417		0.9204	1.6691
60	1.4394	1.9897	1.3396	2.529	1.4448	1.8461	3.6454	1.3329	2.1694
60	1.4037	2.0447	1.3198	2.4933	1.4646	1.9262	3.9043	1.3407	2.2058
60	1.4755	1.9661	1.411	2.5863	1.4922	1.8064	3.4411	1.3167	2.0631
60	1.4879	2.0864	1.3532	2.641	1.474	1.9318	3.8144	1.4207	2.2661
61	0.8549	1.5142	0.7031	1.1228	1.1974	0.9793	1.2591	1.5597	0.8748
61	0.9035	0.9806	0.7963	1.1871	1.1433	0.9735	1.1408	1.6823	0.922
61	0.8648	1.3148	0.8266	1.2185	1.1581	0.9458	1.1667	1.6063	0.8826
61	0.776	1.2378	0.8455	1.1926	1.1122	0.9911	1.1719	1.6047	0.8896
62	1.0224	1.0934		0.9738	0.9454	0.862	0.9698	0.9098	
62	1.0225	1.0342		0.9725	0.967	0.3659	1.0955	0.8889	

62		1.0712	1.0444		0.9627	0.9476	0.9678	0.9634	0.8806	
62		1.0601	1.0308		0.985	0.7684	0.8886	1.0275	0.8605	0.7147
63		1.108	1.0887	0.8959	1.3398	0.7705	1.0534	1.4761	0.902	0.8982
63		1.1315	1.1093	0.8721	1.3555	0.8639	1.0507	1.4725	0.8993	1.2112
63		1.1333	1.1159	0.8503	1.4007	0.8781	1.0377	1.4774	0.9337	0.9636
63		1.1599	1.095	0.3809	1.43	0.8648	1.0635	1.5187	0.8968	0.9128
64		0.9518	2.0071		1.0856	1.1427	0.7192	1.2058	1.5212	
64		0.9392	1.8711		1.1217	1.1283	0.7321	1.1637	1.4587	
64		0.851	1.8101		1.123	1.1653	0.7552	1.1799	1.3807	
64		0.907	1.8967		1.1842	1.0972	0.7247	1.28	1.1829	
65		1.0831	1.0755	0.7216	1.0753	0.8906	0.6911	0.9569	0.9214	0.9847
65		1.081	0.9628	0.4538	1.0519	0.8835	0.855	0.961	0.9304	0.831
65		1.0376	1.0588	0.7124	1.1203	0.913	0.8715	0.9434	0.9249	0.8556
65		1.0363	1.1001	0.6929	1.0951	0.9181	0.9257	0.9504	0.9629	0.8667
66		0.9834	0.9776	0.8231	1.0281	0.7731	0.8601	1.0999	0.8464	0.8317
66		1.0104	0.9814	0.8307	1.0286	0.789	0.8611	1.102	0.7931	0.7987
66		1.0086	0.9754	0.8445	1.0554	0.7532	0.8498	1.0852	0.7729	0.8007
69		0.7178	0.7129	1.2084	0.916	0.7338	0.8833	0.881	0.6339	1.0327
69		0.7541	0.6738	1.2363	0.8855	0.7537	0.8756	0.85	0.6414	1.034
69		0.7777	0.6826	1.303	0.886	0.691	0.7881	0.9066	0.6399	0.9732
69		0.8444	0.6812	1.3341	0.9528	0.7199	0.9986	0.9397	0.6101	1.0457
70		0.8178	0.854		1.0384	0.8168		0.9718	0.6752	
70		0.8282	0.8654		0.9448	0.7636		0.965	0.6395	
70		0.8765	0.9227		0.8869	0.8135	0.4502	0.9494	0.6203	
70		0.9099	0.8749		0.9305	0.8048	0.4165	0.8681	0.621	
71		2.6086	0.4434		0.9029	0.4842		0.8542	0.2271	
71		2.1501	0.3879		0.9513	0.4874		0.4764	0.1296	
71		0.8578	0.5245		0.8369	0.6011		0.4774	0.2443	
71		0.8372	0.4679		0.8342	0.5334		0.5641	0.3143	
14-Jan			1.0014	0.8471	1.3819	1.1946	1.5194		1.318	1.9844
14-Jan		2.453	2.2181	0.7823	1.1334	1.1672	1.4622	7.2761	1.0836	2.3092
14-Jan			1.9375	0.8672	1.4139	4.7901	1.3028	5.2542	1.3816	1.9696
14-Jan		1.9824	2.5449	0.8267	1.4165	1.183	1.4554	8.1907	1.3034	2.1148
14-Feb		1.2821	5.5708	0.7707	1.3826	1.1406	1.3062	1.6303	1.3711	2.2823
14-Feb		1.2201	1.7988	0.8693	1.4479	1.14	1.3585	1.6448	1.3462	1.9131
14-Feb		2.5746	2.0798	0.3424	1.5011	1.1215	1.0924	1.8203	1.2996	2.2811
14-Feb		1.0902	2.1485	0.4667	1.7382	1.2419	1.9121	1.6271	1.384	1.6303
14-Apr		1.7923	2.1166	0.837	1.3681	1.3717	1.4809			1.0276
14-Apr		1.2475	1.989	0.9117	1.3515	1.2076	1.5406	0.3565	1.1018	
14-Apr		1.2392	1.9767	0.8847	1.4136	1.2268	1.4538	8.598	1.1333	
14-Apr		1.5001	2.1096	1.264	1.5047	1.3174	1.3536	1.7786	1.0415	2.0982
14-0		1.961	0.8638	0.8407	1.4018	3.7337	3.5623	4.6632	1.2542	2.4065
14-0		5.8182	3.0741	0.8279	1.2543	1.786	1.6858	2.8043	0.7696	1.9361
14-0		4.5584	2.4667	0.837	1.3502	1.1702	1.6538	1.3992	1.1203	2.4574
14-0			3.4081	0.8	1.4407	2.033	1.5239	4.3138	1.1196	2.3849
56-0		2.0973	1.507	9.8689	2.6192	1.2776	5.3582	24.4179	0.998	7.3964
56-0			1.4565	19.2026	2.6162	1.1413	4.6276		0.9442	3.0028
56-0		2.4429	1.5771	10.8676	2.6281	1.2332	4.2255	9.6626	0.9339	3.0973
56-0		2.3947	1.6678	7.9632	2.6169	1.1773	4.4324	9.6801	1.0247	2.5576
56-1		2.6026	1.4719	2.6039	3.9219	1.1848	3.3195	8.1129	1.0475	3.4822
56-1		2.7675	1.3546	8.4509	4.1116	1.3405	5.3296	9.1044	1.0542	2.7703
56-1		2.8624	1.7397	9.0072	3.984	1.2786	2.1927	8.655	0.9784	3.3819
56-1		13.6101	1.7635	7.401	4.3849	1.3251	4.0638	7.4505	1.0646	2.9604
56-2		2.8037	1.7744	2.9095	4.4102	1.376	6.6956	8.8366	1.0612	2.8054
56-2		2.7385	1.7196		3.9537	1.2232	0.7743	8.3636	1.1656	2.6786
56-2		2.961	2.0386	2.0201	4.4638	1.4261	2.3711	7.1265	1.1971	1.3888
56-2		2.8279	1.8893	1.8698	4.3028	1.3466	1.9484	7.257	1.165	2.2671
K 1		1.5785	0.2028	0.679	1.109	0.3849	0.5782		0.2927	0.8881
K 1		1.4926	0.4801	0.6752	1.3142	0.1847	0.8705	0.3237	0.3474	1.1734
K 1		1.3087	1.1633	0.6989	1.0787		0.8443	1.8968	0.3787	0.6901

K 1	1.5254	0.4479	0.7068	1.1245	0.875	0.9739	1.162	0.3163	0.7305
K0	2.1662		0.6279	1.0207		0.3214		0.4638	1.8685
K0	3.4784	0.5621	0.6517	2.853		1.0351	0.4386	0.2476	0.8743
K0	2.3348		0.6466	1.0089		0.9615	0.5485	0.3008	0.8331
K0	1.577		0.6412	1.0752	0.3547	1.035		0.2991	0.767
K10	1.2371	0.8424	0.7546	1.0806	0.9874	0.9058	0.6321	0.8329	1.0799
K10	1.3079	0.8616	0.6772	1.1043	0.9723	0.8501	0.5946	0.8378	0.9445
K10	1.4161	0.7088	0.7121	1.2179	0.9628	0.8316	0.6622	0.8149	0.9577
K10	1.4431	0.9586	0.7217	1.2337	0.8632	0.771	0.5924	0.7974	1.0055
K2	1.6518	0.5224	0.6091	1.3008	0.9083	0.3066		0.3909	0.3846
K2	1.6523	0.455	0.68	1.2814	0.4862	0.9339	2.3758	0.457	0.9514
K2	1.6425	0.8761	0.3696	1.1198	0.4655	1.0411		0.3977	0.9853
K2	1.6769	1.3782	0.5916	1.2257	0.5385	0.9339		0.3714	0.9364
K4	1.384	1.3576	0.6996	1.4138	1.8685	1.0546		0.4543	0.818
K4	1.4155	0.6865	0.6641	1.1704	0.6671	1.012	1.1919	0.507	1.3339
K4	1.4575	0.7555	0.661	1.2732	0.5775	0.8922		0.4945	0.9477
K4	1.5059	0.3035	0.6561	1.415	0.8943	0.9631	1.9809	0.4127	0.8327
K6	1.2903	1.4807	0.7704	1.1959	0.733	0.9966	0.4872	0.6631	1.109
K6	1.5082	1.8467	0.7849	1.2284	0.6198	0.9221	2.6521	0.5944	1.204
K6	1.4785	1.524	0.7714	1.2048	0.6799	0.8866		0.6251	0.9987
K6	1.4265	2.7557	0.8012	1.206	0.6858	0.8437	3.3857	0.7043	1.0124
SP-1	2.2557			1.196			0.319		
SP-1	3.0018			2.0165			0.5578		
SP-1	1.0516			0.5993					
SP-1	1.0956			0.6096			0.5142		0.7483
SP-2									0.4746
SP-2									0.3689
SP-2			1.072					0.251	
SP-2			0.5654	1.0386					0.5405
SP-3				1.2625					
SP-3				0.5831					
SP-3	2.365			0.6284					
SP-3	1.1244			0.773			1.2164		

TBT											
Konz.	0,06 mg/ l				0,012 mg/ l				0,0024 mg/ l		
Gene ID	37b	38b	39b	39b 2	37c	38c	39c	39c 2	37d	38d	39d
1	0.7805	0.4526	0.0942		0.6082	0.3531			0.5299	0.6798	0.3049
1	0.9378	0.4748	0.0484		0.6237	0.3088			0.5688	4.487	0.3214
1		0.4522	0.1878			0.3423			0.5803	12.0121	1.2847
1	0.6082	0.4365	0.2461	0.1431		0.3282			0.5924	1.3526	3.5396
2	0.367	0.5731			0.4479	0.2953		0.6978	0.5278	0.5264	0.6289
2	0.3489	0.5615			0.433	0.2633		0.3235	0.5424	0.5818	0.6093
2	0.373	0.5646		1.2694	0.4039	0.2896		0.0322	0.5385	0.5518	1.3724
2	0.3605	0.5417	3.1739	0.7952	0.3372	0.2846	0.2578	0.1461	0.5325	0.5311	0.5981
4	0.8625	1.407	0.5137	0.7436	0.6373	1.3453		0.0778	0.7854	1.4568	0.5637
4	0.8283	1.3948		0.4953	0.6344	1.2518		0.4837	0.7791	1.4389	0.563
4	0.7932	1.4002	0.3137	0.4585	0.6181	1.1841		0.1677	0.7781	1.4249	0.5535
4	0.8446	1.4249	0.7594	0.3325	0.605	1.2184		0.4031	0.7244	1.5246	0.5522
5	1.4406	1.557	0.5198	0.4707	0.8883	1.5265	0.7497	0.2331	1.3509	1.4747	0.8975
5	1.5359	1.7155	0.3131	0.2374	0.884	1.4963			1.3761	1.4929	0.9
5	1.6714	1.6702	0.641	0.1944	0.8772	1.4523	0.3905	0.2757	1.5288	1.4104	0.9637
5	1.3148	1.6208	0.6675	0.1845	0.8968	1.4024	0.2888	0.0909	1.3086	1.5066	0.9178
7	2.3473	0.8344		0.0842	0.7421	0.3694			0.6301	1.568	0.8897
7		0.8075		0.1454	0.7226	0.3137			0.7225	1.5769	2.4656
7	2.1633	0.8397		0.2047	0.6694	0.3989			0.6591	6.1326	0.8204
7	2.64	1.0442		0.3001	0.8306	0.3799			0.6524	1.748	0.6533
8	0.6178	0.8575	0.4636	0.3664	0.7602	0.4244			0.6263	2.3641	0.5978
8	0.5839	0.8655		0.3762	0.7554	0.3342		0.3723	0.6691	1.0652	1.354

8	0.6141	0.7277		0.3865	0.7014	0.3518	0.1809	0.5887	0.6433	0.9819	0.6122
8	0.7286	0.7828		0.4655	0.7058	0.3231	0.5309	0.0142	0.6153	1.0418	0.7438
9	1.0799	1.4495		0.5041	0.8965	0.6629	0.4599	0.5862	0.9189	1.5639	0.6805
9	1.3663	1.3644		0.488	0.8557	0.6905	0.5351	0.4981	0.955	1.5183	0.6163
9	1.1057	1.4173		0.4483	0.8967	0.7079	0.3137	0.5494	0.9225	1.6242	0.6212
9	1.2101	1.4185		0.4369	0.9437	0.7209	0.5318	0.5767	0.8798	1.5587	0.6052
10		0.5973	0.8816	0.2765	0.8066	0.5998	0.2556	0.3373	0.3278	1.2576	0.9103
10	3.5782	0.5323	0.2302	0.2353	0.7161	0.6306	0.2618	0.2797	0.8573	0.8354	1.0585
10		0.599	0.2598	0.259	0.7652	0.6659	0.3823	0.3178	0.6788	0.7813	0.494
10	0.7949	0.6125	0.2757	0.2799	0.7147	0.591	0.3825	0.2471	0.6627	0.8228	1.1639
11		0.709	0.522			0.6177		0.2763	0.3314	1.5333	
11	0.4487	1.4309	0.4921	0.4957		0.5768		0.3243	0.2603	0.9167	
11	1.278		0.5082	0.3375		0.6403		0.4007	0.5852	5.4793	
11	2.2571	1.5573	0.5019	0.5254	1.2572	0.4826		0.4375	0.4255		
12		3.1116	0.9598	1.4091	0.772	1.6984	0.2047	0.3452	0.4915	5.0157	0.6452
12		3.0788	0.9685	0.9717	1.0328	1.9241	0.4007	0.5693	0.4633	4.7575	0.6637
12		2.745	0.8483	0.9133	0.8509	2.1106		0.8452	0.4815	4.2501	0.6297
12		2.4474	0.9531	1.336	0.7592	1.907	0.7513	0.8019	0.5023	5.0923	0.7091
13	0.3401	1.3148	0.731	0.9923	0.4746	0.9623			0.4796	1.1308	0.9552
13	0.3582	1.3281	0.73		0.5422	0.922			0.4636	1.1414	0.961
13	0.3589	1.3059	0.732		0.4726	0.9097		0.4505	0.4696	1.1961	0.8779
13	0.3395	1.2182	0.6185	0.6811	0.5415	0.9064	0.7615	0.6858	0.4704	1.1038	0.9492
14	0.2841	6.0372	0.6184	0.5069	0.7144	6.1009	1.1472	1.0725	0.2783	9.8656	0.5127
14	0.2818	6.2011	0.2555	0.5263	0.7154	6.0678	1.069	1.1672	0.268	9.9663	0.5098
14	0.2802	6.5063	0.5721	0.5169	0.7311	5.9181	1.0249	1.1275	0.2808	10.0395	0.5083
14	0.2756	6.5191	0.566	0.5244	0.7386	5.8466	0.989	1.093	0.2775	9.5154	0.5007
15	0.559	0.876	0.3211		0.6174	0.7857		0.1908	3.2172	0.8181	0.7517
15	0.6534	0.8795	0.2407		0.5348	0.8128		0.1844	0.6675	0.7485	0.3638
15		0.7627	0.2821	0.0724	0.5607	0.7219			0.6698	2.227	
15	0.7164	0.7123	0.3825	0.2011	0.535	0.7757		0.1932	0.6341	0.5876	0.8019
16	0.482		0.1021	0.0549	0.229	0.1817				4.7759	0.6563
16		0.6205	0.0867		0.5944	0.1714		0.0943	1.2771	0.6629	0.2883
16		0.6023	0.1182	0.0292	0.535	0.3539			0.279	0.711	1.2183
16		0.6855	0.0775	0.0362	0.5296	0.45		0.0689	0.5293	0.9475	1.0139
17	0.6846	2.4285	0.6512	0.5325	0.739	2.0038	1.0175	0.7973	0.887	2.4438	1.0253
17	0.6867	2.5446	0.6522	0.4982	0.7972	1.9191	0.3919	0.8143	0.8612	2.4052	1.0224
17	0.6926	2.5022	0.6556	0.6104	0.7753	1.8673	0.9834	0.8065	0.8629	2.2959	1.0094
17	0.684	2.4924	0.6332	0.606	0.7627	1.8875	0.9351	0.8162	0.879	2.461	0.9891
18		0.6557	0.5081	0.4183	0.8335	0.7128		1.2127	2.1092	1.146	1.2057
18	1.6948	0.6847	0.5824	0.4121	0.6472	0.686	0.1782	0.834	0.8148	1.1099	0.5533
18	0.5906	0.6312	0.54	0.4347	1.1532	1.5802	0.0932	0.9385	0.9488	0.9143	0.5984
18	0.8942	0.6291	0.6931	0.3303	0.8754	0.7957	0.5369	0.6767	2.1564	3.0831	
19	0.6593	1.0188			0.4972	0.7846		0.135	0.6439	0.7048	0.3308
19	0.6403	0.9341			0.5099	0.7098			0.6344	0.7229	0.3397
19	0.6526	0.7936			0.5844	0.6902			0.6258	0.6228	0.3732
19	0.6125	0.8269	0.3315	0.0319	0.5413	0.7153			0.6288	0.5633	0.3838
20	0.7966	0.9873	0.101		0.8637	1.1216			1.0032	1.2452	
20	0.7936	0.9877			0.9262	1.0694			1.028	1.3031	0.7068
20	0.8166	0.946		0.2123	0.8876	1.1459			1.0109	1.2901	0.7218
20	0.7857	0.9619	0.1749	0.5581	0.9319	1.1372			1.0348	1.296	0.6842
21	1.1317	0.9979	0.2035		0.6786	1.9524			0.9692	0.8671	0.5516
21	1.3719	1.041	0.6466		0.5862	1.8627			0.9717	0.8942	0.6132
21	1.4762	0.8567	0.7453		0.7304	2.056	0.2114		0.9506	0.9662	0.5945
21	1.1154	0.9292	0.6888		0.7429	2.2114	0.6328		0.9708	0.9089	0.6145
22	1.1715	1.277	0.8997	0.8342	0.6862	1.8451	0.9414	0.35	0.8235	1.6448	1.0771
22	1.0548	1.2873	0.9104	0.8988	0.7727	1.8391	1.004	0.9517	0.7697	1.731	1.0327
22	0.9568	1.2329	0.8778	0.8475	0.8366	1.758	0.9509	0.9085	0.7616	1.7587	1.0076
22	0.934	1.3004	0.8989	0.9253	0.8401	1.8787	0.9412	0.9123	0.8308	1.7672	1.1226
23	0.3072	4.095	0.2357	0.2145	8.9914	1.0209	1.3059	1.1693	0.2537		1.1452
23	0.3158	3.6349				1.2248		0.9685	0.2727	10.4721	0.9664

23											
23	0.3176	14.6918			0.6236	1.0929	0.143	1.0747	0.2846	26.0791	1.0863
24	1.299	1.5579	0.7183	0.5287	0.8462	1.2091	0.9094	0.8617	1.2616	1.5178	0.829
24	1.4074	1.5924	0.6109	0.5772	0.9272	1.2327	0.9075	0.9018	1.2922	1.5563	0.8596
24											
24	1.3874	1.65	0.2736	0.5758	0.869	1.3291	0.8335	0.8593	1.2004	1.4228	2.869
25	1.1341	2.0066	0.8576	0.7386	0.9764	2.9766	0.7279		0.8665	1.3982	0.8552
25	1.2867	2.0916	0.6902	0.6952	1.103	3.1573	0.7752	0.1741	0.8492	1.5695	0.4566
25											
25	1.2581	1.9588	0.808	0.7135	1.1131	2.8287	0.7344	0.5922	0.8552	1.4989	0.6783
26		26.5466	5.9291	5.0434		31.1087	40.6649	33.8099			18.4842
26		30.8731	7.3228	10.8318	27.7541	6.9124	3.1729	12.3001		25.5837	
26											
26		16.3755	7.6877	5.7542		12.1416	5.4945	2.6413			29.6442
27	7.2924	10.4375	5.5322		2.2211	2.6259		2.9244	1.3842	1.8992	1.5653
27	7.5636	9.4247	5.5146	4.7191	2.6759	2.7342		2.6703	1.3249	1.7832	3.035
27											
27	7.1217	9.7839	5.2295	38.2242	2.3217	2.6134		2.8739	1.3632	1.6712	1.5154
28		0.3991	0.3512		0.9452	0.1495		0.4933	0.3975	0.3267	0.199
28	0.693	0.4023			0.7876	0.2366		0.8258	0.4171	0.4504	0.6379
28											
28	1.7208	0.377			0.7591	0.2691		0.5677	0.37	0.4782	1.7209
29	2.5053	0.8163			0.708	1.0661			0.6515	1.1984	0.3445
29	1.8449	0.9431			0.7139	1.0054			0.6842	1.156	0.8246
29											
29	0.7958	1.0333			0.6756	1.079			0.6776	1.1218	0.8172
30		0.1663	0.1678		0.5454	0.1136	0.0379			0.0549	0.0918
30	0.47	0.1665			0.4961	0.1209			0.1279	0.0416	0.1665
30											
30		0.1583			0.5182	0.1223			0.344	0.0666	
31	0.9404	1.3138	0.6967		0.3555	1.1262	0.777	0.526	0.3985	1.1234	0.555
31	1.171	1.2501	0.7239	0.7444	0.3376	1.1368	0.7256	0.6876	0.4011	0.9296	0.6032
31											
31	1.3096	1.3066	0.71		0.3522	1.1581	0.0378	0.2757	0.3497	1.6134	0.6098
32	1.2569	1.2135	0.959	0.9188	0.8242	1.2685			0.9856	1.1829	0.6873
32	1.3536	1.1941	0.8958	1.0039	0.854	1.2221		0.5731	1.0155	1.221	1.5071
32											
32	1.3811	1.1724	0.3134	1.0134	0.8868	1.2722		0.2889	0.9956	1.1617	0.661
33	1.0395	1.0135	0.9934	0.9534	1.013	1.0042	0.9929	0.9911	1.0212	1.0103	1.0061
33	0.9841	1.0051	1.002	1.0302	0.9672	1.0026	1.0101	1.0015	0.9921	1.0102	1.0014
33											
33	0.9764	0.9842	1.0053	0.981	1.0054	0.9932	0.9953	1.0075	0.9892	0.9809	0.9925
34	0.9852	1.3597			0.7792	1.1982			0.8888	1.2655	1.7118
34	0.9606	1.3753			0.771	1.0905			0.882	1.0577	0.7608
34											
34	0.8937	1.2642			0.8304	1.0368			0.9258	1.1489	0.7566
35		1.0887	0.7839		0.5634	3.286		0.0783	1.1692	1.3879	0.3261
35			0.6354		1.6122	3.8201		0.0524	0.9378	2.7952	0.318
35											
35		1.7185	0.3503		0.2715	3.699		0.063		1.2741	0.3305
36	2.3974	1.157	1.2337	1.0867	0.5597	3.0043		0.2709	1.0204	1.4301	0.4343
36	2.377	1.1229	1.1243	1.1394	0.5574	3.1874	0.4058	0.4003	1.0238	1.3902	0.4248
36											
36	4.3664	1.2482	1.0684	1.1634	0.6139	3.1181	0.3185	0.2919	1.027	1.5123	0.427
37	0.7916	1.2324	1.0197	0.903	0.8991	1.4343	1.0193	0.9809	0.8525	1.4964	0.8961
37	0.8132	1.2236	1.0238	0.7187	0.8981	1.3856	1.0473	0.925	0.823	1.5029	0.8749
37											
37	0.7944	1.2645	1.051	0.814	0.9453	1.408	1.016	0.9702	0.8373	1.5143	0.8832
38	0.9634	0.3276	0.8926	0.4089	0.359	0.6754	0.1524	0.2217	0.9669	0.49	0.6422
38	1.0026	0.3248	0.6542	0.3222	0.4096	0.7014	0.4673	0.1588	0.9743	0.523	0.5625



55	0.578	1.238	0.619	0.5192	1.1248	0.4035	1.0052	2.8236	0.3719	2.4752	1.6943
55	0.577	1.2091	0.6329	0.4953	1.1217	0.3992	0.9838	0.9464	0.4002	2.6855	1.7041
56	3.3964	1.9621	0.0277	0.0312	4.25	0.4396	0.5868	0.1625	3.3506	0.6518	0.8188
56	3.4308	1.7702	0.026	0.0392	1.7585	0.436		0.6243	3.4067	0.629	0.7682
56	3.5551	1.8131	0.134	0.0242	1.7593	0.486		0.6311	3.1862	1.8541	0.7633
56	3.3407	1.8471		0.1032	1.7855	0.4426	0.4977	0.6664	3.156	1.6538	0.792
57	4.4037	5.1757	0.1247	0.1583	2.3547	1.2723	1.3514	1.1291	4.241	3.0738	1.3579
57	4.5839	5.2923	0.1243	0.1529	2.4039	1.2238	1.3628	0.6738	4.3914	2.9971	1.3109
57	4.8574	5.0613	0.1434	0.1526	2.3667	1.2129	1.2476	0.5344	4.5707	2.9959	1.3221
57	4.8864	4.9203	0.0741	0.1499	2.4261	1.1616	1.3052	0.3168	4.5317	2.9707	1.3109
58	0.4783	4.2583	0.1985	0.3623	1.551	0.6629		1.1628	0.346	5.197	0.9011
58	0.459	4.3346		0.3727	1.2193	0.7321	1.3145	1.0694	0.3499	5.3438	0.9085
58	0.4974	4.5025		0.3634	1.3069	0.5915	1.2148	1.1187	0.352	5.7196	0.9196
58	0.447	3.9179		0.1729	1.306	0.5913	1.2122	0.9213	0.3521	13.2648	0.8989
60	2.4514	2.9318	0.3808	0.3257	1.8426	0.7027	1.1288	1.0785	2.3186	1.8458	1.1771
60	2.4226	2.8103	0.3922	0.3227	1.9073	0.6909	1.1446	1.0673	2.4266	1.7773	1.2285
60	2.5007	2.8682	0.4167	0.3221	1.9334	0.7049	1.1349	1.1019	2.3211	1.8241	1.2736
60	2.5402	2.8933	0.391	0.3312	1.8828	0.6992	1.1396	1.0895	2.4359	1.806	1.2823
61	0.6856	1.5233	0.8885	0.744	0.8458	1.8019	0.7787	0.9188	0.9013	1.7254	0.7726
61	0.7583	1.5523	0.7569	0.665	0.8396	1.9912	0.9407	0.761	0.9719	1.7461	0.804
61	0.7468	1.6062	0.8545	0.6999	0.8545	1.9611	0.8832	0.8898	0.8892	1.7446	0.7639
61	0.7276	1.5541	0.8154	0.6703	0.8501	1.972	0.9688	0.8594	0.9331	1.7092	0.7956
62	1.1822	1.4988			1.3722	2.1134			1.2668	1.444	0.6825
62	1.2099	1.4438			1.4028	2.0181			1.2908	1.4065	0.7417
62	1.2124	1.3804			1.3238	1.9421			1.2852	1.3751	0.7035
62	1.1535	1.4175		0.3189		2.0481	1.051		1.2904	1.3912	0.6812
63	1.0229	1.3483	0.9431	0.8547	1.3106	1.5335	1.1387	1.0653	1.2531	1.5835	0.9341
63	1.041	1.3567	0.9303	0.8818	1.3123	1.5798	1.1555	1.0175	1.2839	1.571	0.9306
63	1.0644	1.3678	0.9282	0.8625	1.3468	1.603	1.15	1.04	1.2397	1.6088	0.917
63	1.0992	1.349	0.9191	0.8666	1.3679	1.6002	1.1627	0.9182	1.2513	1.5895	0.9182
64	0.456	0.9452			0.4983	1.1686	0.2554		0.8259	1.069	0.7012
64	0.4659	0.9638			0.5107	1.2652	0.713	0.0444	0.8145	1.1021	0.7177
64	0.4569	0.9768			0.5439	1.2414	0.2274	0.0372	0.8189	1.0642	0.6929
64	0.4605	0.9657			0.5511	1.2854	0.8199	0.2482	0.8276	1.0062	0.6633
65	0.6361	1.0429	0.7357	0.3616	0.4938	1.2898	0.8866	0.8938	0.5919	0.9399	0.9663
65	0.6278	1.0205		0.194	0.4926	1.3058	0.8326	0.2452	0.5874	0.9222	0.954
65	0.6204	1.0628	0.2112	0.2132	0.5009	1.285	0.7446	0.1563	0.6059	0.946	0.9615
65	0.6343	1.0615	0.9113	0.2427	0.4773	1.3129	0.939	0.3313	0.5961	0.967	0.9628
66	1.0175	0.9468	1.0035	0.9419	1.0444	1.1063	1.2057	0.9486	1.0514	1.0997	1.0436
66	1.0147	0.9075	0.9893	1.0756	1.0341	1.1309	1.2002	0.9948	1.1074	1.0563	1.0575
66	0.9759	0.9145	1.0667	1.0339	1.0452	1.2115	1.0818	0.986	1.0991	1.0585	1.0433
66	1.0048	0.9019	1.0084	0.9104	1.0699	1.0907	1.1926	0.9887	1.1367	1.0192	0.9395
69	1.0694	0.9476	1.2724	0.9568	0.6655	0.7537	0.4764	0.4136	0.9465	0.8228	0.3571
69	0.9518	0.9802	1.1723	0.973	0.6848	0.7746	0.4311	0.4222	0.967	0.8074	0.3307
69	0.952	0.9272	1.1702	0.9474	0.6808	0.7897	0.4965	0.3502	1.0322	0.8277	0.3234
69	0.9544	0.9613	1.1332	1.0197	0.7184	0.764	0.4895	0.3574	1.0012	0.8242	0.3138
70	0.5208	1.0531			0.3374	0.4467			0.4978	0.7099	0.5413
70	0.4869	0.8741			0.3434	0.4501			0.4557	0.7248	0.5616
70	0.4249	0.8886	0.031		0.4308	0.4267	0.1234		0.4551	0.6987	0.5934
70	0.4652	0.8204	0.068		0.4059	0.5339	0.1588	0.3269	0.4796	0.7061	0.5863
71		0.2404			0.2557	0.2838			2.4541	0.8272	1.5622
71	2.0317	0.2322			0.3114	0.2731			1.7487	0.7498	1.5819
71		0.2167			0.3731	0.2776			0.5482	0.7039	2.3899
71		0.3004		0.0409	0.3783	0.3284	0.0273	0.0933	0.6624	0.6505	2.3277
14-1	0.2875	9.5552	0.5921	0.4945	0.7919	7.1511	1.0854	1.0709	0.2791	10.2191	0.4941
14-1	0.2783	10.9673	0.5677	0.477	0.7202	7.1003	0.9637	1.0298	0.2694	11.8453	0.5078
14-1	0.2756	11.7152	0.5785	0.4793	0.6914	7.5601	1.0163	0.8529	0.2634	10.0577	0.4999
14-1	0.2789	10.2321	0.4389	0.4856	0.74	7.4339	1.1501	0.7541	0.2741	11.7725	0.5089
14-2	0.2778	11.8778	0.5563	0.521	0.7848	7.1501	1.1531	1.0806	0.2796	11.5759	0.4817
14-2	0.2814	11.5876	0.5798	0.4917	0.7286	7.239	1.1121	1.0682	0.2755	10.4411	0.4785

14-2	0.2742	10.7	0.56	0.5383	0.7616	7.2378	1.1829	1.0474	0.2781	11.6815	0.4947
14-2	0.2723	11.1559	0.55	0.4998	0.7364	6.7175	1.0924	0.9624	0.2849	11.6677	0.478
14-3	0.2809	8.5664	0.1424	0.4559	0.7337	5.738	1.1681	0.9453	0.2776	9.7941	0.4715
14-3	0.2876	8.5296		0.4364	0.7037	5.9175	1.1527	0.9873	0.2791	8.9332	0.4799
14-3	0.2884	8.1143	0.1016	0.4716	0.7116	5.4932	1.0825	1.9694	0.2863	8.1562	0.4677
14-3	0.287	7.7502	0.5021	0.4887	0.6906	5.6597	1.1439		0.2747	10.0584	0.4674
14-0	0.2903	8.1486	0.5933	0.4555	0.719	8.1444	1.162	1.0623	0.3375	11.4647	0.5564
14-0	0.3117	8.5112	0.5653	0.5058	0.7561	8.2537	1.1411	1.0758	0.3494	10.8075	0.5273
14-0	0.309	9.7623	0.5991	0.5034	0.7254	7.9741	1.142	1.0169	0.4205	9.3062	0.531
14-0	0.269	9.402	0.6133	0.4593	0.8358	7.0438	1.1033	1.0078	0.3761	11.5668	0.5265
56-0	8.8764		0.1669	0.1243	1.6626	0.5668	2.5938	0.9751	3.445	1.131	3.0462
56-0	3.1397	3.3295	0.1521	0.1317	1.9795	1.672	0.9305	0.8405	3.2385	0.9515	0.8644
56-0	3.3086	3.45	0.278	0.0931	2.01	0.5236	1.9113	0.9032	4.0598	2.2611	1.7576
56-0	2.541	3.6715	0.0953	0.1101	1.9905	0.6117	0.9096	0.8697	3.7198	0.5531	1.9865
56-1	3.392	3.5208	0.1534	0.1218	2.0176	1.4196	0.9817	0.8105	3.3005	1.2873	1.0871
56-1	3.1278		0.1545	0.111	1.9577	1.5475	0.9359	0.6562	3.066	0.8992	0.9339
56-1	3.2893	4.7776	0.1485	0.1145	1.9913	1.5849	0.9501	0.8355	3.1347	3.0469	0.879
56-1	3.1073		0.1418	0.1035	1.9672	1.5517	0.9382	0.8558	3.0498	1.1999	1.0167
56-2	3.2877	1.7918	0.0267		2.41	0.2094	0.8139	0.8298	3.2639	3.7307	0.8364
56-2	3.506	1.81	0.0477		2.0129	0.4723	0.8742	0.8657	3.3996	1.0741	0.839
56-2	3.4813	1.9112	0.1658		2.265	0.5229	0.6768	0.4193	3.3834	1.0348	0.836
56-2	3.381	1.7496	0.0436		2.3681	0.5168	0.8263	0.7607	3.2691	1.02	0.8227
K 1			0.7066	0.1968		0.3592	0.9446	1.2545			0.331
K 1			0.859	0.7751		0.4608	3.3503	1.0784		3.9923	1.0172
K 1			0.9033	0.9091		0.3973	0.8664	1.0657	1.0782	25.8751	
K 1			0.9977	1.0418			0.903	1.1887	0.9523	1.43	3.9286
K0			0.5846	0.9217				2.1416		2.6758	4.5877
K0			0.5847	0.7656		0.579	2.1012	1.0297		47.101	2.321
K0			0.6699	0.6342		2.174	1.9606	0.5112		9.2063	
K0			0.7416	0.9202		1.8747	0.7973	1.0529	0.5484	5.8137	
K10	2.2637		0.8183	0.9184	3.0663	1.3004	0.8112	0.9855	0.7337	6.9999	
K10	1.4945		0.7672	0.7811	1.0482	1.2377	0.7934	0.9082	0.8404	2305.1782	1.3947
K10			0.8375	0.8158	0.5077	4.2826	0.8797	0.9241	0.753		2.3668
K10	0.57		0.6182	0.7849	2.3127	2.8091	0.8633	0.8686	0.9798	28.0211	1.4464
K2			0.8298	0.7559		1.1386	0.9326	0.662	1.6058		1.5902
K2			0.8485	0.9864		1.2288	0.8531	0.729	1.5142		
K2			0.9274	1.732		1.6572	0.8611	0.7311			0.173
K2			0.7276	0.7376		1.2063	0.8121	0.8214			0.1707
K4			0.7617	0.878		2.2501	0.965	1.1206			1.9422
K4			0.3849	0.9059		0.7609	0.9604	1.0481			
K4			0.7302	0.7888		1.2651	0.9409	0.6556			
K4			0.6605	1.0484		1.6482	0.8995	1.0275		5.846	
K6			0.7918	0.9272		0.8852	0.9164	0.9535	2.0733		1.6634
K6			0.9033	0.94	2.3264	1.0786	0.9273	0.832	1.3911		
K6			0.8874	0.9276		1.2504	0.8494	1.0238	2.4121		
K6			0.8553	0.8721		1.1906	0.8304	0.9652	2.0126		0.1491
SP-1								1.9291		0.2404	
SP-1											
SP-1										0.1524	0.2884
SP-1										0.0686	
SP-2										1.3009	0.6791
SP-2										0.8176	0.8509
SP-2						0.3256				0.4497	0.4537
SP-2										0.0704	
SP-3						0.6294				0.8181	2.2744
SP-3						0.6576				2.8515	
SP-3		0.222						0.0804		1.7596	
SP-3						1.1097	1.3499			1.9008	