

Molekulare Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten des Comet Assay in Pflanzen



Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Merten Menke
geb. am 03.09.1967 in Bonn

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. Gunter Reuter, Halle
2. Herr Prof. Dr. Günter Speit, Ulm
3. Herr Dr. habil. Ingo Schubert, Gatersleben

Halle (Saale), 25. April 2001

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einführung</i>	1
1.1	Kurzdarstellung einiger häufig verwendeter Biomarker für die Genotoxizitätsprüfung	2
1.1.1	Genmutationen	2
1.1.2	Cytogenetische Endpunkte	2
1.1.3	Dominante Letalfaktoren	3
1.1.4	DNA-Reparatur	4
1.1.5	DNA-Strangbrüche	4
1.2	Der Comet Assay	5
1.2.1	Methologie	5
1.2.2	Comet Assay mit Pflanzen	7
1.2.3	Mechanismen der Schweifbildung im Comet Assay	8
1.3	Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	11
2	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	13
3	<i>Literatur</i>	17
4	<i>Der Dissertation zugrunde liegende wissenschaftliche Publikationen und Manuskripte sowie Erklärung über den persönlichen Anteil an diesen Arbeiten</i>	22

1 Einführung

Methoden zur Identifikation und Detektion von Chemikalien sowie anderen Umweltfaktoren, die die Erbsubstanz verändern können, stellen einen präventiven Beitrag zum Schutz vor natürlicher oder durch den Menschen verursachter genotoxischer Belastung dar. Ein durch genotoxische Substanzen verursachtes Risiko für die Bevölkerung (und die sie umgebenden Ökosysteme) besteht einerseits in der Einführung vererblicher Mutationen in den Genpool durch Veränderungen der Keimbahn; andererseits können Mutationen in somatischen Zellen Krebs auslösen. Frühzeitiges Erkennen des genotoxischen Potentials chemischer Substanzen ist eine Voraussetzung, um die Exposition des Menschen überwachen zu können und eine gesundheitliche Gefährdung gegebenenfalls durch geeignete Maßnahmen zu reduzieren.

Prüfsysteme, mit deren Hilfe die Auswirkungen genotoxischer Belastung beurteilt werden können, beruhen auf verschiedenen experimentell erfassbaren Endpunkten (Biomarkern). Biomarker liefern Informationen über die Effekte der Prüfsubstanz auf ein biologisches System sowie eine Messgröße für die Exposition. Sie werden sowohl zur Beurteilung des mutagenen Potentials als auch zur Bewertung der kanzerogenen Eigenschaften einer Prüfsubstanz herangezogen. Ergänzend zu chemischen Überwachungsmethoden können Biomarker auch als Instrument für das Umweltbiomonitoring eingesetzt werden.

Auch in höheren Pflanzen sind verschiedene Tests zur Untersuchung cytogenetischer oder mutagener Effekte etabliert. Pflanzen eignen sich als Testsystem daher sowohl für Forschungs- als auch für Überwachungszwecke. Der technische Aufwand ist dabei meist niedrig, sodass auf Pflanzen basierende Testsysteme z.B. für das Umweltbiomonitoring in Entwicklungsländern empfohlen werden (Grant, 1994). Für die Anwendung von Pflanzen-Bioassays sprechen ausserdem: Einfache und kostengünstige Kultivierung, teilweise kurze Generationszeiten, dem Menschen vergleichbare cytogenetische Strukturen und Abläufe sowie eine positive Korrelation mit Testergebnissen in Säugern. Pflanzen sind bereits zur Überprüfung von Trink- und Abwässern, von Klärschlamm sowie der Luftbelastung in der Umgebung von industriellen Anlagen verwendet worden (Übersicht bei Grant, 1994).

1.1 Kurzdarstellung einiger häufig verwendeter Biomarker für die Genotoxizitätsprüfung

Da einzelne Tests keine umfassende und verlässliche Beurteilung der Wirkung eines Stoffes zulassen, müssen in der Praxis Testbatterien eingesetzt werden, die sich aus der Prüfung verschiedener Endpunkte zusammensetzen. Getestet wird u.a. auf Genmutationen, verschiedene cytogenetische Endpunkte, dominante Letalfaktoren, DNA-Reparatur sowie DNA-Strangbrüche.

1.1.1 Genmutationen

Genmutationen nach Genotoxinbehandlung können als erbliche Funktionsänderungen in Bakterien oder Säugerzellen, die bestimmte Mutanten befähigen, auf einem selektiven Medium zu wachsen, identifiziert und quantifiziert werden. Die Anzahl der Kolonien wird als Maß für die Mutagenität der überprüften Chemikalie genommen. Es wird davon ausgegangen, dass die Mutationshäufigkeit an dem überprüften Gen-Locus repräsentativ für alle Gene ist. Häufig eingesetzte Systeme sind der Ames-Test (Ames et al., 1975) in *Salmonella typhimurium* sowie der HPRT-Test mit V79- bzw. CHO-Zellen.

Für Pflanzen steht mit dem „*Tradescantia* stamen hair assay“ ein Test auf somatische Mutationsereignisse anhand der Verfärbung von Haarzellen der Staubblätter zur Verfügung (Sparrow et al., 1972). In Tabak treten nach Mutagenbehandlung dosisabhängig einzelne Blatt-Sektoren mit Farbabweichungen auf (Dulieu und Dalebroux, 1975). Auch andere Arten, darunter *Arabidopsis thaliana*, Mais, Gerste oder Soyabohne, sind für die Testung mutagener Einflüsse verwendet worden (Übersicht bei Grant, 1994).

1.1.2 Cytogenetische Endpunkte

Beobachtbare cytogenetische Endpunkte entstehen zumeist im Verlauf der Zellteilung. Chromosomenaberrationen (CA) sind Umlagerungen von Chromatinabschnitten, die zu sichtbaren Veränderungen der Chromosomenstruktur führen. Sie beruhen auf fehlerhaften Reunionsprozessen bei der Reparatur von DNA-Schäden, die nach Genotoxineinwirkung entstehen. CA sind an einer grossen Zahl menschlicher Erbkrankheiten und Tumoren beteiligt (Würgler, 1993). Mikronuklei (MN) entstehen, wenn Chromosomen oder azentrische Teile von Chromosomen während der Anaphase zurückbleiben und nicht in die neu entstehenden Zellkerne integriert werden, sondern von einer eigenen Membran umgeben

werden (Racine und Matter, 1984). Eine erhöhte Frequenz von MN deutet auf klastogene Eigenschaften oder auf eine Störung des Spindelapparates durch die Prüfsubstanz hin. Auch Schwesterchromatidaustausche (engl. SCE) sind ein Hinweis auf DNA-Schädigung nach genotoxischer Exposition. Die Reunion findet hier aber durch Rekombination an den homologen Stellen der Schwesterchromatiden statt. Diese Art von Austauschen können z.B. nach Einbau von Bromdesoxyuridin sichtbar gemacht werden. SCEs sind als Indikator in vielen Fällen sensitiver für Mutagen-Exposition als CAs (Schubert et al., 1979; Allen et al., 1984).

In Pflanzen finden insbesondere CA sowie MN Anwendung. Häufig verwendete Objekte sind die Knospen von *Tradescantia* („*Tradescantia* micronucleus assay“). In den Wurzel-Meristemen von *Allium cepa*, *Hordeum vulgare* sowie *Vicia faba* werden sowohl CA als auch MN ausgewertet.

Prüfsysteme, die auf der Induktion cytogenetischer Endpunkte beruhen, sind auf proliferierende Gewebe beschränkt. Durch die mikroskopische, heute teilweise bereits automatisierte Auswertung des Materials sind Aussagen zur Häufigkeit des Auftretens von cytogenetischen Endpunkten auf der Ebene individueller Zellen möglich. Das Spektrum der angeführten Ereignisse kann dabei bereits ein Hinweis auf die verursachende Primärläsion geben.

1.1.3 Dominante Letalfaktoren

Dominante Letalfaktoren sind genetische Schäden in Gameten, die deren Fähigkeit zur Verschmelzung nicht beeinträchtigen, aber zum Tod der resultierenden Embryos führen (Übersicht bei Green et al., 1985). Mit dem Dominant-letal-Test wird die Mutagen-Wirkung der Prüfsubstanz in der Keimbahn bestimmt. Als Testorganismen werden hauptsächlich männliche Nagetiere (Maus, Ratte, Hamster) verwendet, die nach der Mutagen-Behandlung mit unbehandelten Weibchen gepaart werden. Die Testgröße ist die Häufigkeit toter Embryonen, die nach der Entnahme des Uterus festgestellt wird. Die genetische Grundlage für die Embryonen-Letalität sind meist strukturelle und numerische Chromosomenmutationen. Es wird davon ausgegangen, dass sie mit anderen relevanten Mutations-Ereignissen einhergehen. Auch in pflanzlichen Embryonen sind Letalfaktoren (dominante sowohl als auch rezessive) zur Bestimmung mutagener Einflüsse herangezogen worden (s. z.B. Müller, 1963).

1.1.4 DNA-Reparatur

Nicht-semikonservative DNA-Synthese im Zuge von Reparaturprozessen (engl. "unscheduled DNA synthesis", UDS) ist ein weiteres Maß für das Einwirken genotoxischer Substanzen auf den Organismus. Die reparatur-bedingte DNA-Synthese wird mit Hilfe von ³H-markiertem Thymidin verfolgt und autoradiografisch ausgewertet. Das Testsystem gilt als einfach durchzuführen und relativ preiswert. Allerdings setzt es die Verwendung von radioaktiven Substanzen voraus und bedeutet aufgrund der langen Exposition des Filmmaterials (7-10 Tage) einen nicht unerheblichen Zeitaufwand (Übersicht bei Westendorf, 1993).

1.1.5 DNA-Strangbrüche

Der Bruch des Zucker-Phosphat-Rückgrates der DNA ist eine wichtige Primärläsion der Genotoxinwirkung. DNA-Strangbrüche können direkt etwa durch ionisierende Strahlung oder Sauerstoff-Radikale induziert werden; aber auch viele andere Arten von DNA-Läsionen können in Strangbrüche umgesetzt werden (Ahnström, 1988), z.B. durch Basen-Verlust und nachfolgende Hydrolyse an alkylierten Nukleotiden. Weiterhin werden zelluläre Vorgänge, wie DNA-Reparaturprozesse sowie DNA-Fragmentierung nach nekrotischem oder apoptotischem Zelltod erkannt, die auf genotoxische bzw. cytotoxische Einflüsse hinweisen. Ältere Techniken zur Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen sind u.a. „Alkalische Sucrose Sedimentation“ (McGrath und Williams, 1966), „Alkalisches Unwinding“ (Ahnström und Evardsson, 1974) oder „Alkalische Filter Elution“ (Kohn et al., 1981) bzw. ihre neutralen Entsprechungen. Verglichen mit cytogenetischen Methoden haben diese Protokolle den Mangel, nur durchschnittliche Messergebnisse über die Anzahl von DNA-Brüchen pro Zelle zu liefern. Unterschiedliche Zellantworten in heterogenen Populationen bleiben unberücksichtigt. Ein methodischer Nachteil wird neben dem Einsatz von Radioaktivität ausserdem darin gesehen, dass die aufzuwendenden Zell-Proben von relativ grossem Umfang sein müssen (Tice, 1995). Beispielhaft für Untersuchungen an Pflanzen zur Strangbruchinduktion nach Mutagenbehandlung mit Hilfe von „Sucrose Sedimentation“ bzw. „Filter Elution“ seien die Arbeiten von Angelis et al. (1986) bzw. Angelis et al. (1989) genannt.

1.2 *Der Comet Assay*

Mit der Entwicklung des Comet Assay (bei Verwendung von intakten Zellen auch „Single Cell Gel Elektrophoresis“, SCGE) werden die Nachteile der biochemischen Methoden zur Messung von DNA-Strangbrüchen durch die Bestimmung von Brüchen in der DNA in einzelnen Zellen im Fluoreszenzmikroskop umgangen. Der Comet Assay gilt heute als sensitiver Nachweis der Genotoxizität und ist aufgrund seiner einfachen Durchführung in den vergangenen Jahren von zahlreichen Gruppen übernommen und an ihre Anwendungen angepasst worden (Übersichten bei McKelvey-Martin et al., 1993; Tice, 1995; Fairbairn et al., 1995).

1.2.1 Methodologie

DNA-Strangbrüche wurden in individuellen Zellen erstmals von Rydberg und Johanson (1978) bestimmt. An Zellen, die auf einem Objektträger in Agarose eingebettet und mit Alkali behandelt wurden, konnte der Anteil einzelsträngiger DNA nach ionisierender Bestrahlung und Anfärbung mit Acridinorange anhand des Verhältnisses von roter (einzelssträngige DNA) zu grüner Fluoreszenz (doppelsträngige DNA) gemessen werden. Östling und Johansson (1984) variierten die Detektion, indem sie die in Agarose eingebetteten Zellen in Detergens lysierten und anschliessend einer kurzen Elektrophorese in einem neutralen Puffer unterwarfen. Dabei wanderte geschädigte DNA in Richtung Anode aus dem Zellkern aus. Wegen der Ähnlichkeit solcher Kerne mit Kopf (Zellkern) und Schweif (Wanderungsbereich der DNA) eines Kometen, kam für dieses Verfahren die Bezeichnung „Comet Assay“ auf. Die fluoreszenz-photometrisch bestimmte Menge der beweglichen DNA zeigte einen von der Strahlendosis abhängigen Effekt, wobei die untere Nachweisgrenze dieses Verfahrens bei weniger als 0.5 Gy γ -Strahlung lag. Von den Autoren wurden DNA-Doppelstrangbrüche als die DNA-Migration verursachende DNA-Läsion angenommen. Damit war sowohl das Protokoll als auch die Interpretation des neutralen Comet Assay bereits umschrieben.

Mit dem Ziel, die Anwendung des Comet Assay um die Detektion von DNA-Einzelsträngen zu erweitern, wurde eine alkalische Variante des Comet Assay entwickelt (Singh et al., 1988; Olive, 1989). Die Kern-DNA der Zellen wurde dazu in alkalischer Lösung ($\text{pH} \geq 12.3$) denaturiert und anschliessend unter denselben Bedingungen elektrophoretisiert. Mit

diesem Protokoll gelang auch der Nachweis von Oxidations-Schäden nach H_2O_2 -Behandlung, die im wesentlichen DNA-Einzelstrangbrüche induziert (Singh et al., 1988).

Mit zunehmender Anzahl von Anwendungen des Comet Assay wurde deutlich, dass die experimentellen Bedingungen, unter denen der Comet Assay durchgeführt wird, unabhängig von der Behandlung einen grossen Einfluss auf die Resultate haben. Insbesondere spielt der Grad der DNA-Denaturierung dabei eine Rolle. In der Regel führt eine stärkere alkalische Behandlung zu mehr DNA-Migration (Klaude et al., 1996; Fortini et al., 1996; Angelis et al., 1999). Mit Blick auf die Denaturierungs-Bedingungen können drei Varianten des Comet Assay unterschieden werden, die auch in den hier vorgestellten Arbeiten unter verschiedenen Aspekten Verwendung gefunden haben (s. auch Abb. 1):

- I. Im neutralen (N/N) Comet Assay werden weder vor noch während der Elektrophorese alkalische Bedingungen eingesetzt. Die Lyse von Membranen und Deproteinierung der DNA findet in Hochsalz (typischerweise 2.5 M NaCl) und/oder Detergens bei Raumtemperatur, die Elektrophorese in einem neutralen Puffer statt.
- II. Der vollständig alkalische (A/A) Comet Assay sieht sowohl einen Denaturierungsschritt als auch die Elektrophorese in alkalischer Lösung vor. In der Literatur wird zwischen „mildem“ Alkali (30 mM NaOH, pH = 12.3) und „hohem“ Alkali (300 mM NaOH, pH > 13) unterschieden. In den hier vorgestellten Arbeiten ist NaOH durchgehend in einer Konzentration von 300 mM verwendet worden.
- III. Im (A/N) Comet Assay, der auch als „semi-alkalische“ Variante bezeichnet wurde (Koppen et al., 1999), geht ein Denaturierungsschritt in 300 mM NaOH einer Elektrophorese in neutralem Puffer voraus.

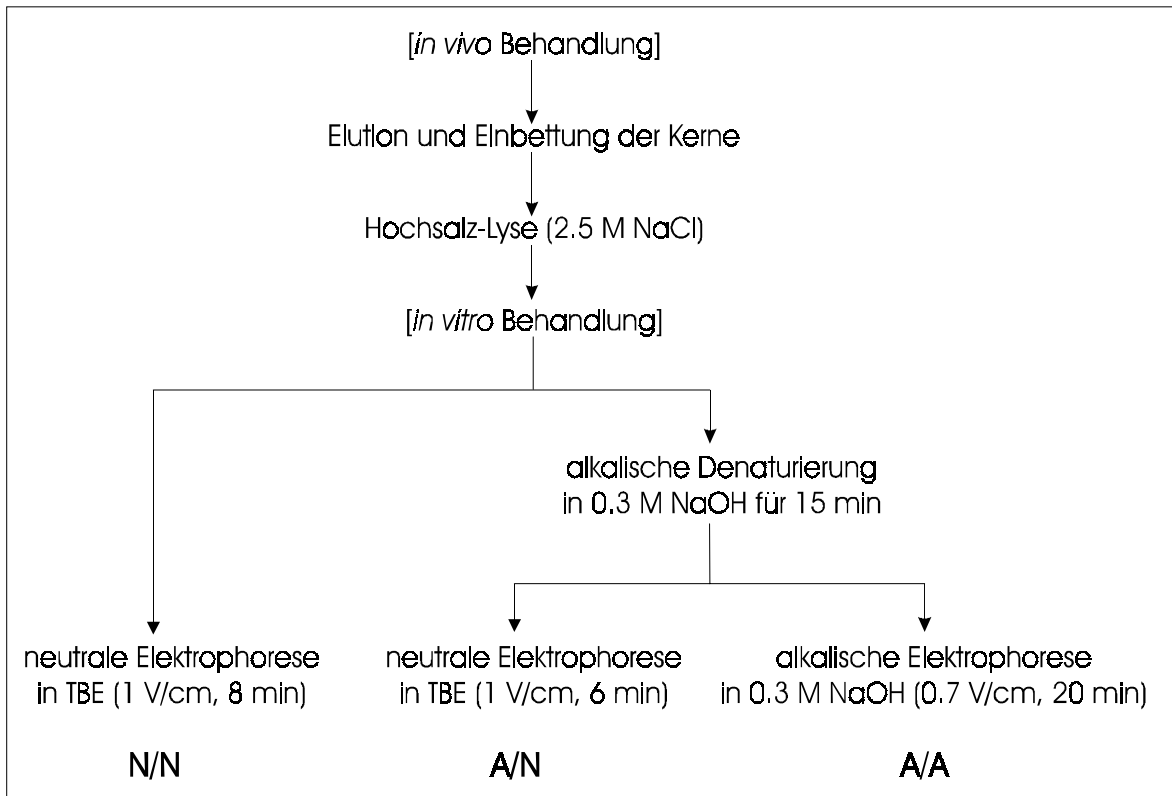


Abb. 1. Schematische Übersicht über die in den vorgelegten Arbeiten verwendeten Comet Assay Protokolle (Details wie für *Vicia faba* verwendet).

1.2.2 Comet Assay mit Pflanzen

Für Pflanzen wurde der Comet Assay erstmals an *Vicia faba* (Koppen und Verschaeve, 1996) beschrieben. Inzwischen ist der Comet Assay für weitere Arten etabliert worden: Zwiebel (Navarrete et al., 1997), Tabak (Gichner und Plewa, 1998), Karotte (Jiang et al., 1998) und *Impatiens balsamina* (Poli et al., 1999). Wegen der festen Zellwände und des hohen Anteils auto-fluoreszierender Bestandteile in Pflanzen-Zellen werden anstelle intakter Zellen für den Comet Assay bei Pflanzen isolierte Zellkerne verwendet. Dies erfordert das Zerschneiden des Gewebes in einem geeigneten Puffer und anschließendes Ausfiltern von Zell- und Geweberesten. Dabei werden Zellkerne in großer Zahl freigesetzt, die die Prozedur ohne relevante Schädigung überstehen. Versuche, pflanzliche Protoplasten für den Comet Assay einzusetzen, haben sich wegen eines wesentlich höheren Zeitaufwandes und durch den notwendigen Einsatz von Enzymen als weniger geeignet erwiesen (Angelis, persönliche Mitteilung).

Mit dem Comet Assay steht neben den cytogenetischen Methoden ein leicht handhabbares System für das Umweltbiomonitoring an Pflanzen zur Verfügung. Eine Pilot-Studie zur Untersuchung von Wasser- und Erdproben mit Hilfe des Comet Assay an *Vicia faba* ist von Koppen (1999) vorgestellt worden.

1.2.3 Mechanismen der Schweifbildung im Comet Assay

Die Natur der Genomschädigung sowie die molekularen Mechanismen, die im Comet Assay zur Schweifbildung führen, sind bisher unvollständig charakterisiert. Es wird angenommen, dass die Kometen-Schweife entweder aus DNA-Schleifen bzw. -Fäden und/oder freien DNA-Fragmenten bestehen. Nach der Lyse von Zellen in Hochsalz und nicht-ionischem Detergens liegt (unbeschädigte) DNA in Form von langen, miteinander verwobenen Schleifen vor, die an verbliebener Kern-Substanz (der „Kern-Matrix“) heften und durch Fluoreszenzfarbstoffe als „Halo“ sichtbar gemacht werden können. Diese Struktur wurde von Cook und Brazell (1975) als „Nucleoid“ bezeichnet. Die Verbindung der DNA an die Kern-Matrix ist nicht drehbar, sodass die DNA-Schleifen in diesem Zustand wahrscheinlich superspiralisiert sind (Thomas und Thomas, 1989). DNA-Strangbrüche führen zu einer Verminderung der Superspiralisierung der DNA, die nach γ -Bestrahlung als dosis-abhängige Zunahme des Umfangs der Halo sichtbar wird (Cook et al., 1976). Diese Auflockerung („relaxation“) der DNA ist schon von Östling und Johanson (1984) als die Ursache für die vermehrte DNA-Migration nach ionisierender Bestrahlung im neutralen Comet Assay interpretiert worden. Die Schweife würden in diesem Fall hauptsächlich aus gestreckten DNA-Schleifen bestehen. Bei einer grossen Anzahl von Doppelstrangdiskontinuitäten können im neutralen Comet Assay auch freie DNA-Enden sowie DNA-Fragmente im Schweif auftreten, wie von Klaude et al. (1996) durch eine Elektrophorese in zwei Dimensionen nach einer hohen Dosis γ -Bestrahlung (200 Gy) gezeigt wurde.

Alkalische Denaturierung führt zur Aufwindung der DNA-Doppelhelix. Mit zunehmendem Grad der Denaturierung werden DNA-Einzelstränge freigesetzt, die während der Elektrophorese aus dem Kern auswandern können. DNA-Einzelstrangbrüche fördern und beschleunigen ihrerseits die Denaturierung. Rydberg (1975) fand eine beschleunigte Aufwindung von DNA aus Säugerzellen nach ionisierender Bestrahlung, wobei die Rate der DNA-Denaturierung auch mit der Ionenstärke und der Temperatur der Denaturierungs-Lösung positiv korreliert war. Von Yendle et al. (1997) wurde gezeigt, dass die DNA-Denaturie-

rung mit der Dauer der Alkali-Behandlung zunimmt und dadurch die DNA-Migration fördert. Davon war die DNA von mit Alkylantien behandelten Zellen stärker betroffen als DNA aus unbehandelten Zellen. Gleichzeitig wird der Anteil mobiler DNA im alkalischen Comet Assay durch die Häufigkeit von Brüchen in der DNA bestimmt: je kürzer die Abstände zwischen den Strang-Brüchen, desto grösser ist die Anzahl freier DNA-Enden und -Fragmente, die während einer bestimmten Zeit in Alkali von der intakten DNA gelöst werden. Daher können bei gleichen Denaturierungsbedingungen Kometen behandelter Zellen durch zusätzliche DNA-Migration von unbehandelten unterschieden werden. Verglichen mit der neutralen Variante treten im alkalischen Comet Assay in höherem Maße DNA-Fragmente ohne Verbindung zum Kern auf. Bei sehr schwerer Schädigung kann dies zu Kometen führen, deren DNA vollständig beweglich geworden ist und ausschliesslich im Schweif vorliegt.

Bislang ist unklar, in welchem Umfang sogenannte „alkali-labile“ Stellen, z.B. abasische Stellen, die durch den Verlust von Basen, entweder durch spontanen Zerfall oder durch aktive Entfernung geschädigter Basen im Zuge der Basenexcisions-Reparatur entstehen, in den alkalischen Comet Assay-Varianten in DNA-Strangbrüche umgesetzt und detektiert werden können. Die betroffenen Zuckerreste gelten als anfällig für eine Hydrolyse der Phosphodiester-Bindung durch Alkali ($\text{pH} > 12.8$, Lindahl und Anderson, 1972). Durch eine zusätzliche Behandlung von Comet-Präparaten mit AP-spezifischen Endonukleasen konnte gezeigt werden, dass ein bedeutender Anteil an AP-Stellen im Comet Assay nicht detektiert wird (Fortini et al., 1996; Angelis et al., 1999).

Die Zellzyklus-Phase ist ein weiterer Faktor, der die Schweifbildung beeinflussen kann. Olive und Banath (1993a, b) beschrieben, dass S-Phase-Zellen im alkalischen Assay mehr bzw. im neutralen Assay weniger DNA-Migration zeigen als G1- und G2-Zellen. Die Autoren führen die Zunahme der Mobilität der DNA im alkalischen Assay auf aktive Replikationspunkte zurück, die während der Denaturierung einzelsträngige DNA-Enden bzw. -Fragmente freisetzen. Hingegen sollen Replikations-Gabeln und blasenförmige Konformationen, die im neutralen Assay nicht aufgelöst werden, eine verringerte Mobilität zur Folge haben. Eine Abhängigkeit der im alkalischen Comet Assay messbaren DNA-Integrität ist auch vom Alter der untersuchten Zellen bzw. Gewebe gefunden worden (Singh et al., 1991; Koppen et al., 1999).

Wegen der grossen Anzahl wenig verstandener Einflussfaktoren weist der Comet Assay in der Praxis eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen auf, die an den Versuchsparametern vorgenommen werden. Die für den Comet Assay typische hohe Variabilität der Ergebnisse macht interne Kontrollen als Vergleichswerte für jedes Experiment notwendig, um eine sichere Aussage zur Wirkung eines getesteten Agens treffen zu können. Ergebnisse, die aus verschiedenen Arbeitsgruppen kommen, sind nur unzureichend miteinander vergleichbar. Eine umfangreiche Liste im Detail voneinander abweichender Protokolle ist bisher beschrieben worden (Zusammenstellung bei Fairbairn et al., 1995; Tice, 1995).

1.3 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Zum Zeitpunkt, an dem die vorliegende Arbeit begonnen wurde, lagen nur zwei Publikationen zum Comet Assay bei Pflanzen vor (Koppen und Verschaeve, 1996; Navarrete et al., 1997). Deshalb sollten Rahmenbedingungen gefunden werden, die den Einsatz des Comet Assay für die Genotoxizitätsprüfung an verschiedenen Pflanzenarten effizient und reproduzierbar ermöglichen. Das Ziel war weiterhin, Beiträge zur Aussagefähigkeit und den molekularen Grundlagen, die der Schweifbildung zugrunde liegen, zu leisten.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Die Schweifbildung sollte in Kontrollexperimenten ohne Genotoxineinwirkung unter alkalischen bzw. neutralen Bedingungen durch den Einsatz der N/N, A/N und A/A Comet Assay Protokolle charakterisiert werden. Um für den Comet Assay eine günstige Auflösung zu erhalten, sollten Bedingungen gefunden werden, unter denen sie reproduzierbar niedrig bleiben.
2. Durch Einwirkung spezifischer Endonukleasen auf isolierte Zellkerne sollten DNA-Einzel- und Doppel-Strangbrüche induziert werden, um anschliessend zu prüfen, mit welchem Comet Assay-Protokoll diese Läsionen effizient erfasst werden können.
3. Ein Verfahren zur Kombination von Comet Assay mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung sollte entwickelt werden, um mit DNA-Sonden, die definierte Chromatin-Domänen erkennen, zu prüfen, ob eine über- oder unterproportionale Beteiligung spezifischer DNA-Fractionen in Abhängigkeit von den angewendeten Mutagenen bzw. des Typs der DNA-Schädigung an der Schweifbildung nachgewiesen werden kann.
4. An durchflusscytometrisch sortierten Zellkernen sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Zellzyklusphase in unbehandelten Kontrollen bzw. in Mutagen-behandelten Zellen auf die Schweifbildung hat.
5. Nach *in vivo* Behandlung mit monofunktionell-alkylierenden Agenzien sollten unterschiedliche Aspekte der Schweifbildung im Comet Assay untersucht werden:

- a) Dosis-Abhängigkeiten der Schweifbildung nach Anwendung verschiedener Comet Assay Protokolle.
 - b) Abhängigkeit der Schweifbildung von der Zellzyklusphase während der Mutagen-Einwirkung.
 - c) Beteiligung heterochromatischer Chromatin-Domänen, die als „Aberration-hot spots“ bekannt sind, an der Schweifbildung.
6. Vergleichend sollte die Schweifbildung nach *in vivo* Behandlung mit folgenden Mutagenen, die verschiedene DNA-Schäden (Primärläsionen) verursachen, geprüft und der Entstehung anderer genotoxischer Endpunkte (Chromosomenaberrationen, Genmutationen) gegenüber gestellt werden:
- a) Maleinsäurehydrazid, ein in vielen Pflanzen sowohl mutagenes als auch clastogenes Uracil-Analogon, das als Wachstumsregulator und Herbizid eingesetzt wird.
 - b) Bleomycin, das direkt DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche induziert.
 - c) Mitomycin C, das als polyfunktionelles Alkylans DNA-crosslinks hervorruft.
7. Die Wirkung von Nachbehandlungszeiten auf die Rückbildung der Kometenschweife sollte nach Behandlung mit verschiedenen Agenzien festgestellt werden, um Rückschlüsse auf die Reparaturkinetik für die jeweiligen Schadenstypen zu ziehen.
8. Die Schweifbildung sollte nach Alkylantien-Behandlung unter adaptiven und nichtadaptiven Bedingungen getestet werden, um zu prüfen, ob adaptive Effekte, vergleichbar der „Clastogenen Adaptation“ (Rieger et al., 1982) im Comet Assay nachvollziehbar sind.

2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in eckigen Klammern angegebenen Ziffern verweisen auf die Liste der in diese Arbeit eingeschlossenen wissenschaftlichen Publikationen auf S. 22 f.

1. Der Anteil DNA im Schweif von Kernen nicht behandelter Kontrollansätze hängt vom verwendeten Comet Assay Protokoll ab. Der Comet Assay ist damit ein semi-quantitatives Verfahren. Reproduzierbar am niedrigsten sind Negativ-Kontrollen im A/N Comet Assay. Höhere Werte im A/A Comet Assay werden auf verlängerte Exposition in starkem Alkali zurückgeführt. Die Ursachen für vergleichbar hohe Kontroll-Werte im N/N Comet Assay sind noch unverstanden [1, 2].
2. Nach Behandlung isolierter Zellkerne mit Endonukleasen, konnten DNA-Einzel- sowie -Doppelstrangbrüche mit dem A/N Comet Assay nachgewiesen werden. Der N/N Comet Assay erfasst dagegen ausschliesslich DNA-Doppelstrangbrüche [1].
3. Eine Kombination des Comet Assay mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde erstmals für pflanzliche Zellkerne etabliert [1]. Die Verteilung von spezifischen FISH-Signalen in Kopf und Schweif wurde gleichzeitig mit den relativen DNA-Gehalten erfasst. Durch Hybridisierung mit DNA-Sonden für spezifische Chromatin-Domänen von *Vicia faba* (heterochromatische *Fok*-Elemente, rDNA, Telomere) konnte nach Endonuklease-Behandlung mit *FokI*-Endonuklease (schneidet *Fok*-Elemente alle 59 bp, verdaut Euchromatin dagegen nur wenig), *EcoRI* (hat keine Restriktionsstellen in *Fok*-Elementen, verdaut Euchromatin gleichmäßig und stärker als heterochromatische Bereiche) sowie DNaseI (eingesetzt als Kontrolle mit zufällig verteilten Schnittstellen) und Comet Assay gezeigt werden [1], dass
 - a) die für die Schweifbildung verantwortlichen DNA-Brüche auf die verwendeten Enzyme zurückzuführen waren,
 - b) der Anteil der Hybridisierungssignale im Schweif den Schädigungsgrad in den entsprechenden Chromatin-Domänen widerspiegelt.
4. Im A/N Comet Assay von unbehandelten, anhand ihres DNA-Gehaltes sortierten Zellkernen verschiedener Interphasestadien zeigten Kerne der S-Phase einen um ca. 8% höheren Anteil von DNA im Schweif, verglichen mit G1- bzw. G2-Phase-Kernen [2]. Die erhöhte DNA-Mobilität wurde mit der in der Synthesephase auftretenden

den grossen Anzahl an DNA-Diskontinuitäten erklärt. Der Unterschied blieb auch nach Behandlung mit niedrigen Mutagendosen erhalten, war aber nach hohen Dosen aufgrund der starken DNA-Schädigung nicht mehr nachweisbar.

5. Mit Hilfe des Comet Assay wurden genotoxische Effekte nach *in vivo*-Einwirkung monofunktionell alkylierender Agenzien (MNU, MMS) charakterisiert:
 - a) Eine dosisabhängige Zunahme von DNA im Schweif trat im A/N bzw. A/A Comet Assay auf. Dabei wurde mit dem A/A Protokoll sehr früh bereits der Sättigungsbereich (mehr als 90% DNA im Schweif) erreicht, während sich mit dem A/N Comet Assay eine lineare Dosiswirkungsbeziehung im Bereich biologisch relevanter Dosen ergab. Keine signifikante Zunahme selbst bei hohen Dosen war dagegen mit dem N/N Comet Assay zu beobachten. Dieser Befund bestätigt, dass Alkylantien in der Regel keine DNA-Doppelstrangbrüche verursachen. Die gemessene DNA-Schädigung wird auf Reparatur-bedingte Einzelstrangbrüche zurückgeführt [2, 3].
 - b) Im Gegensatz zu Schwesterchromatidaustauschen und Chromosomenaberrationen, die ausschliesslich in solchen Zellen auftreten, die während einer Alkylantien-Behandlung die S-Phase durchlaufen, sind von den im Comet Assay nachgewiesenen Läsionen alle Interphase-Stadien betroffen [2].
 - c) Die heterochromatischen *Fok*-Elemente in *Vicia faba* sind proportional zur Gesamt-DNA an der Schweifbildung beteiligt. Die im Heterochromatin dieser Pflanze zu beobachtende Häufung S-Phase-abhängiger Chromatidtyp-Aberrationen nach Alkylantien-Behandlung steht daher nicht im Zusammenhang mit einer bevorzugten Entstehung oder Entfernung von DNA-Strangbrüchen. Sie wird stattdessen auf fehlerhafte Rekombinations-Reparatur von Primärläsionen während der S-Phase zurückgeführt, die besonders häufig Bereiche ausgedehnter Tandem-Repeats betreffen [2].
6. DNA-Effekte wurden nach *in vivo* Behandlung mit Genotoxinen verschiedener Wirkgruppen vergleichend untersucht:
 - a) Maleinsäurehydrazid führte nach Dosen, die in *Vicia faba* Chromatidenaberrationen und in Tabak somatische Mutationen auslösen, weder im A/N noch im A/A Comet Assay zu einer signifikanten Zunahme der DNA-Migration in Zellkernen von Ackerbohne, Tabak und *Arabidopsis thaliana*. Es ist da-

mit das erste genotoxische Agens, dessen Wirkung nicht im Comet Assay nachweisbar ist [3, 4].

- b) Das Radiomimetikum Bleomycin induziert direkt DNA-Einzel- und -Doppelstrangbrüche, die erwartungsgemäß sowohl im A/N als auch im N/N Comet Assay dosisabhängig zu Schweifbildung führen [3].
 - c) Das polyfunktionale Alkylans Mitomycin C verringert bei gleichzeitiger Einwirkung von MNU direkt nach der Behandlung dosisabhängig die DNA-Migration im A/N Comet Assay. Dieser Befund wird über die migrationshemmende Wirkung der durch Mitomycin C verursachten DNA-DNA-crosslinks erklärt [3]. Eine Reduktion der DNA-Migration durch Mitomycin C wurde auch in γ -bestrahlten Säugerzellen gefunden (Merk und Speit, 1999).
7. Erholungszeiten nach Behandlung mit Alkylantien bzw. Bleomycin haben mutagenabhängig unterschiedliche Wirkung auf die Schweifbildung im A/N Comet Assay:
- a) Nach MNU/MMS kann innerhalb von 48 h Erholungszeit in *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen und in Blättern von *Hordeum vulgare* keine Reduktion der DNA-Schädigung beobachtet werden [3, 5].
 - b) Nach MNU/MMS in Wurzelspitzen von *Hordeum vulgare* tritt nach 6 h Erholungszeit eine Verringerung der DNA-Migration auf, ohne dass im Verlauf von 48 h die Negativ-Kontrollwerte erreicht werden [5].
 - c) Nach Bleomycin-Behandlung von *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen werden innerhalb 1 h Erholungszeit die induzierten DNA-Strangbrüche vollständig repariert [3].

Es wird vermutet, dass der lang andauernde Verbleib von Alkylierungs-Schäden auf eine geringe Reparatur-Kapazität für diesen Typ von Läsionen insbesondere in ausdifferenzierten, nicht teilungs-aktiven Zellen zurückzuführen ist. Eine häufig beobachtete Zunahme von DNA-Migration besonders in frühen Nachbehandlungszeiten könnte ein Hinweis auf eine Akkumulation von nicht geschlossenen Strangbrüchen aufgrund verzögerter Ligation sein. Durch Bleomycin direkt induzierte DNA-Strangbrüche werden dagegen wahrscheinlich sehr effizient über einen anderen Mechanismus („end joining“) beseitigt [3].

8. Mit dem Comet Assay können adaptive Vorgänge, vergleichbar der „Clastogenen Adaptation“ erfasst werden. Bei *Vicia faba* führt eine Vorbehandlung mit niedrigen Dosen der Alkylantien MNU bzw. MMS vor einer („Challenge“-) Behandlung mit hohen Dosen derselben Mutagene im A/N Comet Assay zu einer geringeren DNA-Migration als nach Behandlung mit einer hohen Dosis allein [6]. Dabei ist wechselseitige „Cross-Adaptation“ möglich [6]. Analog dazu tritt in *Hordeum vulgare* eine adaptive Antwort auf Alkylantien nach Konditionierung mit CdCl₂ auf [5].

Die Reparatur von apurinen (AP-) Stellen ist unter adaptiven Bedingungen beschleunigt. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass Glycosylasen und/oder AP-Endonukleasen an der Adaptation beteiligt sind [6].

Im A/A Comet Assay zeigen konditionierende und „Challenge“-Behandlung nahezu additive Effekte. Dies weist auf einen erheblichen Anteil an Läsionen („Alkali-labile Stellen“) hin, die in dieser Assay-Variante sehr effizient nachgewiesen werden, aber keine Bedeutung für die Adaptation haben [6].

Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid unterbindet die Adaptation [6].

Für drei Varianten des Comet Assay wurden reproduzierbare Bedingungen zur Bearbeitung verschiedener Pflanzenarten etabliert (*Vicia faba*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana*). Die Kombination des Comet Assay mit anderen Techniken erlaubte zudem die Lösung weitergehender Fragestellungen hinsichtlich der Beteiligung spezifischer Chromatin-Domänen an der Schweifbildung, des Einflusses der Zellzyklusphase auf die DNA-Migration sowie der Entstehung von Aberrationsclustern in Heterochromatinbereichen. Ausser für Maleinsäurehydrazid erlaubt die jeweils geeignete Variante des Comet Assay, genotoxinbedingte DNA-Schäden zu erfassen, die in vergleichbaren Konzentrationsbereichen auch in anderen Testsystemen zu positiven Resultaten führen.

3 Literatur

- ALLEN, J.W., BROCK, K., CAMPBELL, J., SHARIEF, Y. (1984), Sister Chromatid Exchange Analysis in Lymphocytes. In: Ansari, A.A. und de Serres, F.J. (Hrsg.), „Single-cell Mutation Monitoring Systems“, New York, plenum Press, ss.145-163.
- AMES, B.N., MCCANN, J., YAMASAKI, E. (1975), Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.* 31, 347-364.
- ANGELIS, K.J., VELEMINSKY, J., RIEGER, R., HEINDORFF, K. (1986), Interaction of Maleic Hydrazide or N-methyl-N-nitrosourea with root tip DNA of *in vitro* cultured *Vicia faba* embryos, *Biol. Zbl.* 105, 29-36.
- ANGELIS, K.J., VELEMINSKY, J., RIEGER, R., SCHUBERT, I. (1989), Repair of bleomycin-induced double-strand breaks in *Vicia faba*, *Mutation Res.* 212, 155-157.
- ANGELIS, K.J., DUSINSKA, M., COLLINS, A.R. (1999), Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity, *Electrophoresis* 20, 2133-2138.
- AHNSTRÖM, G. (1988), Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: a review, *International Journal of Radiation Biology* 54, 695-707.
- AHNSTRÖM, G. und EVARDSSON, K.A. (1974), Radiation induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxyapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation, *Int. J. Radiat. Biol.* 26, 493-497.
- COOK, P.R. und BRAZELL, I.A. (1975), Supercoils in human DNA, *J. Cell. Sci.* 19, 261-279.
- COOK, P.R., BRAZELL, I.A., JOST, E. (1976), Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA, *J. Cell Sci.* 22, 303-324.
- DULIEU, H.L. und DALEBROUX, M.A. (1975), Spontaneous and induced reversion rates in a double heterozygous mutant of *Nicotiana tabacum* var. xanthi n.c.: dose-response relationship, *Mutation Res.* 30, 63-70.
- FAIRBAIRN, D.W., OLIVE, P.L., O'NEILL, K.L. (1995), The comet assay: a comprehensive review, *Mutation Res.* 339, 37-59.

- FORTINI, P., RASPAGLIO, G., FALCHI, M., DOGLIOTTI, E. (1996), Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay, *Mutagenesis* 11, 169-175.
- GICHNER, T. und PLEWA, M.J. (1998), Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants, *Mutation Res.* 401, 143-152.
- GRANT, W.F. (1994), The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens, *Mutation Res.* 310, 175-185.
- GREEN, S., AULETTA, A., FABRICANT, J., KAPP, R., MANANDHAR, M., SHEU, C.-J., SPRINGER, J., WHITFIELD, B. (1985), Current report status of bioassays in genetic toxicology — the dominant lethal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gen-Tox Program, *Mutation Res.* 154, 49-67.
- JIANG, X.-F., HAI-ZHEN, Z., JUN, Z., MAO-MING, C., YAO-REN, D. (1998), Application of the comet assay in plant protoplast apoptosis detection, *Acta Bot. Sin.* 40, 928-932.
- KLAUDE, M., ERIKSSON, S., NYGREN, J., AHNSTRÖM, G. (1996), The comet assay: mechanisms and technical considerations, *Mutation Res.* 362, 89-96.
- KOHN, K.W., EWIG, R.A.G., ERICSON, L.C., ZWELLING, L.A. (1981), Measurement of strand breaks and crosslinking by alkaline elution. In: Friedberg, E.C. und Hanawalt, P.C. (Hrsg.), *DNA Repair, A Laboratory Manual of Research Procedures*, Marcel Dekker, New York, Vol. 1 part B, ss. 379-401.
- KOPPEN, G. (1999), Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay for plants a tool to assess DNA integrity, Dissertation, Universität Brüssel, ss. 53-57.
- KOPPEN, G. und VERSCHAEVE, L. (1996), The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells, *Mutation Res.* 360, 193-200.
- KOPPEN, G., TONCELLI, L.M., TRIEST, L., VERSCHAEVE, L. (1999), The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves, *Mechanisms of Ageing and Development* 110, 13-24.
- LINDAHL, T. und ANDERSON, A. (1972), Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid, *Biochemistry* 11, 3618-3623.

- MADLE, S. und LANG, R. (1993), Beurteilung und Bewertung von Genotoxizitätsbefunden. In: Fahrig, R. (Hrsg.) „Mutationsforschung und Genetische Toxikologie“, Darmstadt, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, ss. 189-198.
- MCGRATH, R.A. und WILLIAMS, R.W. (1966), Reconstruction in vivo of irradiated *E. coli* desoxyribonucleic acid; the rejoining of broken pieces, *Nature* 212, 534-535.
- MCKELVEY-MARTIN, V.J., GREEN, M.H.L., SCHMEZER, P., POOL-ZOBEL, B.L., DE MEO, M.P., COLLINS, A. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review, *Mutation Res.* 288, 47-63.
- MERK, O. und SPEIT, G. (1999), Detection of crosslinks with the Comet Assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 167-172.
- MÜLLER, A.J. (1963), Embryonentest zum Nachweis rezessiver Letalfaktoren bei *Arabidopsis thaliana*, *Biol. Zbl.* 82, 133-163.
- NAVARRETE, M.H., CARRERA, P., DE MIGUEL, M., DE LA TORRE, C. (1997), A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assesment of DNA damage in higher plants, *Mutation Res.* 389, 271-277.
- OLIVE, P.L. (1989), Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids, *Radiat. Res.* 117, 79-92.
- OLIVE, P.L. und BANATH, P. (1993a), Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: „tail moment“ as a function of the position in the cell cycle, *Mutation Res.* 294, 275-283.
- OLIVE, P.L. und BANATH, P. (1993b), Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵I dUrd, *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 349-358.
- ÖSTLING, O. und JOHANSON, K.J. (1984), Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298.
- POLI, P., BUSCHINI, A., FICARELLI, A., RESTIVO, F.M., ZUCCI, T.M., ROSSI, C. (1999), The comet assay applied to microorganisms and plants: Methods and problems, *Neoplasma* 46 (Supplement), 76-78.
- RACINE, R.R. und MATTER, B.E. (1984), The Micronucleus test as an indicator of mutagenic exposure. In: Ansari, A.A. und de Serres, F.J. (Hrsg.), „Single-cell Mutation Monitoring Systems“, New York, plenum Press, ss. 217-231.

- RIEGER, R., MICHAELIS, A., NICOLOFF, H. (1982), Inducible repair processes in plant meristems? 'Below-additive effects' of unequally fractionated clastogen concentrations, *Biol. Zbl.* 101, 125-138.
- RYDBERG, B. (1975), The rate of strand separation in alkali of DNA in irradiated mammalian cells, *Radiation Research* 61, 274-287.
- RYDBERG, B. und JOHANSON, K.J. (1978), Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt, P.C., Friedberg, E.C., Fox, C.F. (Hrsg.) *DNA repair mechanisms*, Academic Press, New York, ss. 465-468.
- SCHUBERT, I., STURELID, S., DÖBEL, P., RIEGER, R. (1979), Intrachromosomal distribution patterns of mutagen-induced SCEs and chromatid aberrations in reconstructed karyotypes of *Vicia faba*, *Mutation Res.* 344, 41-54.
- SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- SINGH, N.P., DANNER, D.B., TICE, R., PEARSON, J.D., BRANT, L.J., MORELL, C.H. SCHNEIDER, E.L. (1991), Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age, *Mutation Res.* 256, 1-6.
- SPARROW, A.H., UNDERBRINK, A.G., ROSSI, H.H. (1972), Mutations induced in *Tradescantia* by small doses of X-rays and neutrons: analysis of dose-response curves, *Science* 176, 916-918.
- TICE, R. (1995), The single cell gel/Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips, D.H. und Venitt, S. (Hrsg.), „Environmental Mutagenesis“, Oxford, bios Scientific Publishers, pp. 315-339.
- THOMAS, E.A. und THOMAS, C.A. (1989), Nucleoid Halo expansion indirectly measures DNA damage in single cells, *Experimental Cell Research* 183, 149-158.
- VENIT, S. und PARRY, J.M. (1984), Background to mutagenicity testing. In: Venitt, S. und Parry, J.M. (Hrsg.), „Mutagenicity testing“, Washington, IRL Press, ss.1-24.
- WESTENDORF, J. (1993), Ausserplanmässige DNA-Synthese (UDS). In: Fahrig, R. (Hrsg.) „Mutationsforschung und Genetische Toxikologie“, Darmstadt, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, ss. 199-206.

- WÜRGLER, F.E. (1993), Genetische Endpunkte. In: Fahrig, R. (Hrsg.) „Mutationsforschung und Genetische Toxikologie“, Darmstadt, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, ss. 18-29.
- YENDLE, J.E., TINWELL, H., ELLIOTT, B.M., ASHBY, J. (1997), The genetic toxicity of time: Importance of DNA-unwinding time to the outcome single-cell gel electrophoresis assays, Mutation Res. 375, 125-136.

Für weitere Referenzen siehe Literaturverzeichnisse der dieser Arbeit zugrunde liegenden Originalpublikationen und Manuskripte (ab S. 22)

4 Der Dissertation zugrunde liegende wissenschaftliche Publikationen und Manuskripte sowie Erklärung über den persönlichen Anteil an diesen Arbeiten

- [1] MENKE, M., ANGELIS, K.J., SCHUBERT, I. (2000), Detection of Specific DNA Lesions by a Combination of Comet Assay and FISH in Plants, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35(2), 132-138:

Die Veröffentlichung resultiert aus Experimenten, die ausschließlich von mir u.a. auf Anregung von Dr. K. J. Angelis und unter der Betreuung von Dr. habil I. Schubert durchgeführt wurden.

- [2] MENKE, M., MEISTER, A., SCHUBERT, I. (2000) N-Methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage detected by the comet assay in *Vicia faba* nuclei during all interphase stages is not restricted to chromatid aberration hot spots, *Mutagenesis* 15(6), 503-506:

Die Veröffentlichung resultiert aus Experimenten, die, mit Ausnahme der durchflusscytometrischen Sortierung der Zellkerne (Dr. A. Meister), ausschließlich von mir unter der Betreuung von Dr. habil. I. Schubert durchgeführt wurden.

- [3] MENKE, M., CHEN, I-P., ANGELIS, K. J., SCHUBERT, I., DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the Comet Assay after treatment with different classes of genotoxins, *Mutation Res.*, im Druck.

Die Veröffentlichung resultiert aus Comet-Assay-Experimenten, die ausschließlich von mir unter der Betreuung von Dr. habil. I. Schubert durchgeführt wurden. Das verwendete Pflanzen-Material wurde teilweise von mir, teilweise von Dr. I-P. Chen hergestellt und behandelt. Die Anzucht und Behandlung der *Arabidopsis*-Keimlinge geht methodisch auf Versuche von Dr. K. J. Angelis zurück.

- [4] GICHNER, T., MENKE, M., STAVREVA, D.A., SCHUBERT, I. (2000) Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no DNA damage detectable by the Comet assay in tobacco and field beans, *Mutagenesis* 15(5), 385-389:

Die in dieser Veröffentlichung publizierten Ergebnisse an *Vicia faba* resultieren aus Experimenten, die ausschließlich durch mich unter der Betreuung von Dr. habil. I. Schubert durchgeführt wurden. Dr. T. Gichner und Dr. D.A. Stavreva erarbeiteten die Daten, die sich auf *Nicotiana tabacum* beziehen.

- [5] JOVTCHEV, G., MENKE, M., SCHUBERT, I., The Comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley, *Mutation Res.*, im Druck.

Die notwendigen Vorversuche zur Etablierung des Comet Assay an Blättern von *Hordeum vulgare* wurden von mir, Vorversuche an Wurzeln zu gleichen Teilen von mir und Dr. G. Jovtchev bewerkstelligt. Die Veröffentlichung resultiert aus Comet-Assay-Experimenten, die von uns gemeinsam ausgeführt wurden, wobei die Behandlung der Pflanzen sowie die Auswertung der Kometen zum grösseren Teil von Dr. G. Jovtchev geleistet wurde. Dr. habil. I. Schubert betreute die Arbeiten.

- [6] ANGELIS, K.J., MCGUFFIE, M., MENKE, M., SCHUBERT, I. (2000) Adaption to Alkylation Damage in DNA Measured by the Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 36, 146-150.

Die Veröffentlichung resultiert aus Experimenten, die unter meiner Beteiligung im Institut für Experimentelle Botanik in Prag (Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik) gemeinsam mit Dr. K. J. Angelis und M. McGuffie durchgeführt wurden. Dr. K. J. Angelis und Dr. habil. I. Schubert betreuten die Arbeiten.