

6. Material und Methoden

6.1 Zellfraktionierung der Rinderleber

Die Gewinnung verschiedener Zellorganellen wird durch eine konventionelle Methode der differentiellen Zentrifugation erreicht. Nach einer grob mechanischen Zerkleinerung des Ausgangsmaterials wird die unterschiedliche Dichte der Organellen ausgenutzt, um eine sukzessive Abtrennung zu bewirken. Der Transport der Rinderleber frisch geschlachteter Tiere findet auf Eis statt. Alle weiteren Schritte erfolgen bei 4°C.

6.1.1 Isolierung von Mitochondrien

Nach der Entfernung der Kapsel wird die Leber in kleine (ca. 3x3cm) Gewebestücke zerschnitten; dabei werden größere Gefäße und Bindegewebsanteile entfernt. Anschließend werden die Gewebestücke gründlich mit Homogenisationspuffer gewaschen bis das Waschwasser keine Rotfärbung mehr aufweist.

(1) Das Homogenisieren des Gewebes erfolgt danach in einem Waring-Blender in Homogenisationspuffer (drei Zyklen zu je 20 Sekunden, mittlere Stufe). (2) Für die Abtrennung von Zelltrümmern, nicht homogenisiertem Gewebe und der Kernfraktion wird das Homogenat 15 Minuten bei $2.000 \times g$ zentrifugiert und der resultierende Überstand durch zwei Lagen Gaze (Mull) filtriert. (3) Aus diesem Filtrat werden nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei $12.000 \times g$ Mitochondrien gewonnen, die im Anschluß in einem motorbetriebenen Dounce-Homogenisator (B. Braun-Melsungen) mit Homogenisationspuffer resuspendiert werden. (4) Um Verunreinigungen, insbesondere mit der Kernfraktion, zu minimieren, werden die Schritte (2, ohne Filtration) und (3) zweimal wiederholt. (5) Nach der letzten Zentrifugation werden die Mitochondrien in wenig Homogenisationspuffer resuspendiert (s.o.), aliquotiert und tiefgefroren (-70°C) aufbewahrt.

Homogenisationspuffer: 50mM Tris/HCl, pH 7,5
 250mM Saccharose
 0,5mM EDTA

6.1.2 Herstellung von submitochondrialen Partikeln (SMPs)

Für einige Kontrollexperimente wurden invertierte Vesikel der inneren Mitochondrienmembran, sogenannte submitochondriale Partikel, hergestellt. Isolierte Mitochondrien (6.1.1) werden dazu in eine vorgekühlte French-Press Zelle überführt und dreimal bei einem Druck von 10.000 psi (690 bar) aufgeschlossen. Der resultierende Überstand einer 20-minütigen Zentrifugation bei $12.000 \times g$ wird anschließend in der Ultrazentrifuge eine Stunde bei $215.000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet der Ultrazentrifugation (SMPs) wird mit einem Dounce-Homogenisator in 50mM Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert. In dieser Präparation befindet sich die enzymatische Aktivität der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase (Zhang et al., 1995). Die ADP-Ribosylierung (6.3.1) findet in diesen Partikeln vergleichbar mit der in isolierten Mitochondrien statt (Jorcke et al., 1998).

6.1.3 Gewinnung von Mikrosomen

Für einige Experimente wurde der postmitochondriale Überstand (6.1.1, Arbeitsschritt 3) eine Stunde bei $180.000 \times g$ zentrifugiert und das Mikrosomen enthaltende Pellet in Homogenisationspuffer (6.1.1) resuspendiert. Diese mikrosomale Fraktion sowie das Gewebehomogenat (6.1.1, Arbeitsschritt 1) wurden ebenfalls bezüglich der in isolierten Mitochondrien beobachteten ADP-Ribosylierung (6.3.1) getestet. Die radioaktive Markierung der beiden Proteinbanden, wie sie in Mitochondrien detektiert wird (Abb. 5), war, bezogen auf die Proteinmenge (in mg), in Mitochondrien ca. vierfach höher als im Homogenat und ca. zehnfach höher als in Mikrosomen (nicht gezeigt). Die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase konnte in Übereinstimmung damit bei der Präparation der Mitochondrien siebenfach gegenüber dem Homogenat angereichert werden (nicht gezeigt).

6.1.4 Bestimmung von Markerenzym-Aktivitäten membranärer Zellbestandteile

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades einer Präparation von Zellfraktionen werden organellen-spezifische Enzymaktivitäten bestimmt. Gleichzeitig ist es erforderlich, Markerproteine anderer Zellkompartimente zu detektieren, um Verunreinigungen der Präparation abzuschätzen. Die im folgenden aufgeführten Nachweise spezifischer Enzymaktivitäten wurden routinemäßig bei jeder Mitochondrienpräparation angewendet.

6.1.4.1 Succinat-Dehydrogenase

Die Succinat-Dehydrogenase ist ein integrales Protein der inneren Mitochondrienmembran und dient daher als spezifisches Markerenzym dieser Organellen. Sie enthält ein kovalent gebundenes Molekül Flavinadenindinukleotid, das bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat reduziert wird. In der Nachweisreaktion der enzymatischen Aktivität der Succinat-Dehydrogenase wird hingegen ein künstlicher Elektronenakzeptor [2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium (INT), Sigma] angeboten, der nach Reduktion eine rote Farbe besitzt.

Es werden 100 μ l (0,2 - 0,5mg Protein) der zu untersuchenden Fraktion mit 900 μ l Substratlösung für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch TCA-Fällung (10% (w/v), 1ml) gestoppt. Anschließend wird der gebildete Farbstoff mit 4ml Essigsäureethylester (unter dem Abzug) extrahiert und eine Phasentrennung mittels Zentrifugation erreicht. Ein Milliliter des Überstandes wird in die photometrische Bestimmung der Extinktion bei $\lambda=490\text{nm}$ eingesetzt. Der millimolare Extinktionskoeffizient des reduzierten Produkts in Essigsäureethylester beträgt $\epsilon=20,1 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mmol}$.

Substratlösung:	55mM Kaliumphosphat, pH 7,0
	25mM Saccharose
	55mM Natriumsuccinat
	0,11 % (w/v) INT

6.1.4.2 Glucose-6-phosphatase

Die Glucose-6-phosphatase wird in der Leber von Wirbeltieren charakteristischerweise im endoplasmatischen Retikulum gefunden. Sie katalysiert die irreversible Dephosphorylierung von Glucose-6-phosphat zu freier Glucose, die von der Leber ins Blut abgegeben wird. Der Nachweis der Enzymaktivität wird über die Detektion des freigesetzten Phosphates ermöglicht.

Die Inkubation von 0,2-0,5mg Protein in 100µl erfolgt für 15-30 Minuten bei 37°C mit 900µl Substratlösung. Die Reaktion wird durch TCA-Fällung (Zugabe von 1ml 10%iger (w/v) TCA) gestoppt. Präzipitiertes Protein wird anschließend abzentrifugiert und ein Milliliter des Überstandes in die nachfolgende Phosphatbestimmung eingesetzt. Anorganisches Phosphat reagiert in stark saurer Lösung mit Ammoniummolybdat unter Reduktion zu einem blauen Farbkomplex, dessen Extinktion bei $\lambda=660\text{nm}$ bestimmt wird.

Dem Überstand der Umsatzreaktion werden 500µl Molybdatlösung, 200µl Reduktionsmittel und 3,3ml Wasser zugegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation kann die Extinktion gegen einen Reagenzienleerwert gemessen werden. Zur Bestimmung der Phosphatkonzentration wird eine Standardreihe über den Bereich 0,2-1,5µmol Phosphat erstellt.

Substratlösung:	55mM Tris/HCl, pH 6,6 11mM Glucose-6-Phosphat 11mM β -Mercaptoethanol
Molybdatlösung:	2,5% (w/v) Ammoniummolybdat 5N Schwefelsäure
Reduktionsmittel:	nach Fiske und Subbarow (Sigma)

6.1.4.3 ATPasen

Verschiedene Zellkompartimente enthalten spezifische ATPasen, die selektiv inhibiert werden können. Das Verhältnis der hemmbaren Anteile in unterschiedlichen präparierten Organellen (Mikrosomen, Plasmamembran, Mitochondrien) läßt auf den Grad der Verunreinigung schließen. Die ATPase-Aktivitäten der gewonnenen Fraktionen können auf zwei Wegen ermittelt werden (s.u.). Dabei wird jede Probe ohne ATPase-Hemmstoff sowie in Gegenwart von 1µg/ml der spezifischen Inhibitoren (Sigma, siehe Tabelle) untersucht.

Organelle	spezif. ATPase	selektiver Inhibitor
Plasmamembran	Na^+/K^+ -ATPase	Ouabain (Strophantin)
Mikrosomen	Ca^{2+} -ATPase	Thapsigargin
Mitochondrien	F_0F_1 -ATPase	Oligomycin

a) Phosphatbestimmung:

Eine 15-minütige Inkubation der Organelle (50-100µg Protein) bei 37°C in einem Milliliter Substratlösung wird mit 10%iger (w/v) TCA (1ml) gestoppt und Protein abzentrifugiert. In der Substratlösung ist ein ATP-regenerierendes System (s.u.) enthalten, damit der ATP-Verbrauch nicht limitierend ist. Ein Milliliter des Überstandes wird in die colorimetrische Bestimmung des freigesetzten Phosphats eingesetzt (siehe 6.1.4.2).

b) Optischer gekoppelter Test:

In dieser Methode wird die Aktivität der ATPase (Umsatzreaktion) über die Abnahme der NADH-Absorption bei $\lambda=340\text{nm}$ (Nachweisreaktion) kontinuierlich im Photometer verfolgt: In einer zweiten Reaktion katalysiert die Pyruvat-Kinase (PK) die Synthese von ATP aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und dem in der Umsatzreaktion gebildeten ADP (Regenerierung des ATP). Das gleichzeitig entstehende Pyruvat wird durch die Laktat-Dehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert bei paralleler Oxidation von NADH zu NAD^+ . Die Abnahme der NADH-Konzentration pro Zeit ist damit über die beschriebene Reaktionsfolge der ATPase-Aktivität direkt proportional, die aus der Steigung der resultierenden Geraden berechnet werden kann. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgt, bis auf die Anwesenheit von NADH*, wie unter a) beschrieben bei Raumtemperatur. Die Zugabe der selektiven Inhibitoren findet im Verlauf der Messung statt.

Substratlösung: 100µl ATPase-stock
100µl Salt-stock
3µl PK/LDH (Sigma)
A. dest. ad 1ml

ATPase-stock:	0,5M Tris/HCl, pH 7,5	Salt-stock:	50mM MgCl_2
	50mM PEP		500mM KCl
	10mM ATP		100mM NaCl
	2mM NADH*		10mM CaCl_2

* nur für den optischen Test erforderlich

6.2 Isolierung der NAD^+ -Glycohydrolase**6.2.1 Detergenzsolubilisierung**

Die Reinigung der mitochondrialen NADase nach Solubilisierung mit Detergenzien ist unlängst beschrieben worden (Zhang et al., 1995). Um ein nahezu homogenes Protein zu erhalten, mußte in der Aufarbeitung ein Denaturierungsschritt eingeführt werden (Zhang et al., 1995). Da die enzymatischen Eigenschaften durch diese Behandlung möglicherweise wesentlich beeinträchtigt werden, erschien es für eine kinetische Charakterisierung sinnvoll, eine partiell gereinigte Form des Enzyms zu verwenden (Ziegler et al., 1996). Insbesondere in Hinblick auf den Vergleich mit einer steapsinsolubilisierten, wasserlöslichen Form der NADase wurde auf eine analoge Reinigungsprozedur Wert gelegt (Ziegler et al., 1996).

Isolierte Mitochondrien (6.1.1) werden im Anschluß an den letzten Zentrifugationsschritt in Solubilisierungspuffer aufgenommen und mit einem Dounce-Homogenisator resuspendiert. Nach zwei Stunden Inkubation unter Rühren auf Eis werden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei $215.000 \times g$ für 45 Minuten abgetrennt. Der Überstand, der die detergenten-solubilisierete NADase-Aktivität enthält, wird nachfolgend durch Säulenchromatographie aufgearbeitet.

Solubilisierungspuffer: 50mM Tris/HCl, pH 7,5
 100mM NaCl
 6% (w/v) Triton X-100

6.2.2 Chromatographische Verfahren

Aufgrund der maximalen Effizienz (im Vergleich zu anderen getesteten Detergenzien) wurde für die Solubilisierung der NADase Triton X-100 bevorzugt. Während der chromatographischen Schritte diente Lauryldimethylamin-*N*-oxid (LDAO) als Detergenz. LDAO hat den Vorteil einer geringen Absorption bei $\lambda=280\text{nm}$ und ermöglicht daher die photometrische Überwachung der Aufarbeitung. 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium] propansulfonat (CHAPS) wurde im letzten Schritt der Aufarbeitung als Detergenz eingesetzt (s.u.), da es die Elution der NADase deutlich vereinfachte und die alternative Verwendung hoher Salzkonzentrationen die mitochondriale NAD^+ -Glycohydrolase signifikant inhibierte (Ziegler et al., 1996).

Die durch Detergenz solubilisierete mitochondriale NADase wird zunächst auf einer Hydroxylapatit (HTP)-Säule (Hydroxylapatit Bio-Gel, Bio-Rad) chromatographiert, die mit HTP(A)-Puffer äquilibriert wurde. Der Hauptanteil der NADase-Aktivität bindet an die stationäre Phase. Nach dem Probenauftrag wird die Matrix mit dem zehnfachen Säulenvolumen des gleichen Puffers, jedoch mit 0,05% (w/v) LDAO anstelle von Triton X-100, gewaschen, um den Austausch der Detergenzien zu erreichen. Die Elution erfolgt durch Anlegen eines linearen Phosphatpuffer-Gradienten von HTP(B1)- nach HTP(B2)-Puffer. Fraktionen, die eine NADase-Aktivität beinhalten (60-150mM Kaliumphosphat), werden vereinigt und gegen DEAE-Puffer dialysiert.

Die Proteinlösung wird anschließend auf eine Diethylaminoethyl (DEAE)-52-Cellulose (Whatman)-Säule aufgetragen, die mit DEAE-Puffer äquilibriert war. Die enzymatische Aktivität bindet nicht an diese Matrix und wird im Durchlauf der Säule detektiert, der nachfolgend mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt wird.

Der enzymatisch aktive Pool wird dann direkt auf einer Carboxymethyl (CM)-Trisacryl (Serva)-Säule chromatographiert, die zuvor mit CM(A)-Puffer äquilibriert wurde. Nach dem Probenauftrag wird die Matrix mit dem fünffachen Säulenvolumen CM(A)-Puffer gewaschen, wonach sich die Elution durch Anlegen eines linearen Gradienten von diesem Puffer nach CM(B)-Puffer anschließt.

Die Fraktionen mit NADase-Aktivität (120-150mM Kaliumphosphat) werden vereinigt und gegen AFB(A)-Puffer dialysiert, gefolgt von einer Chromatographie mit Blue Sepharose-Matrix (Affi-Blue, AFB). Die Säule wird in demselben Puffer äquilibriert sowie nach dem Auftrag der Proteinlösung mit fünf Säulenvolumina gewaschen. Ein linearer Gradient, ausgehend von diesem Puffer bis zu AFB(B)-Puffer, dient der Elution der enzymatischen NAD^+ -Glycohydrolase-Aktivität (30-50% AFB(B)-Puffer).

Verglichen mit gewaschenen Mitochondrien konnte die NADase ca. 280-fach angereichert werden. Die hier beschriebene partiell gereinigte Fraktion der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase enthält keine weiteren NAD⁺-katabolisierenden Enzymaktivitäten, wie durch die Produktanalyse mittels Dünnschichtchromatographie dargelegt wurde (Ziegler et al., 1996). Konsequenterweise konnte diese Präparation für die kinetische Charakterisierung (Ziegler et al., 1996) sowie für die weiterführenden Arbeiten (Kapitel 3) eingesetzt werden.

Die Affinitätsmatrix Blue Sepharose (Affi-Blue) wird durch die Kopplung des Farbstoffs Cibacron Blue F₃GA (Serva) an Sepharose CL4-B oder CL6-B (Pharmacia Biotech) eigens hergestellt. Dazu wird eine wässrige Lösung (1g/60ml) von Cibacron Blue F₃GA tropfenweise unter Rühren zu einer Suspension von 175ml Sepharose (in 175ml Wasser) bei 60°C gegeben und 30 Minuten gerührt. Im Anschluß an die Zugabe von 22,5g Natriumchlorid wird eine Stunde inkubiert, die Suspension auf 80°C erwärmt und mit 2g Natriumcarbonat versetzt. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation bei 80°C unter Rühren läßt man die Matrix auf Raumtemperatur abkühlen und saugt die Flüssigkeit mit einem Büchnertrichter ab. Die Blue Sepharose wird nachfolgend solange mit Wasser gewaschen bis das Eluat farblos erscheint. Das abgesaugte Material wird dann in AFB(A)-Puffer inklusive 1mM Natriumazid aufgenommen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

HTP(A)-Puffer:	50mM Tris/HCl, pH 7,5 100mM NaCl 0,5% (w/v) Triton X-100 bzw. 0,05% (w/v) LDAO	HTP(B1/2)-Puffer:	50mM bzw. 500mM Kaliumphosphat, pH 7,0 0,05% (w/v) LDAO
DEAE-Puffer:	20mM Tris/HCl, pH 8,5 0,05% (w/v) LDAO		
CM(A)-Puffer:	20mM Natriumacetat, pH 5,0 0,05% (w/v) LDAO	CM(B)-Puffer:	250mM Kaliumphosphat, pH 7,0 0,05% (w/v) LDAO
AFB(A)-Puffer:	50mM Tris/HCl, pH 7,5 100mM NaCl 0,05% (w/v) LDAO	AFB(B)-Puffer:	50mM Tris/HCl, pH 7,5 200mM NaCl 0,5% (w/v) CHAPS

6.2.3 Fluoreszenzphotometrischer Nachweis enzymatischer Aktivitäten der NADase

Aufgrund der einfachen Handhabung ist diese Methode sowohl für die Verlaufskontrolle der Aufarbeitung als auch für eine Erfassung kinetischer Daten der NAD⁺-Glycohydrolase geeignet. Die Durchführung der Messungen erfolgte in einem Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer: Luminescence Spectrometer LS 50B) in LS50-Puffer; die Aufnahme der Daten startete gleichzeitig mit der Zugabe einer geeigneten Menge des Enzyms.

LS50-Puffer:	50mM Tris/HCl, pH 7,5 0,03% (w/v) LDAO
--------------	---

I **Verwendung von 1,N⁶-Etheno-NAD⁺ (ϵ -NAD⁺)**

1,N⁶-Etheno-NAD⁺ (ϵ -NAD⁺) wurde entweder von Sigma bezogen oder in Anlehnung an die Methode von Barrio et al. (1972) selbst synthetisiert: In der Umsatzreaktion wird eine 50mM NAD⁺-Lösung in 0,4M Ammoniumformiat (pH 5,0) mit einem 30-fachen Überschuß an frisch destilliertem Chloracetaldehyd für 48 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit verdünntem Ammoniak auf pH 6,8 titriert und bei -20°C mit konzentriertem Ethanol gefällt. Nach einer Zentrifugation wird der erhaltene Niederschlag mit eiskaltem Ethanol zweimal gewaschen und in destilliertem Wasser resuspendiert. Die Ethanolfällung und die Wasch-Schritte werden fünfmal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wird eine konzentrierte Lösung in destilliertem Wasser hergestellt. In allen Schritten der ϵ -NAD⁺-Synthese wird β -Mercaptoethanol in einer Konzentration von 50mM zugegeben. Die Konzentration des selbst hergestellten ϵ -NAD⁺ wurde durch Reduktion mittels der Alkoholdehydrogenase-Reaktion bestimmt; dabei wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $6,2 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ für ϵ -NADH (entsprechend NADH) bei einer Wellenlänge von $\lambda=340\text{nm}$ vorausgesetzt.

Das Nachweisverfahren unter Verwendung des Substratanalogons ϵ -NAD⁺ beruht auf einer Zunahme der Fluoreszenz, die nach der Trennung des Fluorophors (Etheno-Adenin) vom quenchenden Nikotinamidring beobachtet wird (Barrio et al., 1972). Die Methode ist per se nicht spezifisch für NADasen. Weitere NAD⁺-katabolisierende Enzyme, wie z. B. Phosphodiesterasen, die ϵ -NAD⁺ als Substrat akzeptieren, führen ebenfalls zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Deshalb ist es von großer Bedeutung, eine Produktanalyse der enzymkatalysierten Reaktion durchzuführen, um die tatsächliche enzymatische Aktivität zu bestimmen und die Anwesenheit unerwünschter Fremdaktivitäten nachzuweisen bzw. auszuschließen (6.2.5). Der Test wurde bei Raumtemperatur in einem Volumen von 700 μ l LS50-Puffer mit 10 μ M ϵ -NAD⁺ in einer Halbmikro-Kunststoffküvette ausgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda=310\text{nm}$; die Emission der Fluoreszenz wurde bei $\lambda=410\text{nm}$ verfolgt. Die Anfangssteigung der resultierenden Geraden - Fluoreszenzzunahme versus Zeit - der enzymkatalysierten Reaktion ist der Umsatzrate des Enzyms proportional und dient als ein Maß für dessen Aktivität. Für die Ermittlung des Einflusses reduzierender Agenzien auf die Aktivität der mitochondrialen NADase (Abb. 6B) wurde das partiell gereinigte Enzym (Ziegler et al., 1996) mit 10mM Dithiothreitol (DTT) behandelt. Die Zugabe von DTT erfolgte entweder in den Reaktionsansatz der laufenden Messung oder in einer 15-minütigen Vorinkubation des Enzyms.

II **Verwendung von Nikotinamidguanidinukleotid (NGD⁺) und Nikotinamidhypoxanthinukleotid (NHD⁺)**

Die NAD⁺-Analoge NHD⁺ und NGD⁺ wurden von Sigma bezogen. Sie dienen dem Nachweis von ADP-ribosyl Cyclase-Aktivitäten, wobei die Fähigkeit dieser Enzyme ausgenutzt wird, die Entstehung fluoreszenter cyclischer Purindinukleotiddiphosphoribosen zu katalysieren (Graeff et al., 1994). Weder die Substrate noch die Hydrolyseprodukte (GDP-Ribose bzw. IDP-Ribose) weisen eine Fluoreszenz auf, so daß die Entstehung der cADP-Ribose-Analoga kontinuierlich ohne Trennverfahren erfolgen kann. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist die hohe Ausbeute an fluoreszenten Produkten, die eine erhöhte Hydrolysebeständigkeit im Vergleich zu cADP-Ribose aufweisen. Die Bildung fluoreszenter cGDP-Ribose oder cIDP-Ribose wurde im Fluoreszenzphotometer unter Verwendung von 1mM NHD⁺ bzw. NGD⁺ als Substrat verfolgt. Die Durchführung fand in einem Volumen von 400 μ l LS50-Puffer bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette statt. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda=300\text{nm}$; die Emission der Fluoreszenz wurde bei $\lambda=410\text{nm}$ detektiert.

6.2.4 Identifizierung der NADase in der SDS-PAGE durch Fluoreszenzfärbung

Die zu untersuchende Proteinlösung wird zunächst in einer SDS-PAGE nach Laemmli (1970) mit der angegebenen Acrylamidkonzentration getrennt. Für den späteren Nachweis der enzymatischen Aktivitäten ist es unerlässlich, daß der Probenpuffer keine reduzierenden Agenzien (z. B. β -Mercaptoethanol) enthält und die Proben nicht gekocht werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Polyacrylamidgel in einen Renaturierungspuffer überführt und für 30-60 Minuten unter Schütteln behandelt; dabei wird der Puffer mehrfach ausgewechselt. Die Anwesenheit hoher Detergenzkonzentrationen ist für den Renaturierungsprozeß erforderlich und erleichtert vermutlich die Entfernung des denaturierenden Dodecylsulfates.

Für die parallele Detektion der NADase-Aktivität (mit ϵ -NAD⁺) und der Cyclase-Aktivität (mit NHD⁺) wurden identische Proben in benachbarten Spuren durch SDS-PAGE getrennt. Die als Kontrolle dienende ADP-ribosyl Cyclase aus *Aplysia californica* wurde von Sigma bezogen. Nach der Renaturierung wird das Gel in zwei Hälften geteilt, in denen identische Proben separiert wurden. Die beiden übereinstimmenden Gelhälften werden im Anschluß wie folgt behandelt.

Renaturierungspuffer: 50mM Tris/HCl, pH 7,5
 0,5% (w/v) LDAO

I *Verwendung von 1,N⁶-Etheno-NAD⁺ (ϵ -NAD⁺)*

Nach der Renaturierung wird das Gel (respektive die Gelhälfte (s.o.)) mit 150 μ M ϵ -NAD⁺ in LS50-Puffer (6.2.3) für 5-30 Minuten inkubiert bis die gewünschte Fluoreszenzfärbung visualisiert werden kann. Dazu wird das Gel auf einen UV-Transilluminator plaziert, dessen anregendes Licht die enzymatisch aktive NADase als fluoreszierende Bande detektieren läßt. Dieses Nachweisverfahren ist auch auf andere NAD⁺-katabolisierende Enzymaktivitäten anwendbar (Hagen und Ziegler, 1997).

Eine Abschätzung der Molekulargewichte der Proteine kann nach einer Markierung der Banden und anschließender Coomassie-Färbung des Gels durch Vergleich mit Markerproteinen erreicht werden. In einigen Fällen wurden die fluoreszenten Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und bei 4°C bis zur Produktanalyse (6.2.5) aufbewahrt.

II *Verwendung von Nikotinamidhypoxanthindinukleotid (NHD⁺)*

Der Nachweis der IDP-ribosyl Cyclase-Aktivität in der Gelmatrix erfolgt wie unter 6.2.4.1 beschrieben, jedoch mit 3mM NHD⁺ als Substrat anstelle von ϵ -NAD⁺ in LS50-Puffer (6.2.3). 1,N⁶-Etheno-ADP-Ribose (ϵ -ADP-Ribose) besitzt eine wesentlich stärkere Fluoreszenz als cyclische IDP-Ribose, so daß die Reaktionszeit mit NHD⁺ bisweilen verlängert werden muß. Aus dem gleichen Anlaß ist der fluoreszierende Hintergrund bei der Inkubation mit NHD⁺ stärker (siehe Abb. 15). Die weitere Verfahrensweise verläuft wie bei der Verwendung von ϵ -NAD⁺ angegeben.

6.2.5 Identifizierung der Reaktionsprodukte der isolierten NADase

6.2.5.1 Dünnschichtchromatographie

Für den Nachweis der Reaktionsprodukte der mitochondrialen NADase wurden zwei verschiedene Chromatographiesysteme verwendet. Da die fluorometrischen Verfahren unter Verwendung von ϵ -NAD⁺ keine ausreichende Spezifität für NADasen aufweisen, ist es von großer Bedeutung, die tatsächliche Enzymaktivität durch die Produktanalyse zu verifizieren. Die Identifizierung von Standardkomponenten erfolgt durch ihre Fluoreszenzlöschung, wohingegen radioaktive Produkte der Reaktion mittels Autoradiographie der Platten nachgewiesen werden. [³²P]-NAD⁺ wurde von ICN erhalten und [¹⁴C]-NAD⁺ von Amersham bezogen. Die Ethenoderivate der Nukleotide sowie cGDP-Ribose zeigen eine blaue Fluoreszenz unter Anregung mit UV-Licht.

System 1:

Die mobile Phase besteht aus : Isobuttersäure / Wasser / 25% Ammoniak (96/19/4, v/v/v). Eine Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte auf Cellulose-Platten mit Fluoreszenzindikator (Polygram[®]CEL 400 UV₂₅₄, Macherey-Nagel) durch aufsteigende Chromatographie (Lötscher et al., 1980).

Partiell gereinigte mitochondriale NADase (10 μ g) wurde entweder mit 50 μ M ϵ -NAD⁺, 25 μ M [Nikotinamid-¹⁴C]-NAD⁺ (0,1 μ Ci) oder 1mM NGD⁺ in LS50-Puffer (6.2.3) für 15 Minuten bei 37°C in einem Endvolumen von 50 μ l inkubiert. Alternativ können auch die nach Aktivitätsfärbung aus dem Gel ausgeschnittenen Banden (6.2.4) eingesetzt werden, die nach beendeter Inkubation aus dem Ansatz entfernt werden. Die Reaktion wird durch Acetonpräzipitation (Zugabe von 450 μ l eiskaltem Aceton) gestoppt. Aus dem getrockneten Pellet werden die präzipitierten Reaktionsprodukte mit 10 μ l Wasser wieder in Lösung gebracht und ungelöstes Protein sedimentiert. Aliquots der Überstände werden dann auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und getrennt.

Substanz	NAD ⁺	(c)ADPR	AMP	NMN	Nam	ϵ NAD ⁺	ϵ (c)ADPR	ϵ AMP	NGD ⁺	cGDPR	GDPR
R _f - Wert	0,33	0,17	0,49	0,45	0,85	0,32	0,18	0,43	0,097	0,061	0,031

System 2:

Die Nukleotide wurden auf Polyethylenimin (PEI)-Celluloseplatten mit Fluoreszenzindikator (Schleicher und Schuell) mit einer mobilen Phase, bestehend aus 1M Essigsäure und 0,3M LiCl, separiert.

Partiell gereinigt mitochondriale NADase (10 μ g) wurde mit 25 μ M [³²P]-NAD⁺ (1nCi/nmol) in LS50-Puffer (6.2.3) für 5 Minuten bei 30°C in einem Endvolumen von 50 μ l inkubiert. Die Zugabe weiterer Komponenten ist der Legende von Abbildung 14 zu entnehmen. Die Reaktion wurde durch Acetonpräzipitation (s.o.) gestoppt und die Ansätze getrocknet. Die präzipitierten Nukleotide lassen sich durch die Zugabe von 25 μ l Wasser wieder in Lösung bringen; ungelöstes Protein wird sedimentiert. Da die Trennung freier ADP-Ribose von cyclischer ADP-Ribose in beiden verwendeten Systemen nicht ausreichend ist, wurde der Dünnschichtchromatographie ein zusätzlicher enzymatischer Schritt vorangestellt. Die Phosphodiesterase I (PDE) aus Schlangengift (*Crotalus adamanteus*, Sigma) bildet [³²P]-AMP aus NAD⁺ und ADP-Ribose (sowie NMN bzw. Ribose-5'-phosphat), während cADP-Ribose diesem Enzym nicht als Substrat dient. Infolgedessen wurden die Überstände in einer 20-minütigen Inkubation bei 30°C mit 1mU PDE behandelt und anschließend unmittelbar auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

6.2.5.2 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Trennung von ADP-Ribose, cADP-Ribose, AMP, Nikotinamid und NAD^+ wurde unter Verwendung des BioLogic Systems (FPLC) der Firma Bio-Rad mit einer C_{18} - "reverse-phase"-Säule ($4,6\text{mm} \times 250\text{mm}$) als stationäre Phase (Nucleosil 100, Muder & Wochele) mit einer Flußrate von $0,5\text{ml}/\text{min}$ durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus 50mM NaCl und 3mM Trifluoressigsäure (Puffer A). Puffer B wurde zusätzlich mit 5% (v/v) Acetonitril versehen. Das Auftragen des zu trennenden Materials erfolgte über eine $25\mu\text{l}$ Probenschleife. Die Elution wurde wie folgt bewirkt: Einer 15-minütigen isokratischen Elution mit Puffer A schloß sich ein linearer Gradient von 100% (v/v) Puffer A bis 100% (v/v) Puffer B innerhalb von sechs Minuten an. Um die Elution zu vervollständigen, wurde die Säule anschließend für zehn Minuten mit 100% (v/v) Puffer B gewaschen. Vor jedem neuen Probenauftrag wurde die Matrix zunächst mit Puffer A für zehn Minuten äquilibriert.

Die Durchführung der Experimente erfolgte in LS50-Puffer (6.2.3) bei 30°C mit $5\mu\text{g}$ der partiell gereinigten mitochondrialen NAD^+ -Glycohydrolase. Im Anschluß an die Inkubation mit den angegebenen Zeiten wurden die Ansätze mittels eines Mikrokonzentrators (Mikron-10, Amicon) filtriert und das Filtrat mit einer Hamilton-Spritze in die Probenschleife injiziert.

1. NAD^+ als Substrat:

$0,1\text{-}1\text{mM}$ NAD^+ (Retentionszeit: $26,3\text{ min}$) wurden mit der NADase für $10\text{-}60$ Minuten inkubiert und die Reaktionsprodukte über HPLC getrennt (s.o.). Frisch angesetzte NAD^+ -Lösungen waren innerhalb der gewählten Inkubationsperioden in Abwesenheit des Enzyms stabil. Unter Katalyse der mitochondrialen NADase wurde in allen Experimenten die Bildung der beiden Hauptprodukte ADP-Ribose (Retentionszeit: $12,4\text{ min}$) sowie Nikotinamid (Retentionszeit: $15,4\text{ min}$) beobachtet. Die Synthese von cADP-Ribose (Retentionszeit: $14,2\text{ min}$) konnte unter den gewählten Bedingungen nur sehr schwer detektiert werden, da lediglich weniger als 2% dieses Nukleotids gebildet wurden. In einigen Fällen wurde die Entstehung geringer Mengen von AMP (Retentionszeit: $19,5\text{ min}$) beobachtet. Bei der Inkubation von ADP-Ribose (Sigma) in Abwesenheit von Enzym entstand allerdings auch AMP (und vermutlich Ribosephosphat, das aufgrund der fehlenden Absorption bei $\lambda=254\text{nm}$ nicht detektiert wird), was die Anwesenheit einer Fremdaktivität (e.g. PDE) ausschließt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind nicht dargestellt.

2. cADP-Ribose als Substrat:

Für den Nachweis der cADP-Ribose Hydrolase-Aktivität der mitochondrialen NADase wurde das partiell gereinigte Enzym in Gegenwart von $100\mu\text{M}$ cADP-Ribose 30 Minuten lang inkubiert und wie oben beschrieben bearbeitet. Als Kontrolle wurde ein Parallelansatz mit $100\mu\text{M}$ cADP-Ribose ohne Zugabe des Enzyms gewählt.

3. cADP-Ribose und Nikotinamid als Substrate:

Die NAD^+ -Synthese durch die NADase wurde in Anwesenheit von $100\mu\text{M}$ cADP-Ribose und $0,1\text{-}1\text{mM}$ Nikotinamid in einem Zeitraum von $30\text{-}60$ Minuten überprüft. Bei geringeren Konzentrationen von Nikotinamid ($0,1\text{-}0,5\text{mM}$) scheint die cADP-Ribose Hydrolase-Aktivität der NADase zu überwiegen, so daß in der HPLC die Entstehung freier ADP-Ribose detektiert wird (nicht gezeigt). In Gegenwart von 1mM Nikotinamid wird cADP-Ribose jedoch kaum hydrolysiert, sondern fast vollständig zu NAD^+ umgesetzt.

6.3 ADP-Ribosylierung

6.3.1 Mitochondriale ADP-Ribosylierung

Für die ADP-Ribosylierungsexperimente verwendete Mitochondrien wurden im Anschluß an die Isolierung (6.1.1) zweimal mit Ribosylierungspuffer gewaschen und nachfolgend in demselben Puffer resuspendiert und tiefgefroren (-70°C). Die ADP-Ribosylierung von Mitochondrien ($200\mu\text{g}$) wird in $50\mu\text{l}$ Ribosylierungspuffer in Anwesenheit von $25\mu\text{M}$ [^{32}P]- NAD^+ ($1\mu\text{Ci/nmol}$) bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Einige der Experimente (Abb. 7) fanden anstelle von [^{32}P]- NAD^+ mit [Adenin- ^{14}C]- NAD^+ bzw. [Nikotinamid- ^{14}C]- NAD^+ (10nCi/nmol) statt. Die Reaktionszeit betrug gewöhnlich 15 Minuten. Die durch die Zugabe von gewaschenen Mitochondrien gestartete Reaktion wird nach beendeter Inkubation mit $450\mu\text{l}$ eiskaltem Aceton gestoppt. Nach einer zehn-minütigen Aufbewahrung der Ansätze auf Eis erfolgt die Präzipitation der Proteine durch Zentrifugation. Der Überstand wird verworfen und das Pellet getrocknet. Anschließend werden die präzipitierten Proteine in SDS-Probenpuffer resuspendiert und durch Gelelektrophorese separiert. Die Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (10% (w/v), Endkonzentration) führt aufgrund der Säurelabilität einiger mitochondrialer ADP-Ribose-Protein-Bindungen (3.1.3) zu einer Abnahme der proteinasoziierten Radioaktivität. Gleichmaßen wird eine schlechtere Auflösung der Proteine in der SDS-PAGE beobachtet. Nach der Elektrophorese werden die Polyacrylamidgele mit Coomassie Blau gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

Die nicht-enzymatische ADP-Ribosylierung mit [^{32}P]-ADP-Ribose als Substrat wird unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. In einigen Experimenten wurde jedoch die Inkubationszeit (bis zu 60 Minuten) und die Konzentration der eingesetzten [^{32}P]-ADP-Ribose (bis zu 1mM) variiert, um einen Einbau von Radioaktivität detektieren zu können (Jorcke et al., 1998). [^{32}P]-ADP-Ribose ist nicht kommerziell erhältlich und wird deshalb aus [^{32}P]- NAD^+ durch die Katalyse der NAD^+ -Glycohydrolase aus *Neurospora crassa* (Sigma) hergestellt. Üblicherweise wurden Lösungen von $1\text{--}10\text{mM}$ [^{32}P]- NAD^+ ($1\mu\text{Ci/nmol}$) in Ribosylierungspuffer unter leichtem Schütteln mit der *Neurospora* NADase bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die enzymatische Aktivität dieses Enzyms wurde zuvor mittels des Fluoreszenztestes im Photometer mit $10\mu\text{M}$ $\epsilon\text{-NAD}^+$ (6.2.3, I) ermittelt und bezüglich der umzusetzenden NAD^+ -Stammlösung extrapoliert. Die Vollständigkeit der NADase-katalysierten Reaktion wird über eine Produktanalyse mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Nach Beendigung der Reaktion wird das Enzym durch Erhitzen der Lösung auf 95°C für fünf Minuten inaktiviert.

Aufgrund der Ergebnisse in bezug auf die Inaktivierung der nativen (detergenzsolubilisierten) mitochondrialen NADase durch DTT und EDTA wurde der Ribosylierungspuffer durch Hinzufügung dieser Komponenten erweitert (siehe Legenden der Abbildungen).

Ribosylierungspuffer:	50mM Tris/HCl, pH 7,5 (10mM DTT) (1mM EDTA)
-----------------------	---

6.3.2 Chemische Stabilität der ADP-Ribose-Bindungen mitochondrialer Proteine

Isolierte und gewaschene Mitochondrien werden in Ribosylierungspuffer (inklusive DTT und EDTA) mit $25\mu\text{M}$ [^{32}P]-NAD⁺ zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Nach beendeter Reaktion werden nicht gebundene Nukleotide durch fünfmaliges Waschen entfernt. Zu diesem Zweck findet in jedem Durchgang die Zentrifugation der Organellen, gefolgt von einer Resuspendierung in Ribosylierungspuffer statt (nach dem vierten Wasch-Schritt konnte keine weitere Abnahme der proteinassoziierten Radioaktivität nachgewiesen werden).

Das Pellet mit radioaktiv markierten Mitochondrien wird nachfolgend in 50µl MK-Puffer aufgenommen und mit dem gleichen Volumen zweifach konzentrierter Chemikalienlösungen (1.-4.) versehen, um die angegebene Endkonzentration (s. u.) zu erreichen. Der Kontrollprobe werden 50µl Wasser zupipettiert. Für die Ermittlung der chemischen Stabilität der Protein-ADP-Ribose-Bindungen wurden folgende Chemikalien eingesetzt:

1. 44% (v/v) Ameisensäure
2. 1M NaOH
3. 1M Hydroxylamin (pH 7,0; mit KOH eingestellt)
4. 10mM HgCl₂

Nach der Inkubation für zwei Stunden bei 30°C werden die Proteine mit TCA (10 % (w/v), Endkonzentration) gefällt und die Radioaktivität der Pellets und der Überstände durch Cherenkov-Zählung (Beckmann LS 6000SC) bestimmt. Die präzipitierten Proteine werden anschließend mit 3%iger (w/v) Natriumhydroxidlösung resuspendiert und der Proteingehalt (6.4.1) ermittelt. Die gemessene Radioaktivität der Pellets wird auf die präzipitierte Proteinmenge bezogen und in Hinblick auf die freigesetzte Radioaktivität der Kontrolle korrigiert.

MK-Puffer: 50mM MOPS/KOH, pH 7,0

6.3.3 ADP-Ribosylierung der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) aus Hefe

Die Modifizierung der ALDH (20µg) aus Hefe (Boehringer-Mannheim) wurde unter den zuvor beschriebenen Bedingungen mit dem erweiterten Ribosylierungspuffer (6.3.1) durchgeführt. Für die nicht-enzymatische ADP-Ribosylierung werden, in Abwesenheit der mitochondrialen ADPRT-Aktivität, entweder $25\mu\text{M}$ [^{32}P]-ADP-Ribose oder $25\mu\text{M}$ [^{32}P]-NAD⁺ eingesetzt. Die Überprüfung der enzymatischen Modifizierung der ALDH erfolgt in Gegenwart von $25\mu\text{M}$ [^{32}P]-NAD⁺ und 10µg isolierten Mitochondrien, die in einer 15-minütigen Vorinkubation mit 10mM DTT behandelt werden. Die Reaktion wird durch Acetonpräzipitation gestoppt und die in Probenpuffer resuspendierten Proteine durch SDS-PAGE getrennt.

6.4.1.2 BCA-Methode

Die Proteinbestimmungsmethode BCA (Pierce) kombiniert die Reaktion von Proteinen mit Kupferionen in alkalischer Lösung mit einem hochsensitiven und selektiven Nachweis des Cu^+ -Ions. Dabei erfolgt zunächst eine Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen, die nach Reduktion zu einwertigem Kupfer mit zwei Molekülen Bicinchonsäure (bicinchonic acid, BCA) interagieren. Das resultierende violette Reaktionsprodukt ist wasserlöslich und kann bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ absorptionsphotometrisch gemessen werden. Die Empfindlichkeit der Methode hängt von den gewählten Inkubationsbedingungen ab (Herstellerangaben beachten). In einem Halbmikroansatz werden 50 μl Proteinlösung (5-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit einem Milliliter BCA-Reagenz gemischt und 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt sind, wird ihre Extinktion gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Die Methode eignet sich ebenfalls für Proteinpräzipitate, die nach einer Säurefällung erhalten werden, die direkt in dem stark alkalischen BCA-Reagenz resuspendiert werden können. Die Standardkurve wurde mittels BSA erstellt.

BCA-Reagenz :	Lösung A (BCA-Entwickler)
	Lösung B (4% Kupfersulfat)
	im Verhältnis 50 + 1 (v/v)

6.4.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Im Gelsystem von Laemmli (1970) wird die Tertiärstruktur der Proteine mit dem stark denaturierenden Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgebrochen. Die SDS-Anionen binden an die Polypeptidkette (ca. 1 Molekül SDS pro 2 Aminosäuren) und überlagern die Eigenladung der Proteine. Die Trennung erfolgt daher nach dem Molekulargewicht, da die Ladung des SDS/Protein-Komplexes der Masse der Proteine annähernd proportional ist. In der diskontinuierlichen Gelelektrophorese besteht das Polyacrylamidgel aus zwei Systemen. Durch eine Isotachophorese werden Proteine im Sammelgel konzentriert; im folgenden Trenngel wird die Separation nach dem Molekulargewicht erreicht. Die SDS-PAGE wurde in Minigelapparaturen (Hoefer Scientific) ausgeführt. Die Polyacrylamidkonzentrationen (w/v) betragen 5% für die Sammel- und 10-15% für die Trenngele. Die Proben der ADP-Ribosylierungsexperimente werden mit dem gleichen Volumen an $2\times$ SDS-Probenpuffer versehen und fünf Minuten im Wasserbad gekocht. Pellets der Aceton- bzw. TCA-Fällung werden in $1\times$ SDS-Probenpuffer resuspendiert und gekocht. Proteinlösungen, die für den Nachweis enzymatischer Aktivitäten in der Gelmatrix getrennt werden sollen, werden 30 Minuten bei Raumtemperatur mit SDS-Probenpuffer, der kein reduzierendes Agens enthält, unter Schütteln inkubiert. Diese Proben werden vor der Elektrophorese nicht aufgekocht. Als Molekulargewichtsmarker wurde der "Low Molecular-Weight" Marker der Firma Sigma benutzt. Er enthält folgendes Proteingemisch:

Rinder Serum Albumin	66kDa
Ovalbumin	45kDa
GAPDH	36kDa
Carboanhydrase	29kDa
Trypsinogen	24kDa
Trypsin Inhibitor	20kDa
α -Lactalbumin	14kDa

Die Zusammensetzung der Sammel- bzw. Trenngellösungen kann den folgenden Tabellen entnommen werden (Angaben in ml, ausreichend für vier Minigele).

1. Sammelgel (10ml)

% (w/v) Acrylamid	5
Acrylamid-Stammlsg.	1,7
Sammelgelpuffer	2,5
Wasser (dest.)	5,6
SDS (10 %)	0,1
TEMED	0,01
APS (10 %)	0,1

2. Trenngel (20ml)

% (w/v) Acrylamid	10	12	13	15
Acrylamid-Stammlsg.	6,7	8,0	8,7	10,0
Trenngelpuffer	5,0	5,0	5,0	5,0
Wasser (dest.)	7,9	6,6	5,9	4,6
SDS (10 %)	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,015	0,015	0,015	0,015
APS (10 %)	0,2	0,2	0,2	0,2

Acrylamidstammlösung : 30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) Bisacrylamid

Sammelgelpuffer : 0,5 M Tris/HCl, pH 6.8

Trenngelpuffer : 1,5 M Tris/HCl, pH 8.8

2× SDS-Probenpuffer: 62,5mM Tris/HCl, pH 6,8
3% (w/v) SDS
10% (w/v) Glycerin
0,025mg Bromphenolblau
10mM β -Mercaptoethanol*

Laufpuffer: 0,3% (w/v) Tris
1,44% (w/v) Glycin
0,1% (w/v) SDS

* nicht enthalten, wenn die Proben einer Aktivitätsfärbung (6.2.4) dienen

6.4.3 Coomassie-Färbung

Die Färbung von Polyacrylamidgelen zur Detektion von Proteinen ($\geq 1\mu\text{g}$) erfolgt unter leichtem Schütteln für 10-30 Minuten. Wird die Coomassie-Färbung im Anschluß an den Direktnachweis enzymatischer Aktivitäten ausgeführt, sollte das Gel zunächst mit der Entfärbelösung fixiert und mehrmals gewaschen werden, um das Detergenz zu entfernen.

Färbelösung : 0,16% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Um die Gele zu trocknen, werden sie nach der Färbung 30 Minuten mit Wasser gewaschen, anschließend auf ein feuchtes Filterpapier übertragen und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Die Gele werden dann im Vakuum des Geltrockners (Drystar, H. Hölzel GmbH) bei 70-80°C innerhalb von zwei Stunden getrocknet.

6.4.4 Silberfärbung

Dieses Nachweisverfahren ist bis zu 100-fach empfindlicher als die Coomassie-Färbung und kann Proteinmengen von nur 10ng detektieren. Die Silberfärbung wird wie folgt ausgeführt:

1. Fixierung der Proteine:
15 Minuten, 10% (w/v) Essigsäure, 40% (w/v) Methanol
15 Minuten, 5% (w/v) Essigsäure, 10% (w/v) Methanol
2. Oxidation der Proteine:
5 Minuten, 3,4mM Kaliumdichromat, 3,2mM Salpetersäure

Anschließend wird das Gel zweimal fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen.

3. Anlagerung von Silberionen:
30 Minuten, 12mM Silbernitratlösung

Nachfolgend wird das Gel zweimal eine Minute mit destilliertem Wasser gewaschen.

4. Reduktion der Silberionen:
2% (w/v) Natriumcarbonat, 0,05% (v/v) Formalin (37% (v/v))
5. Stopp:
1% (v/v) Essigsäure

Die Gele werden danach fotografiert (Dokumentationsanlage E.A.S.Y., Herolab) und/oder wie oben beschrieben getrocknet.

6.4.5 Autoradiographie

Die getrockneten Gele (bzw. die Platten der Dünnschichtchromatographie) werden nachfolgend in eine X-Omatic Kassette mit Verstärkerfolie (Kodak) deponiert. Das Auflegen des Films (Bio Max MR-1/X-OMAT AR, Kodak; Reflection NEF-496, Dupont) sowie dessen spätere Entwicklung erfolgen in der Dunkelkammer. Die Gelkassette wird bis zur Entwicklung der Autoradiographie bei -70°C gelagert.