

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In die Studie eingeschlossen wurden die Gewebeproben von 104 Patienten, die in den Jahren 1992 bis 2001 nach der Diagnose eines Prostatakarzinoms einer radikalen Prostatektomie unterzogen wurden. Für die Nutzung des entnommenen Gewebes zu Forschungszwecken lag das Einverständnis aller Patienten vor. Das Gewebe stammt aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin. Aus der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, die sich präoperativ einer neoadjuvanten antiandrogenen Hormontherapie unterzogen. Klinische Daten stammen von den nachbehandelnden Ärzten und wurden teils telefonisch, teils schriftlich eingeholt. Das Gesamtüberleben ergab sich anhand der Sterbedaten, die bei den jeweiligen Landeseinwohnermeldeämtern erfragt wurden.

Bei allen untersuchten Tumorproben handelte es sich um Adenokarzinome. Diese befanden sich überwiegend im organbegrenzten Stadium pT2 (62 Fälle, 59,6%), während 41 (39,4%) Tumoren im pT3- und ein Fall (1%) im pT4-Stadium diagnostiziert wurden. Tumoren im pT1-Stadium waren im vorliegenden Kollektiv nicht vorhanden. Bezüglich ihrer Dignität gliederten sich die Tumoren wie folgt auf: Gemäß der Einteilung der histologischen Differenzierung nach Gleason befanden sich 9 (8,7%) Tumoren im Stadium G1 (Gleason 2-4), 33 (31,7%) im Stadium G2 (Gleason 5-6) und 62 (59,6%) im Stadium G3 (Gleason 7-10). Die Untersuchung der Lymphknoten ergab bei 90 (86,6%) Patienten ein pN0- und bei 2 (1,9%) Patienten ein pN1-Stadium. Bei 12 (11,5%) Patienten wurden keine Lymphknoten reseziert bzw. untersucht (pNX). Das durchschnittliche Erkrankungsalter zum Zeitpunkt der Diagnose lag bei 63 Jahren (47-72 Jahre). Der präoperative PSA-Wert war bei 96 Patienten bekannt und schwankte zwischen 0,6 und 40,6 ng/ml mit einem Median von 8,6 ng/ml. Der postoperative PSA-Wert lag in allen Fällen unter 0,04 ng/ml. Insgesamt 35 (33,7%) Patienten bekamen ein PSA-Rezidiv nach einer durchschnittlichen Zeit von 34,5 Monaten (7-104 Monate) (Tabelle 1). Da in einem Fall zu wenig Gewebe zur Verfügung stand, wurden für die Bestimmung der COX-2-Expression Gewebeschnitte von 103 Patienten untersucht. Zusätzlich wurden in 86 Fällen eine Prostatistische Intraepitheliale Neoplasie (PIN), in 93 Fällen normales und in 86 Fällen atrophisches Prostatagewebe untersucht.

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs

Merkmal	Anzahl der Patienten	Prozentualer Anteil (%)
Tumorfälle insgesamt	104	100,0
Alter bei Diagnose		
>= 63 Jahre	60	57,7
< 63 Jahre	44	42,3
pT		
pT1	0	0
pT2	62	59,6
pT3	41	39,4
pT4	1	1,0
pN		
pN0	90	86,6
pN1	2	1,9
pNX	12	11,5
pM		
pM0	19	18,3
pM1	1	0,9
pMX	84	80,8
Differenzierungsgrad (TNM)		
G1 (Gleason 2-4)	9	8,7
G2 (Gleason 5-6)	33	31,7
G3 (Gleason 7-10)	62	59,6
Residualtumorstatus		
R0	60	57,7
R1	44	42,3
PSA -Rezidiv		
nein	69	66,3
ja	35	33,7

2.2 Material

2.2.1 Zelllinien

PC-3	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
DU 145	DSMZ GmbH
LnCaP	DSMZ GmbH

Die Zelllinie PC-3 wurde von einer Knochenmarkmetastase eines Grad IV-Prostatakarzinoms isoliert und ist nicht androgenresponsiv [118]. DU 145-Zellen stammen aus Tumorgewebe einer Hirnmetastase eines Prostatakarzinoms und sind nicht androgensensitiv [119]. Die Zelllinie LnCaP wurde aus einer Lymphknoten-Metastase etabliert und ist androgensensitiv [120].

2.2.2 Substanzen

Acrylamid	Appligene oncor, Illkirch Graffenstaden, Frankreich
Alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse antibody, cat # AC 32 ML	Tropix, Bedford, USA
Antibody diluent reagent solution	Zymed, San Francisco, USA
APS (Ammoniumperoxiddisulfat)	Merck, Darmstadt
Aquatex	Merck, Darmstadt
BCA protein assay kit, cat #23225	Pierce Rockford, Illinois, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
CDP-Star Ready-to-use	Tropix, Bedford, Massachusetts, USA
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Color marker (high range)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Coomassie Brilliantblau	Fluka AG, Buchs, Schweiz
COX-2 blocking peptide, cat #36017	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
COX-1, monoclonal antibody, cat #160110	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
COX-2, monoclonal antibody, cat #160112	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

COX-2, polyclonal antibody PG27	Oxford Biomedical Research, MI, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), cat #BE12-707F	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Essigsäure (Ethansäure)	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA
EDTA (Ethyldiamintetra-essigsäure-di-Natriumsalz)	Merck, Darmstadt
FCS (Foetales Kälberserum), cat #3402-P992203	PAN Biotech, Aidenbach
Glycin	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
HuR (3A2) mouse monoclonal antibody cat# E 202	Santa Cruz Biotechnology, USA
I-Block	Tropix, Bedford, USA
IL-1 β (Interleukin-1 β), rekombinant, human, cat #201-LB	R&D Systems, Wiesbaden
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Bio Whittaker. Verviers, Niederlande
Methanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Ms X Actin	Chemicon International, Temecula, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Nitro-Block II	Tropix, Bedford, USA
Protein Block (serum-free)	DAKO, Carpinteria, USA

Salzsäure	Merck, Darmstadt
Second Antibody conjugated to Alkaline Phosphatase	Tropix, Bedford, USA
Sigma fast: Fat red TRI Naphtol AS-MX tablet sets	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Super Sensitive Detection Kit	Bio Genex, San Ramon, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamine)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung 0,5% / 0,2% (w/v) in PBS (10fach konzentriert)	Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Xylol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

2.2.3 Lösungen

Assaypuffer 10x	12,1	g	Tris-Base
	in 350,0	ml	Aqua dest. lösen pH 9,8 einstellen
	1,0165	g	MgCl ₂ * 6 H ₂ O
	ad 500,0	ml	H ₂ O

Blocking-Puffer	0,6	g	I-Block
	30,0	ml	10x PBS oder TBS
			PBS mit 270,0 ml Aqua bidest. auffüllen, erhitzen (nicht kochen), abkühlen lassen
	300,0	µl	Tween 20
Citratpuffer 10x	3,78	g	Citronensäure-Monohydrat
	24,21	g	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
	ad 1000,0	ml	H ₂ O pH 6,0 einstellen
Coomassie-Färbelösung	0,6	g	Coomassie-Blau
	100,0	ml	Essigsäure
	ad 1000,0	ml	H ₂ O
Destain Solution II	70	ml	Essigsäure
	50	ml	Methanol
	ad 1000,0	ml	H ₂ O
Elektrophoresepuffer 10x	30,3	g	Tris-Base
	144,0	g	Glycin
	2,8	g	SDS
	ad 1000,0	ml	H ₂ O pH 8,3-8,4 einstellen
Färbefixierlösung für	250,0	ml	Isopropanol
Coomassie	100,0	ml	Essigsäure
	ad 1000,0	ml	H ₂ O

PBS (Phosphate buffered saline) 10x	82,3	g	Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
	23,5	g	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
	40,0	g	NaCl
	ad 1000,0	ml	H ₂ O
Polyacrylamidgel 10%	2,5	ml	Acrylamid
	2,5	ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
	100,0	μl	10% SDS
	50,0	μl	10% APS
	5,0	μl	TEMED
	4,8	ml	H ₂ O
Proteinlysispuffer	1,2	ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
	2,0	ml	10% SDS
	1,0	ml	Glycerol
	0,5	ml	DTT (1M)
	5,3	ml	Aqua bidest.
Sammelgel 4%	0,5	ml	Acrylamid
	1,25	ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
	50,0	μl	10% SDS
	50,0	μl	10% APS
	10,0	μl	TEMED
	3,2	ml	H ₂ O

Strip-Puffer	1,5	g	Glycin
	1,0	ml	Tween 20
	1,0	ml	10 % SDS
	ad 100,0	ml	Aqua bidest. pH 2,2 einstellen
TBS+Tween	250	ml	TBS
	250	μl	Tween 20
Transferpuffer 10x	29,0	g	Glycin
	58,0	g	Tris-Base
	3,7	g	SDS
	ad 800,0	ml	H ₂ O pH 8,3 einstellen
Tris-Puffer (TBS) 10x	9,0	g	Tris-Base
	68,5	g	Tris-HCl
	87,8	g	NaCl
	ad 1000,0	ml	H ₂ O pH 7,4 einstellen
Waschpuffer	100,0	ml	10x PBS oder TBS
	1,0	ml	10x PBS oder TBS
	ad 1000,0	ml	H ₂ O

2.2.4 Kulturmedien

DMEM, serumhaltig	500,0	ml	DMEM
(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	10,0 50,0	ml ml	L-Glutamin FCS
DMEM, serumfrei	500,0	ml	DMEM
	10,0	ml	L-Glutamin

2.2.5 Geräte

Bio Kinetics Reader EL 340	BIO-TEK Instruments, Winooski, USA
Dampfsterilisator Varioclav	H+P Labortechnik, München
Einzelkochtafel	Rommelsbacher Elektrohausgeräte GmbH, Dinkelsbühl
Elektrophoresekammern Agagel Maxi und Mini	Biometra, Göttingen
Elektrophoresenetzgerät Savant PS 250	Savant Instruments, Hobrook, USA
Filmentwickler Hyperprocessor	Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England
Geldokumentationsanlage	MWG Biotech, Ebersberg
Heizblock 100°C	Roth, Karlsruhe
Magnetrührer Variomag	H+P Labortechnik, München
pH-Meter	Mettler, Schwerzenbach, Schweiz
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schnellkochtopf	Steinbach, Kerpen
Schüttelinkubator 3032	GFL (Gesellschaft für Labortechnik), Burgwedel
Schüttler	Biometra, Göttingen
Thermocycler Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Tischzentrifuge Biofuge Pico	Hereaus, Hanau
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik), Burgwedel
Zellkulturbrutschrank BB16	Heraeus, Hanau
Zellkulturmikroskop IMT-2	Olympus Optical, Hamburg
Zellkulturwerkbank	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim

2.2.6 Verbrauchsmaterial

Chromatographiepapier 3MM CHR	Whatman, Maidstone, England
Deckgläser 24x 40 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England
Insulinspritzen 1 ml	Terumo, Leuven, Belgien
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Microtest Zellkulturplatte, 96 well	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Objektträger (Super Frost Plus) 25 x 75 x 1,0 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pap Pen	The Binding Site, Birmingham, UK
Parafilm	American National Can, Menasha, USA
Petrischalen für Zellkultur	Falcon-Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Pipettenspitzen ohne Filter	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 / 50 ml	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße 0,5 / 1,5 / 2,0 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Skalpell	Bard-Parker-Becton Dickinson, Hancock, USA
Spritzen 5/ 10/ 20 ml	B.Braun, Melsungen

Zellkulturflaschen 75 cm ²	Falcon-Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Zellschaber	Costar, Corning, USA
Zellstoff	Hartmann, Heidenheim

2.3 Methoden

2.3.1 Immunhistochemie

Nach der Fixation der Gewebeproben in 4% Formaldehyd erfolgte die Einbettung in Paraffin und die Anfertigung von 4 µm dünnen Gewebeschnitten. Diese wurden anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und histopathologisch evaluiert. Der Differenzierungsgrad wurde anhand des Gleason-Gradings bestimmt [20]. Die Stadieneinteilung erfolgte nach der TNM-Klassifikation gemäß UICC (Union international contre le cancer) 6. Auflage (2002) [19].

2.3.2 Histopathologische Begutachtung

2.3.2.1 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurden der anti-humane monoklonale COX-2-Antikörper von Cayman Chemical Company und der anti-humane monoklonale HuR-Antikörper von Santa Cruz verwendet. Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte durch dreimalige Inkubation in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 80%, 70% Ethanol, Aqua dest.) für je drei Minuten. Danach wurden die Schnitte in Citratpuffer fünf Minuten lang im Schnellkochtopf gekocht und anschließend ein Protein-Blocker appliziert, um unspezifische Interaktionen zwischen Gewebeproteinen und Antikörpern zu verhindern bzw. abzuschwächen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 (COX-2) und 1:500 (HuR) erfolgte über Nacht bei 4°C. Für die weitere Prozedur wurde ein Biotin-Streptavidin-System, bestehend aus einem biotinylierten Anti-Maus-Sekundärantikörper und einer Streptavidin-gekoppelten Alkalischen Phosphatase verwendet. Die Dauer der Inkubation betrug jeweils 20 Minuten, wonach das Gewebe durch wiederholtes Waschen mit TBS+Tween und TBS gereinigt wurde. Zuletzt erfolgte die Färbung mit

Hilfe des Fast-red-Chromogen-Systems, das sich jeweils aus einer Puffer- und einer Naphtol-haltigen Tablette zusammensetzt, für 10 (COX-2) bzw. 7 (HuR) Minuten.

Im Anschluss wurden die Zellkerne für 20 Sekunden in Hämalanlösung nach Meyer gegengefärbt und mittels Aquatex eingedeckelt. Die Spezifität des COX-2-Antikörpers wurde mithilfe eines COX-2-blockierenden Peptids gemäß den Anweisungen des Herstellers nachgewiesen.

Darüber hinaus wurde an 20 Gewebeschnitten von Prostatakarzinomen die COX-1-Expression unter Verwendung des anti-humanen COX-1-Antikörpers von Cayman Chemical Company untersucht. Aufgrund der negativen COX-1-Expression im Prostatakarzinom wurden die Färbungen nicht fortgesetzt.

Zum Vergleich mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten monoklonalen anti-COX-2-Antikörper von Chemical Company wurden testweise Färbungen mit dem ebenfalls weit verbreiteten polyklonalen anti-COX-2-Antikörper PG 27 von Oxford Research durchgeführt.

2.3.2.2. *Quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbung*

Aufgrund der in anderen Publikationen beschriebenen COX-2-Expression in der Proliferativen Inflammatorischen Atrophie (PIA) bzw. der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich einer COX-2-Expression in der Prostatistischen Intraepithelialen Neoplasie (PIN) wurde bei der Auswertung der COX-2-Färbung zwischen Tumorgewebe, PIN, atrophischen Drüsen und Normalgewebe unterschieden. Da die COX-2-Expression in den epithelialen Anteilen des Gewebes dominierte, erfolgte keine zusätzliche Beurteilung der Expression in Stroma- und Entzündungszellen. Aufgrund der speziellen Fragestellung wurden bei der HuR-Färbung nukleäre und zytoplasmatische Färbung in Tumor- und Normalgewebe getrennt bewertet. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ nach dem vielfach angewendeten Immunreaktiven Score (IRS) von Remmele und Stegner [121]. Dazu wurde jeweils der prozentuale Anteil der positiven Zellen sowie die Intensität der Färbung beurteilt und danach die dazugehörigen Punktwerte multipliziert, so dass sich Werte von 1 bis 12 ergaben (Tabelle 2). Um Fälle mit niedriger oder hoher COX-2-Expression zu unterscheiden, wurden IRS-Werte von 0 bis 6 zu einer COX-2-Negativ-Gruppe und Werte von 7 bis 12 zu einer COX-2-Positiv-Gruppe zusammengefasst.

Tabelle 2: Immunreaktiver Score (IRS) [121]

Prozentualer Anteil der positiven Zellen	Punktzahl	Intensität der Färbung	Punktzahl
0 %	0	negativ	0
<10 %	1	schwach	1
10-50 %	2	mäßig	2
51-80 %	3	stark	3
>80 %	4		

2.3.2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz der Korrelation zwischen der COX-2- bzw. der HuR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern wurde mithilfe des zweiseitigen Fisher-Tests, des Chi²-Tests oder des Chi²-Tests für Trends analysiert. Die Korrelationen zwischen den immunreaktiven Scores der COX-2-Expression sowie der zytoplasmatischen und nukleären HuR-Expression wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho berechnet.

Die univariate Überlebensanalyse erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode, der Vergleich der Überlebenskurven mithilfe des Log-Rank-Tests. Die multivariate Überlebensanalyse wurde mithilfe des Cox-Modells der proportionalen Hazards berechnet. In der Cox-Regressions-Analyse wurden dabei abwechselnd verschiedene Variablen berücksichtigt. Als Endpunkt wurde ein PSA-Wert größer als 0,04 ng/ml definiert. Allgemein wurde ein p-Wert kleiner 0,05 als signifikant angesehen. Für die statistische Analysen wurde die SPSS Software Version 13.0 verwendet.

Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit positivem Nodalstatus (1,9%) wurde der Nodalstatus in die statistische Analyse nicht miteinbezogen. Das gleiche gilt für den Metastasierungsstatus, da dieser nur bei 20 (19,2%) Patienten bekannt war.

Bei der Darstellung der immunreaktiven Scores in Form von Boxplots (Abbildungen 2-4) gilt folgendes: Der Kasten wird durch das obere und untere Quartil (Q₀ bzw. Q₁) begrenzt und beschreibt als sogenannte Interquartilendistanz (ID) die mittlere

Spannweite der Daten. Der Querstrich im Kasten zeigt die Lage des Median an. Die beiden von dem Kasten ausgehenden Linien reichen bis zu den extremen Werten innerhalb der "inneren Eingrenzung" ($Q_0+1,5 \times ID$ bzw. $Q_u-1,5 \times ID$). Werte außerhalb der "inneren Eingrenzung", die aber noch kleiner als $Q_0+3 \times ID$ bzw. größer als $Q_u-3 \times ID$ sind, werden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Daten, die diese Grenzen überschreiten, werden mit einem Kreis (°) markiert [122,123].

2.3.3 Western Blot

2.3.3.1 Zellkultur

Die Zelllinien PC-3, DU 145 und LnCaP wurden in serumhaltigem Dulbecco's Modified Eagle's Medium bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und 5 Vol% CO₂ kultiviert und alle 3-4 Tage trypsinisiert und passagiert. Die folgenden Versuche fanden innerhalb von 10 Passagen statt.

2.3.3.2 Stimulation

Nach erneutem Aussäen in Zellkulturplatten mit 40 mm großen Wells und 24-stündiger Inkubation in jeweils 4 ml serumfreien Medium wurden die Zellen durch die Zugabe von 10 ng/ml IL-1 β oder 10 nmol/l TPA für 24 Stunden stimuliert. Bei dem Kontroll-Ansatz wurde diese Zugabe unterlassen.

2.3.3.3 Proteinisolierung und -konzentrationsbestimmung

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf Eis mit je 100 μ l Proteinlysepuffer lysiert, mittels Zellschaber abgetragen, abpipettiert und mit einer Insulinspritze homogenisiert. Anschließend fand die Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe eines BCA-Protein-Determination-Kits laut Herstelleranweisung statt. Es handelte sich dabei um eine photometrische Extinktionsmessung der verdünnten Proben bei 562 nm unter Mitführung einer Protein-Standardreihe.

2.3.3.4 Elektrophorese und Western Blot

Nach zehnmütiger Inkubation bei 95°C wurden 100 μ g Protein auf ein 10% Polyacrylamid-Gel aufgetragen, zusammen mit einem Längenmarker bei 100 V für 1 Stunde und 50 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt und bei 100 mA für 90 Minuten

auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Danach wurde die Membran mit PBS gespült und für eine Stunde mit Blocking-Puffer versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Über Nacht erfolgte bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem monoklonalen Anti-COX-2-Primärantikörper, der in einer Verdünnung von 1:1000 in Blocking-Puffer vorlag. Parallel dazu fand eine Coomassie-Färbung des Gels statt, um die einwandfreie Auftrennung der Proteine zu kontrollieren. Nach dreimaligem Waschen in Wasch-Puffer für je 15 Minuten folgte eine einstündige Inkubation mit dem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper, der zuvor auf 1:5000 mit Blocking-Puffer verdünnt worden war, und ein letzter Waschvorgang in Assaypuffer für je 2 Minuten. Anschließend erfolgte die Visualisierung der Bande mit Hilfe des CDP-Star-RTU-Lumineszenzsystems, das für fünf Minuten mit den Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörpern reagierte. Daraufhin wurden Röntgenfilme belichtet und jeweils nach 5, 10, 30 Minuten sowie nach 1 und 1,5 Stunden entwickelt.