

## 3 Methoden

### 3.1 Bearbeitung der Mausgelenke

Es wurden STR/ort Mäuse in den verschiedenen Altersgruppen untersucht. Dazu mussten sie durch zerebrale Dislokation getötet werden. Dann wurde das Fell und die Haut von den hinteren Extremitäten abgezogen und diese im proximalen Bereich des Femurs vom Stamm und im distalen Bereich von Tibia und Fibula vom Fuß abgetrennt. Nun wurde die Muskelmasse so weit wie möglich reduziert, ohne die Gelenkkapsel zu öffnen. Alle beschriebenen Techniken wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach der Präparation wurden die Mausknien in 4% PFA/PBS bei Raumtemperatur (RT) für 48 h fixiert. Anschließend wurden sie für 24 h ebenfalls bei RT direkt in die Entkalkungslösung gelegt.

### 3.2 Immunhistochemie

#### 3.2.1 Beschichtung der Objektträger

Die Objektträger wurden zunächst in 50 % Ethanol unter Zusatz von 2 % (v/v) 3`Aminopropyltriethoxysilan (APES) für 3 h inkubiert und danach 3 x 1 min in absolutem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger 6 h in 5 % (v/v) Glutaraldehyd in Aqua dest. inkubiert und anschließend 3 x 15 min in Aqua dest. gewaschen und getrocknet.

#### 3.2.2 Vorbereitung der Mausknien für die Immunhistochemie

Zur Einbettung wurden die Präparate in den Einbettautomaten gegeben, wo sie 2 x 1 h in 70 % Ethanol, 3 x 2 h in 96 % Ethanol, 2 x 2 h in 100 % Ethanol, 1 h in 2/3 Ethanol 1/3 Xylol-Gemisch, 1 h in 1/3 Ethanol 2/3 Xylol-Gemisch, 1 h in Xylol, 2 h in Paraplast und noch mal 3 h in Paraplast inkubiert wurden. Danach wurden die

Proben so in Paraffinblöcke eingebettet, dass die Patella als erste angeschnitten wurde und frontale Schnitte gemacht werden konnten.

Von den Blöcken wurden mit dem Mikrotom (Mircom, Walldorf) 5 µm dicke Schnitte angefertigt, im 37° C warmen Wasserbad gestreckt und auf die beschichteten Objektträger aufgebracht. Nach dem Trocknen bei 37° C über Nacht konnten die Schnitte weiter verarbeitet werden.

### **3.2.3 Vorbehandlung der Schnitte**

Durch die Fixierung in Formalin und die aufwendige Einbettung in Paraffin wird das Gewebe vollkommen entwässert. Während der Einbettung können einige Proteine so denaturiert werden, dass die gegen sie gerichteten Antikörper ihre antigenen Epitope nicht mehr erkennen können. Daher müssen die Schnitte in manchen Fällen (siehe 2.2 Seite 12) mit Pronase oder Mikrowelle vorbehandelt werden, bevor eine Färbung möglich ist.

#### **3.2.3.1 Entparaffinisierung**

Vor der Färbung müssen die Schnitte zunächst von Paraffin befreit und rehydriert werden. Dies geschieht durch jeweils 10 min Inkubation bei RT in Xylol, gefolgt von reinem Aceton, anschließend einer Mischung von Aceton und TBS im Verhältnis 1:2 und zum Schluss reinem TBS.

#### **3.2.3.2 Pronase-Behandlung**

Für manche Antikörper (siehe 2.2) war zur Demaskierung der antigenen Epitope eine Vorbehandlung der Schnitte mit Pronase notwendig. Hierzu wurden die Schnitte nach der Entparaffinisierung für 5 min bei 37° C in TBS mit dem Zusatz von 100 µg/ml Pronase Typ XIV (Sigma) inkubiert. Die Reaktion wurde durch ausgiebiges Waschen in TBS mit 0,1 M Glycin und 1 x SSPE gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte in TBS gestellt.

#### **3.2.3.3 Mikrowellen-Behandlung**

Andere Antikörper konnten ihre antigenen Epitope auf den Schnitten nur nach einer Mikrowellen-Behandlung erkennen. Die Schnitte wurden nach der Entparaffinisierung

in Mikrowellen Küvetten (DAKO) mit Zitratpuffer gestellt und 10 min bei 180 W in der Mikrowelle gekocht. Anschließend wurden die Schnitte in TBS gestellt.

### 3.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Für diese Arbeit wurden nur Einzelfärbungen mit einer dreifach verstärkten Reaktion durchgeführt. Das Antigen wurde zunächst mit unmarkierten Primärantikörpern gebunden. Als Sekundärreagenz wurden gegen den Primärantikörper gerichtete Dig-markierte Antiseren verwendet. Die zweite Verstärkung des Signals erfolgte mit Hilfe des anti-Dig-FITC Antikörpers (Roche). Für die dritte Verstärkung und eigentliche Färbung wurde ein anti-FITC Antikörper (Roche), der an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist, verwendet. Die AP ermöglichte eine Fuchsinfärbung. Positive Zellen wurden durch die von der AP katalysierte Reaktion intensiv rot gefärbt.

Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Fettstift (DAKO) umrandet, um das Ineinanderlaufen der Färbungen zu verhindern. Alle Inkubationsschritte wurden unter RT in einer feuchten Kammer durchgeführt und nach jedem Schritt wurden die Schnitte für 2 x 5 min in TBS gewaschen.

Vor der Behandlung mit dem Erstantikörper wurde das Präparat 15 min mit 3% Mausserum in 3% BSA und 3% PBS inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen auf den Schnitten abzusättigen. Danach wurden die Primärantikörper in der unter 2.2 angegebenen Konzentration in einer Lösung aus PBS/BSA/MS für 1,5 h auf die Schnitte gegeben. Es folgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Dig-FITC in einer 1:200 Verdünnung in PBS/BSA/MS für 1 h und dann der Tertiärantikörper anti-FITC-AP ebenfalls in einer 1:200 Verdünnung in PBS/BSA/MS für 1 h. Die Farbentwicklung erfolgte mit der Färbelösung (siehe 2.1.1) abhängig vom Primärantikörper für mindestens 15 min.

Abschließend wurden die Schnitte mit Papanicolaous Hämatoxylin (Merck) für 1 min gegengefärbt, 2 min in Wasser gespült und in Glyceringelatine (Merck) eingebettet.

### 3.2.5 Kontrollfärbungen

Zur Kontrolle der immunhistochemischen Färbungen wurden die verschiedenen Schritte der Reaktion auf ihre Spezifität hin untersucht.

Zur Kontrolle der Sekundärantikörper wurden die Schnitte erstens anstatt mit Primärantikörper mit BSA/MS inkubiert und anschließend alle weiteren Schritte durchgeführt. Zweitens wurden nicht gegen Mausproteine gerichtete Isotype-Kontrollen (Ratte-IgG) verwendet. In beiden Fällen konnte für keinen der verwendeten Sekundärantikörper und Tertiärantikörper eine Färbung beobachtet werden.

Zusätzlich wurden die Schnitte auch mit der Färbelösung alleine inkubiert, um endogene AP-Aktivität auszuschließen.

### 3.2.6 Auswertung der Färbungen

Aus arbeitstechnischen Gründen wurden die Schnitte an drei verschiedenen Tagen gefärbt (1. Färbung, 2. Färbung, 3. Färbung), wobei an einem Tag Schnitte von Mäusen unterschiedlichen Alters gefärbt wurden.

Die gefärbten Präparate wurden unter dem Mikroskop (Axioskop von Zeiss) bewertet. Mit Hilfe eines 1mm<sup>2</sup> Rasters wurde durch Auszählung der Prozentsatz an positiv angefärbten Zellen bestimmt. Von jeder Maus wurden beide Knie für jedes Zytokin und beide Wachstumsfaktoren gefärbt und die beiden Gelenkflächen der Tibia bei 100 facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden wenn möglich 150 Zellen pro Gelenkfläche ausgezählt. Aus den gezählten positiven und negativen Zellen wurde der Prozentsatz an positiven Zellen ermittelt und der Mittelwert errechnet.

In den 4 Altersgruppen, 10, 20, 30 und 40 Wochen alte Mäuse, wurde versucht, jeweils mit 5 Mäusen zu arbeiten, wobei bei den Männchen meist nur 4 Mäuse verfügbar waren. Die Mäuse wurden in jeder Altergruppe und in jedem Geschlecht von 1-4 bzw. 5 durchnummeriert.

Da nicht an jedem Gelenk beide Gelenkflächen dargestellt werden konnten, setzt sich der einzelne Wert durchschnittlich aus 2-4 Zählungen zusammen. Es wurden keine konsekutiven Schnitte gemacht.