

Materialien, die bei allen Versuchen verwendet worden sind:

Versuchstiere : Es wurden erwachsene Balb/c-Mäuse beiderlei Geschlechtes verwendet, die vor der Entnahme von Ohren oder Haut durch zervikale Dislokation getötet wurden. Alle Tiere stammten aus der institutseigenen Zucht.

- 25 µl Hamilton-Spritze mit Luer-Ansatz (HAMILTON, Darmstadt)
- 30 gauge Kanülen ("Microlance", BETON DICKINSON GmbH, Heidelberg)
- 1 Sezierschere (AESKULAP, Tuttlingen)
- 2 feine, aber kräftige Pinzetten (AESKULAP, Tuttlingen)
- Wachsstift oder Kerzenrest
- "Feuchtekkammer" bzw. Brutschrank mit gesättigter Luftfeuchtigkeit (HERAEUS, Hanau), um bei den Immunfluoreszenzfärbungen die Verdunstung der Inkubationslösung zu verhindern
- "Dunkelkammern", also z.B. mit Aluminiumfolie lichtisolierte Schalen und Schachteln, um ein Verblässen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden
- 70% Alkohol
- PBS (s. Anhang)
- Langerhanszell-Medium (s. Anhang)
- PBS/1%BSA (BSA: SIGMA, Deisenhofen)

### **8.1 In-situ-Infektion der Mausohren**

Eine Maus wurde narkotisiert und vom Experimentator wegblickend (bzw. zu ihm hinblickend) vor ihn auf den Tisch gelegt. Nun wurde eine schmale Rolle aus Laborpapier ( $\varnothing$  ca. 1 cm, vorne etwas schmaler zulaufend) mit dem schmalen Ende in das linke (bzw. rechte) Mausohr gelegt und das Ohr darüber gespannt, indem es mit dem Daumennagel der linken Hand gerade noch am Rand erfaßt und auf die Papierrolle gedrückt wurde. Nun konnten mit der rechten Hand kleine Injektionen in die caudale Seite des Ohres gesetzt werden. Da ein Ohr aber noch dünner zu sein scheint als die Rückenhaut einer Maus, war es nicht möglich, wirklich intrakutan zu spritzen oder auch nur subkutan ein Depot von eini-

gen  $\mu\text{l}$  zu setzen: Das Ohr war zu schnell durchstoßen. Um dennoch eine größere – wenn auch nicht genau bestimmbare – Zahl von Flagellaten in die Haut zu bekommen, wurde eine möglichst hohe Flagellatenkonzentration im Medium verwendet und es wurden sehr viele schräge und dadurch lange Stichkanäle geschaffen. Während des Zurückziehens der Nadel wurde etwas Injektionslösung in den Stichkanal eingebracht. Zusätzlich wurde auf der Öffnung des Stichkanales ein Tropfen von ca. 1  $\mu\text{l}$  zurückgelassen. Für die Darstellung der Epidermal Sheets wurde mit 10-20 Stichkanälen pro Ohr gearbeitet, für die In-vivo-Infektion von Langerhanszellen mit 50-60 Stichkanälen pro Ohr. Die verabreichte Infektionsdosis kann folgendermaßen geschätzt werden: Bei einer Injektionslösung von  $1 \times 10^4$  Parasiten/ $\mu\text{l}$  dringen durch den Stichkanal einer Wanze 50-100 Parasiten in die Haut ein (s. Kap. 6.6). Die verwendete 30 gauge-Kanüle ist aber um ein vielfaches dicker als die Mundwerkzeuge einer Wanze und es wurde mit einer höheren Flagellatenkonzentration gearbeitet, daher kann von einer Infektionsdosis von mindestens  $1-2 \times 10^4$  Flagellaten pro Ohr ausgegangen werden.

## 8.2 Färbung von Langerhanszellen in uninfizierten und infizierten Epidermal Sheets

Durch Zellfärbung in der Epidermis sollte untersucht werden, ob die Langerhanszellen bei der Infektion mit *T. cruzi* ebenso abwandern, wie sie es nach Infektion mit Leishmanien oder Schistosomen tun (Blank et al. 1992, Moll 1993, Sato & Kamiya 1995).

Zusätzlich verwendete Materialien:

- 1 kleine Korkplatte
- glattes, festes Papier
- Insektennadeln (PLANO, Wetzlar) oder dünne Stecknadeln
- 1 unsterile "24 Well" Kulturplatte oder kleine Petrischalen (NUNC, Wiesbaden)
- 1 kleine Kulturschale (NUNC)
- Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (s. Anhang)
- EDTA-PBS (s. Anhang)
- Aceton, unverdünnt (SIGMA)
- Antikörper I-a<sup>d</sup>/FITC (wurde mir freundlicherweise überlassen von der AG Mossmann vom MPI Freiburg)

## **Herstellung und Färbung der "Epidermal Sheets"**

(leicht verändert nach Wolff & Winkelmann 1967,  
Juhlin & Shelley 1977, Wang et al.1996)

Für diesen Versuch wurden Ohren verwendet, die 1) nicht vorbehandelt waren, 2) 24 und 48 Stunden vor Entnahme in situ nur mit einer trockenen Kanüle angestochen worden waren (Kontrolle), bzw. 3) 24 und 48 Stunden vor Entnahme in situ mit *T. cruzi* infiziert worden waren.

Die Ohren einer getöteten Maus wurden körpernah abgeschnitten. Ausgehend von der Schnittfläche wurden die dorsalen und ventralen Hälften mit zwei feinen Pinzetten auseinandergezogen. Die Ohrhälften wurden mit der dermalen Seite nach unten auf eine EDTA-PBS-Lösung gelegt, so daß sie vollständig aufschwammen, und 2 1/4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Eine "24 Well"-Kulturplatte eignet sich hierfür besonders gut, da die Ohrhälften nicht durcheinanderschwimmen können und Vergleiche leichter durchzuführen sind.

Nach der Inkubation wurden die Ohrhälften nacheinander präpariert. Jeweils eine Hälfte wurde mit der dermalen Seite nach oben auf ein glattes Stück Papier gelegt und an einer Seite mit einer Insektennadel auf der darunterliegenden Korkplatte fixiert. Bei den dorsalen Ohrhälften wurde in einigen Fällen eine zweite Fixiernadel zu Hilfe genommen, da diese Hälften sich immer schon beim Auseinanderziehen vor der Inkubation vom Knorpel trennten und daher sehr leicht zusammenrollten. Mit zwei feinen Pinzetten wurde das Ohr nun an einem Ende der Schnittkante so von oben und unten erfaßt, daß sich Dermis und Epidermis trennen ließen. Da die Epidermis leicht reißt, wurde sie mit der runden Außenseite einer Pinzette flach auf dem Papier fixiert und die Dermis durch wiederholtes Nachfassen mit der anderen Pinzette vorsichtig in einem Stück abgezogen. Um die Fixiernadeln zu entfernen, wurden sie direkt oberhalb des Hautstückes mit einer Pinzette umfaßt und erst dann entfernt, um ein Anheben und Reißen oder Zusammenrollen der Epidermis zu vermeiden. Die Epidermis wurde mit Hilfe der Pinzetten in ein weiteres "Well" mit PBS gelegt, so daß sie vollständig aufschwamm. Normalerweise streckte sich die Epidermis, bedingt durch die hydrophobe Außenseite, von selbst. Untergeschlagene Ränder oder kleine Falten wurden jedoch mit Hilfe der Pinzetten durch Ausstreichen oder Spreizen behutsam geglättet, da sie beim Färbevorgang sehr stören.

Für die Fixierung wurden die "Epidermal Sheets" – also die Epidermisstücke – mit den Schenkeln einer geöffneten Pinzette aufgenommen und in eine Kulturschale mit Azeton überführt. Hierbei wurde so verfahren, als wollte man die Epidermis auf der nächsten wäßrigen Lösung aufschwimmen lassen, die Pinzette aber schnell in das Azeton eingetaucht und dadurch sofort vom "Sheet" gelöst. Da die schützende Fettschicht schnell vom Azeton gelöst wurde, schwamm die Epidermis hier nicht auf, im Moment des Eintauchens spreizte sie sich aber noch etwas und konnte so in möglichst glatter Form fixiert werden. Da der "Sheet" sofort weiß wurde, war es wichtig, sich die dermale Seite zu merken. Nach der Fixierung war eine Unterscheidung nicht mehr möglich. Nach wenigen Minuten Fixierung wurden die "Sheets" mit der dermalen Seite nach oben auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger gelegt, sofort noch einmal glattgezogen und leicht angetrocknet.

Um den Färbeprozess zu erleichtern, wurden die Epidermisstücke mit Wachs umrandet und dann mit PBS/1%BSA für 15-20 min bei Raumtemperatur geblockt. Hierdurch wird eine Hintergrundfärbung, d.h. eine Anheftung des Antikörpers an freie Fc-Fragmente im Gewebe, vermieden. Anschließend wurde 5×1 Minute mit PBS gewaschen, indem die Lösung wiederholt auf dem Objektträger aufgetropft und abgesaugt wurde. Zum Färben wurden die "Sheets" je nach Größe mit 30-40 µl des Antikörpers beschichtet und 1,5 bis 2 Stunden in einer Feuchtekammer bei 37 °C inkubiert, danach noch einmal gewaschen und mit PBS eingedeckelt. Um ein Verblässen des fluoreszierenden Antikörpers zu verhindern, wurden die Präparate beim abschließenden Waschen mit einer aluminiumverkleideten Schale abgedeckt und für den Transport zum Mikroskop in einer verschlossenen Schachtel aufbewahrt.

### **8.3 In-vitro-Infektion von Langerhanszellen mit Trypanosoma cruzi**

Zusätzlich verwendete Materialien:

- sterile Gazetupfer
- 2 feine, gebogene Pinzetten (AESKULAP, Tuttlingen)
- 1 Skalpellklinge (AESKULAP, Tuttlingen)
- 1 Teesieb
- Petrischalen (Ø 100 mm, NUNC, Wiesbaden)

- 1 Kulturschale (Ø 100 mm, NUNC)
- HANK´s gepufferte Salzlösung (GIBCO)
- R10-Medium (s. Anhang)
- 2,5% Trypsin in HANK´scher Lösung, cell culture tested (SIGMA)
- Acridinorange-Ethidiumbromid-Färbelösung (s. Anhang)
- 1% Formalin (SIGMA) in PBS
- 1% Trypanblau (SERVA, Heidelberg) in PBS

### **8.3.1 Gewinnung von Langerhanszellen aus der murinen Körperhaut**

(nach Bletzacher 1992)

In den meisten Fällen wird diese Art der Zellisolierung mit nur den Ohren der Mäuse nach der Methode von Schuler (1985) durchgeführt, weil diese Ausführung der Präparation leichter zu handhaben ist. Bei der Körperhautpräparation kann jedoch die Anzahl der benötigten Mäuse bei gleichem Zellgewinn um 80% reduziert werden und ist daher aus ethischen Gründen unbedingt vorzuziehen.

Für den Versuch wurde eine weibliche Maus verwendet, da diese mehr Langerhanszellen besitzt als ein männliches Tier (Bletzacher 1992). Der getöteten Maus wurden Rumpf und die Beinansätze gegen den Strich möglichst kurz geschoren. Dabei wurde das Fell durch Zug leicht gespannt und der Druck mit der Schermaschine möglichst gering gehalten, um die Maushaut nicht zu verletzen, damit Risse oder Löcher die weitere Präparation nicht beeinträchtigen. Der geschorene Körper wurde zunächst unter fließendem Wasser gewaschen, um lose Haare zu entfernen.

Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter der Reinraumwerkbank mit sterilen Instrumenten. Zur Desinfektion wurde die Maus zweimal hintereinander in 70%igen Alkohol und dann zweimal in sterile PBS getaucht. Dafür wurden 50 ml Falkon-Röhrchen jeweils bis etwa zur Hälfte mit den jeweiligen Lösungen befüllt und die Maus kopfüber hineingetaucht. Um sie gründlich zu benetzen, wurde sie zunächst am Schwanz in den Röhrchen hin- und her gedreht, der Schwanz aber zuletzt auch getaucht. Der Tierkörper wurde danach auf einem sterilen Mulltupfer getrocknet.

Um die Körperhaut am Stück abzuziehen, wurde zunächst ein Medianschnitt unter dem Bauch vorgenommen und dann caudal der Vorderläufe und cranial der Hinterläufe je ein Rundschnitt um den gesamten Körper gezogen. Die Haut konnte nun vom Körper abgezogen werden, wurde einmal kurz in sterile PBS getaucht und dann mit der dermalen Seite nach oben in einer trockenen Petrischale ausgebreitet.

Mit einer gerundeten Skalpellklinge wurde das subkutane Fettgewebe durch schiebende Bewegungen entfernt und auch hierbei darauf geachtet, Löcher und Risse zu vermeiden. Das Hautstück wurde erneut mit der dermalen Seite nach oben in eine weitere, trockene Petrischale gelegt und dort in ca. 0.8×3 cm große Streifen geschnitten. Diese Streifen wurden nun so in eine vorbereitete Petrischale mit 18,6 ml HANK'scher Lösung transferiert, daß sie dort mit der dermalen Seite nach unten vollständig aufschwammen. Die leicht eingerollten Ränder wurden behutsam mit Hilfe einer Pinzette ausgestrichen, ohne die epidermale Seite der Hautstücke mit HANK'scher Lösung zu benetzen. In die befüllte Petrischale wurden 6 ml 2,5%ige Trypsinlösung zugegeben, um eine Gesamtkonzentration von 0,6% Trypsin im Inkubationsmedium zu erreichen, und dann zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Für das "Klopfen" (s.u.) wurde eine Kulturschale mit ca. 35 ml R10-Medium mit einem darin liegenden Teesieb vorbereitet. Dann wurde die Trypsinlösung nach Ablauf der Inkubationszeit unter den Hautstücken mit einer Pasteurpipette vorsichtig, aber gründlich abgesaugt. Mit Hilfe zweier feiner gebogener Pinzetten wurde die Epidermis von der Dermis abgehoben. Dabei wurden die Hautstücke mit der einen Pinzette (oder einem gebogenen Péan) an einem schmalen Ende auf dem Boden der Petrischale fixiert. Mit der anderen wurde zunächst leicht über eine Kante geschabt, um so etwas Epidermis von der Dermis zu trennen. Wenn genug Epidermis gelöst war, um sie in der ganzen Breite mit der Pinzette zu greifen, wurde sie abgehoben und mit der dermalen Seite nach unten auf das R10-Medium innerhalb des Teesiebes gelegt. Es wurde wiederum auf ein vollständiges Aufschwimmen der Epidermis geachtet. In unvollständig trypsinisierten Bereichen mußte die Epidermis von der Dermis durch behutsames Schaben mit der abgerundeten, für den Klingenhalter bestimmten Seite einer Skalpellklinge gelöst werden. Nach Überführung der Epidermis wurden mit dem Teesieb leichte Auf- und Abwärtsbewegungen – das "Klopfen" – vorgenommen, um aus dem durch das Trypsin bereits gelockerten Zellverband durch Reibungs- und Strömungskräfte die unteren Zellen der Epidermis herauszulösen. Der Klopfvorgang wurde auf etwa vier Minuten be-

schränkt, da längeres Klopfen zu vermehrter Loslösung der äußeren Epidermalzellen führt. In diesen Bereichen der Epidermis befinden sich jedoch kaum noch Langerhanszellen, ihr Anteil an den Zellen der Einzelsuspension würde also unnötig verringert. Die Epidermisstreifen wurden mit dem Sieb entfernt. Um Zellaggregate aufzulösen wurde das – durch die darin befindlichen Zellen nun trübe – Medium mehrmals mit einer 10 ml Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden zweimal mit R10-Medium gewaschen, um Trypsinreste zu entfernen, und in Langerhanszell-Medium resuspendiert.

### **8.3.2 Prüfung der Zellvitalität mit Trypanblau**

Ein Tropfen der Zellsuspension und ein etwa gleich großer Tropfen der Trypanblaulösung (SIGMA) wurden auf dem Objektträger vermischt, mit einem Deckglas abgedeckt und sofort mikroskopiert. Lebende Zellen leuchteten hell, tote färbten sich dunkelblau, der Hintergrund erschien hellblau.

### **8.3.3 Inkubation der Einzelsuspension mit Trypanosoma cruzi**

(nach Blank et al. 1993)

Die durch Trypsinisierung gewonnenen Einzelzellen wurden für 24 Stunden mit *T. cruzi* beider Stämme bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in Langerhanszell-Medium (s. Anhang) inkubiert. Die Flagellaten des Stammes "Chile 5" stammten aus der Kultur und setzten sich zusammen aus ca. 20% Trypomastigoten, 60% Epimastigoten und einigen Sphäro- und Amastigoten, es bestand ein Verhältnis von 4 Flagellaten/Zelle. Die Flagellaten des Stammes Tulahuén waren aus Wanzen gewonnen und setzten sich zusammen aus ca. 80% Trypomastigoten, einigen Epimastigoten und sehr wenigen Sphäromastigoten. Bei dieser Probe kam es leider zu einer Kontamination mit Wanzenkot, was aber die Lebensfähigkeit der Zellen nicht zu beeinträchtigen schien.

### **8.3.4 Färbung und Beurteilung der Zellen nach der Inkubation**

Zellen und Parasiten wurden nach der Methode von Channon et al. (1984, s. Anhang) für 10 min mit einer Färbelösung aus Acridinorange und Ethidiumbromid bei Raumtemperatur

inkubiert, danach mit 1% Formalin fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Bei dieser Färbung kann Ethidiumbromid in lebende Parasiten nicht eindringen, nur Acridinorange färbt die DNA und fluoresziert gelbgrün. Tote Parasiten werden von Ethidiumbromid gefärbt, der Kern fluoresziert dann rot-orange. Langerhanszellen wurden anhand ihrer typischen Oberfläche im Phasenkontrast identifiziert: Während andere Epidermalzellen beim Fokussieren einen klar gezeichneten, glatten Umriß aufwiesen, wirkten Langerhanszellen dabei in jeder Position geradezu haarig (Blank et al. 1993).

#### **8.4 In-vivo-Infektion von Langerhanszellen mit Trypanosoma cruzi**

Zusätzlich verwendete Materialien:

- sterile Gazetupfer
- sterile "24 Well"-Kulturplatten (NUNC)
- "Zytospin"-Aufsätze und Filter für die Zentrifuge (HETTICH, Tuttlingen)
- Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (s. Anhang)
- Antikörper: CD 11c/PE für die Färbung von Langerhanszellen (PHARMINGEN)  
Anti-rat/FITC (PHARMINGEN)  
RB6-8C5 Ratte anti-Maus-Granulozyten für die Färbung von  
neutrophilen Granulozyten  
NLDC 145 für die Färbung von Langerhanszellen  
(Granulozyten- und LC-Antikörper wurden mir  
freundlicherweise überlassen von der AG  
Prof. Falkenberg, Ruhr-Universität Bochum)  
Peroxydase conjugated Affinipure Mouse anti-Rat IgG  
(DIANOVA, Hamburg)
- Haema-Diff-Färbung (BIOANALYTIC GmbH, Freiburg)
- Weise-Puffer (Puffertabletten MERCK, Darmstadt)
- Harnstoff-Wasserstoffperoxyd (SIGMA)
- Diaminobenzidin (SIGMA)
- Zitratpuffer pH 5 (s. Anhang)
- Mayer's Hämalaun (MERCK)



#### **8.4.1 Gewinnung von aus der Haut ausgewanderten Langerhanszellen**

(nach Ortner et al. 1996)

Einer getöteten Maus wurden die Ohren körpernah abgeschnitten, kurz mit Alkohol abgespült und unter der Reinraumwerkbank auf einem sterilen Tupfer für 10 min. zum Trocknen gelegt. Die Ohrhälften wurden wie für die Präparation eines "Epidermal Sheet" mit sterilen Instrumenten auseinandergezogen und jede Hälfte mit der dermalen Seite nach unten in ein "Well" mit je 1,5 ml Langerhanszell-Medium überführt, so daß sie vollständig aufschwamm. Die Ohrhälften wurden von nun an für einige Tage bei 37 °C, 98% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach ein, zwei und drei Tagen wurden die aus den Epidermal Sheets ausgewanderten und nicht adhärierenden Zellen zusammen mit dem Medium mit einer Pipette abgesaugt und die Ohrhälften wieder mit neuem Medium versorgt. Neben Langerhanszellen wanderten bei Mäusen Makrophagen und dendritische T-Zellen (Thy1<sup>+</sup> bzw. V $\gamma$ 3 DETC) mit aus, des weiteren fanden sich einige polygonale Keratinozyten in der Zellsuspension. Einzig die Makrophagen sollen bis zum dritten Tag adhärend sein (Larsen et al. 1990, Ortner et al. 1996). Bei dieser Art der Kultivierung erhielt man pro Tag und Mausohr ca. 7.000 bis 12.000 Langerhanszellen, ihr Anteil an der Gesamtzellzahl stieg innerhalb dieser Zeit von ca. 30 auf fast 70%. Ihre Anzahl wurde geschätzt nach Identifikation der Zellen anhand ihres Umrisses im Phasenkontrast und ihrer Färbbarkeit mit CD11c/PE- und I-a<sup>d</sup>/FITC -Antikörpern. Körperhaut konnte in einem vergleichbaren Experiment nicht verwendet werden, die Epidermis dieser Region war entweder zu dick oder hatte zu viel schwer entfernbares Unterhautfettgewebe; es wanderten kaum Zellen aus (Ortner et al. 1996).

#### **8.4.2 Färbung der Zellen**

Abgesammelte, in das Medium eingewanderte Zellen aus je vier "Wells" wurden in einem 10 ml Falcon-Röhrchen zunächst 25 min bei 100 g pelletiert, in 0,5 ml Medium resuspendiert und in "Zytospin"-Aufsätzen (HETTICH) mit 30 g innerhalb von 20 min auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette bis auf einen Tropfen entfernt. Auf die Präparate wurde dann ein Lochfilter gelegt, so daß sich der

verbliebene Tropfen in der Mitte der Aussparung befand. Mit Hilfe am Boden nicht gummierter Zellzentrifugationsaufsätze wurden sie schließlich für 3 min. bei 30 g "trockengeschleudert". Die Präparate wurden bis zur Färbung ohne weitere Fixierung im Kühlschrank aufbewahrt.

Um den Anteil der Langerhanszellen zu überprüfen bzw. um festzustellen, ob nach gesetzter Noxe auch Neutrophile Granulozyten ins Medium auswandern, wurde nach folgendem Rezept eine **Immunofluoreszenz-Färbung** durchgeführt: Die Präparate wurden aus dem Kühlschrank genommen, mit Wachs umrandet und zuerst 5 min. mit PBS/1%BSA geblockt, dann 3×1 min. in PBS gewaschen (je nach Anzahl der Präparate in einer Küvette oder 50 ml Falcon-Röhrchen), mit dem (PE-gekoppelten) Erstantikörper beschickt und 30 min. bei 37 °C in einer Feuchtekammer inkubiert. Danach wurden sie wieder 3×1 min. gewaschen und in PBS eingedeckelt. Mit ungekoppeltem Neutrophilen-Antikörper "gefärbte" Präparate wurden nach der zweiten Wäsche 30 min mit dem gegen "Ratte" gerichteten und FITC gekoppelten Zweitantikörper wiederum 30 min inkubiert, noch einmal gewaschen und eingedeckelt.

Um von Zellen aufgenommene und im Zytoplasma eingeschlossene Parasiten auffinden zu können, wurde eine **Häma-Diff-Färbung** vorgenommen: Die Präparate wurden nach Rezept des Herstellers fixiert und gefärbt, mit WEISE-Puffer abgespült, getrocknet und für die Hellfeldmikroskopie in Entellan (MERCK) eingedeckelt.

Abschließend wurde durch die **Peroxydase-gekoppelte Antikörperfärbung und Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun** – eine Langerhanszell-spezifische Färbung in Kombination mit einer Übersichtsfärbung – untersucht, in welchen Zellen sich Erreger befanden (nach Rezepten der AG Prof. Falkenberg). Da der Gehalt an Antikörpern im Kulturüberstand der NLDC 145-produzierenden Zelllinie für eine immunhistochemische Färbung zu gering war, wurden die Zellen von der AG Prof. Falkenberg für 10-14 Tage im "mini-Perm"-Inkubator (HERAEUS, Wehrheim) gezüchtet und ein 5-10fach stärker konzentrierter Überstand gewonnen. Das Substrat für die Reaktion mit der Peroxydase des Zweitantikörpers wurde in jedem Versuch frisch angesetzt: 4 mg Diaminobenzidin und 4 mg Harnstoff-Wasserstoff-Peroxid wurden in je 5 ml Zitratpuffer gelöst und beide Komponenten erst direkt vor Gebrauch zusammengegeben. Die zelleigenen Peroxydasen im Zentrifugat wurden durch Be-

schichtung mit 3% Urea Hydrogen Peroxide in PBS für 10 min. inaktiviert. Dann wurden die Präparate mit dem NLDC 145 Antikörper (unverdünnter mini-Perm-Überstand) beschichtet und für 40 min. bei 98% Luftfeuchte und 37°C inkubiert. Sie wurden 3×1 min. mit PBS gewaschen, weitere 30 min. mit dem Zweitantikörper (anti-Rat IgG, Verdünnung 1:40) wie oben inkubiert und erneut 3×1 min. in PBS gewaschen. Schließlich wurden die Präparate mit der frisch angesetzten Substratlösung beschichtet und unter mikroskopischer Kontrolle so lange inkubiert, bis eine leicht bräunliche Färbung erreicht war (ca. 5-10 min.). Die Reaktion wurde durch Waschen in PBS abgestoppt.

Für die Gegenfärbung wurden die Präparate für 8-16 min. mit Mayer's Hämalaun beschichtet, 2× in Aqua dest. gewaschen (bis keine Farbwolken mehr aufschwammen) und schließlich durch kurzes Eintauchen in Leitungswasser "gebläut". Dabei färbten sich die Zellkerne blaß lila, das Zytoplasma hellblau und die Kerne und Kinetoplasten der Flagellaten dunkelblau bis schwarz. Die Präparate wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Entellan eingedeckelt.

## **8.5 Fluoreszenzmikroskopie und Fotografie**

Fluoreszin-Isothiocyanat (FITC) absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm und emittiert Wellenlängen um 525 nm, fluoresziert also grünlich. Ähnlich verhält sich Acridinorange mit einer Absorbtion von 490 nm und einer maximalen Emission bei 530 nm Wellenlänge. Ethidiumbromid absorbiert bei 545 nm und emittiert um 610 nm Wellenlänge und fluoresziert rot-orange. R-Phycoerythrin (PE) absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm und emittiert Wellenlängen um 585 nm, es fluoresziert rot.

Die Fotos wurden am ZEISS-Axiophot aufgenommen unter Verwendung der hochempfindlichen Filme TMY 400 und EPJ 320 (KODAK). Aufnahmen der Hellfeldmikroskopie wurden am Olympus BH 2-Mikroskop mit einem Agfachrome RSX 100-Film erstellt.