

14 ANHANG

14.1 Medien, Färbungen, Rezepte

Narkotikum für Mäuse: 0,8 ml Rompun (BAYER, Leverkusen)
2,4 ml Ketamin (UPJOHN,
ad 10 ml mit a. dest.
0,1-0,2 ml pro Maus i.p. verabreichen
Narkosedauer 20-40 min (individuelle Unterschiede)

Puffer für die Isolierung von *T. cruzi* über DEAE-Zellulose

(nach Stiles & Kierszenbaum 1986, Schaub 1992)

Tc-PBS: 16,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (=95 mM)
0,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (=9 mM)
4,25 g NaCl (72 mM)
ad 1.000 ml mit a.dest.
pH 7,5

Tc-PBSG: wie Tc-PBS
+ 5 g Glukose (=0,5%)

Tc-PBSG+P: wie Tc-PBSG
+ 1,14 g L-Prolin (SIGMA)

Tc-PBSG+P/1%FCS wie Tc-PBSG+P
+ 10 ml FCS (BÖHRINGER, Mannheim; 30 min bei 56 °C im
Wasserbad inaktiviert)

Giemsa-Färbung

Präparate 5 min. in Methanol fixieren und lufttrocknen lassen. Die Giemsa-Lösung (MERCK) 1:10 mit a. dest. verdünnen und die Objektträger auf einer Färbekbank vollständig damit beschichten, Färbedauer 30-45 min. Die Lösung dann abnehmen und die Präparate mit aqua dest. abspülen, wieder lufttrocknen und mit Entellan (MERCK) eindeckeln. Zytoplasma färbt sich rosa, DNA violett. Die Kinetoplasten werden dabei meist deutlich dunkler als die Kerne von Flagellaten und Zellen.

EDTA-Puffer (nach Romeis):

557 mg NaCl (=96 mM)

11 mg Kcl (=1,5 mM)

99 mg Na₂HPO₄ (=5,6 mM)

108 mg KH₂PO₄ (=8,0 mM)

380 mg EDTA (= 10,0 mM) (SIGMA)

ad 100 ml mit a. dest.

pH 6,8

(der pH-Wert steigt bei 37 °C auf 7,2)

PBS für die Langerhanszell-

1,42 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O (=8 mM)

Versuche:

0,20 g KH₂PO₄ (=1,5 mM)

0,20 g Kcl (=2,7 mM)

8,00 g NaCl (=137 mM)

ad 1.000 ml mit a. dest.

pH 7,2

Zitratpuffer für die

10,5 g Citrat-1-hydrat (=50 mM) (SIGMA)

Peroxidasefärbung:

6,9 g NaH₂PO₄ × 2 H₂O (=50 mM) (SIGMA)

ad 1.000 ml mit a. dest.

mit NaOH auf pH 5 einstellen

Langerhanszell-Medium (nach Blank et al. 1992):

100 ml RPMI 1640 mit 7,5% NaHCO₃, ohne L-Glutamin (GIBCO)
10% inaktiviertes FCS (=10 ml)
50 µM 2-Mercaptoethanol (= 0,5 ml einer Stammlösung mit
35µl 2-Mercaptoethanol auf 50 ml a. dest., CARL ROTH GmbH, Karlsruhe)
2mM L-Glutamin (=1ml einer 200 mM Lösung, so erhältlich bei GIBCO)
10 mM HEPES-Puffer (=1ml einer 1M Lösung, SIGMA)
160 µg/ml Gentamycin (=1,6 ml eines Ansatzes von 10 mg/ml, so erhältlich
bei GIBCO)
100 µg/ml Penicillin (= 0,2 ml einer Stammlsg. von 50mg/ml, GIBCO)
5ng/ml GM-CSF (wurde uns freundlicherweise vom MPI Freiburg überlassen,
1 ml der Stammlösung wurde pro 100 ml Medium benötigt)

Die jeweils ersten Angaben sind die geforderten Endkonzentrationen im Langerhanszell-Medium, die angegebenen Mengen werden beim Ansetzen des Mediums nur den 100 ml RPMI-Medium hinzugefügt.

R10-Medium (nach Bletzacher 1992):

Dieses reduzierte Arbeitsmedium richtet sich in den Mengenangaben nach dem Langerhanszell-Medium, enthält aber kein HEPES-Puffer, kein Penicillin und kein GM-CSF.

Färbelösung mit Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB)

(nach Channon et al. 1984)

25 mg Acridinorange (SIGMA) werden in 1ml Äthanol gelöst und dann 1:50
mit PBS verdünnt

5 mg Ethidiumbromid (SIGMA) werden in 1 ml PBS gelöst

Für eine Stammlösung werden 1 Vol. Acridinorange-Lösung, 1 Vol. Ethidiumbromid-Lösung und 8 Vol. PBS gemischt und zum Färben schließlich 1 Vol. der Stammlösung in 9 Vol. Zellsuspension gegeben; damit ergibt sich eine Endkonzentration von 5 µg AO/ml und 50 µg EB/ml in der Suspension.

Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin

(nach Rezept des Herstellers):

5 mg Poly-L-Lysin (Molekulargewicht 150.000-300.000, SIGMA) werden in 50 ml a. dest. gelöst. 1 ml dieser Lösung reicht aus, um 25 cm² zu beschichten. Die Lösung muß nach 5 min. wieder abgenommen und die Objektträger mit a. dest. gewaschen werden. Vor Gebrauch sollten sie mindestens 2 Stunden trocknen. Durch diese Beschichtung bekommen die Objektträger eine negative Oberflächenladung, aufgebrachte Zellen bleiben dadurch besser haften.

14.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen (zu Teil II)

LC	Langerhanszellen
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
DETC	Dendritic Epidermal T-Cells
MHC	Major Histocompatibility Complex
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor
TNF α	Tumor-Necrosis-Factor α
IFN γ	Interferon γ