

Charakterisierung theilerienempfindlicher Subpopulationen von Rinderzellen

D. E. Rebeski¹, K. T. Friedhoff¹, M. Hadam³, H.-J. Schuberth², W. Leibold²

Einleitung

Theileria annulata (Apicomplexa, Piroplasmida) ist der Erreger der sogenannten Mittelmeertheileriose. Zecken der Gattung *Hyalomma* übertragen mit ihrem Speichel infektiöse Sporozoiten ein bis drei Tage nach Beginn der Infestation. Frühestens vier Tage nach Beginn der Infektion sind die ersten Schizonten oder Kochschen Kugeln in den zu Blasten transformierten, lymphoiden Zellen sichtbar. Die Besonderheit dieses Transformationssystemes ergibt sich aus folgendem Aspekt: Mit Hilfe geeigneter *Theileria*-Sporozoiten lassen sich auch *in vitro* (5) sehr wahrscheinlich unterschiedliche Subpopulationen mononukleärer Zellen desselben Spenders transformieren (2, 16, 17). Diese Möglichkeit ist bisher in keinem anderen permanenten Transformationssystem beobachtet worden.

Wir untersuchten die Expression boviner Lymphozyten-Antigene (BoLA) der Klasse I und II auf theilerientransformierten, lymphoblastoiden Zelllinien (BoLCL) sowie die Expression eines intrazellulären Antigens.

Material und Methoden

Parasiten

Hyalomma a. excavatum-Larven wurden an mongolischen Rennmäusen (*Meriones unguiculatus*) gezüchtet (18). Die Infektion der Nymphen erfolgte alimentär an einem mit dem *T. annulata*-Stamm „Ankara“ (13) infizierten Rind. Die adulten Zecken wurden vier Tage bis zur Reifung der Sporozoiten am Rind aktiviert, die Speicheldrüsen steril präpariert und homogenisiert zwecks Freisetzung der Sporozoiten (9).

Separation peripherer, mononukleärer Zellen der Blutes (PBMC)

Die Gewinnung heparinisierten Vollbluts erfolgte beim Rind durch die Punktion der Vena jugularis unter sterilen Kautelen mit heparinbeschichteten Blutentnahmeröhrchen und dem Vacutainersystem. Periphere, mononukleäre Blutzellen wurden durch einen diskontinuierlichen Dichtegradienten mit Ficoll-Isopaque (Dichte: 1,077 g/ml bei 10° C) gewonnen (4). Kontaminierende Erythrozyten wurden durch eine hypotone Schockbehandlung mit 2 ml Aqua bidestillata lysiert. Der Anteil toter Zellen wurde mit 0,1%iger Trypanblaulösung im "dye exclusion test" ermittelt. Er betrug stets weniger als 5%. Mit Hilfe einer 0,25%igen Acridinorangelösung wurden für jede PBMC-Separation eine Reinheit von über 95% mononukleärer Zellen ermittelt.

Theileria annulata-transformierte, bovine, lymphoblastoide Zelllinien (BoLCL)

PBMC von fünf Rindern der Rasse Deutsche Schwarzbunte (DSB) wurden mindestens 24 Stunden oder maximal bis zu 83 Tagen im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ in Luft in Rundboden-Mikrotiterplatten (3 × 10⁵ PBMC/0,2 ml/Vertiefung) oder in Zellkulturflaschen (1 × 10⁷ PBMC/2 ml) vorinkubiert. Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640, substituiert mit 100 IE Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml, 2,5µg Amphotericin B/ml und 20% inaktiviertem fetalen Kälberserum, verwendet. Die Infektion der PBMC erfolgte mit nativen oder kryokonservierten *T. annulata*-Sporoziten von fünf adulten Zecken/ml in Verdünnungen von 1 : 2 bis 1 : 1024. Nach 24 Stunden wurde das Mediumvolumen verdoppelt und anschließend das Medium nach Bedarf gewechselt (5). Alle 24-48 Stunden wurden die Kulturen auf das Auftreten von transformierten Blasten mikroskopisch beurteilt. Frühestens neun Tage nach der Infektion (dpi) wuchsen transformierte, lymphoblastoide Zellen als polymorphe, adhärente oder als runde Zellen in Suspension.

Indirekte Membranimmunofluoreszenz

PBMC von vier DSB-Rindern und 37 theilerientransformierte BoLCL von insgesamt fünf DSB-Rindern wurden vom 28.-131. dpi i. d. R. wiederholt mit monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen Oberflächenantigene der BoLA-Klasse I (H 58 A) und -II (TH 14 B) (6) markiert und durchflußzytometrisch im fluoreszenz-aktivierten Zellsortiergerät (FACS) gemessen (Tab. 1). Die BoLCL wurden meist einen Tag nach dem Mediumwechsel in ihrer logarithmischen Wachstumsphase gewonnen. Der Anteil trypanblau-positiver Zellen betrug weniger als 15%. In einer Rundboden-Mikrotiterplatte wurden 5 × 10⁵ Zellen/Vertiefung fünf Minuten mit 10 µl nativem humanem Gammaglobulin in einer Konzentration von 10 mg Protein/ml vorinkubiert. Anschließend wurden zu den Zellen 20 µl des jeweiligen monoklonalen Antikörpers in der Gebrauchsverdünnung und zur Negativkontrolle 20 µl PBS plus 1% BSA und 0,01% NaN₃ (PBS-AN) pipettiert. Nach der Inkubation (40 Minuten bei 4° C) wurden die Zellen dreimal in PBS-AN gewaschen (200 g, fünf Minuten bei 4° C). Die resuspendierten Zellen wurden mit 20 µl eines 1 : 25 verdünnten Fluoreszeinisothiocyanat-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG + IgM (H + L) F (ab')₂ inkubiert und gewaschen (s. o.), in 200 µl PBS-AN resuspendiert und sofort im FACS durchflußzytometrisch analysiert. In jeder Probe wurden durchschnittlich 2 × 10⁴ Zellen untersucht und der Anteil positiver Zellen (%) bestimmt.

Herstellung und Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers Bo-114

Eine Maus (BALB/c) wurde mit theilerientransformierten Lymphoblastoidzellen (*T. annulata* „Ankara“) intraperitoneal immunisiert. Nach der Belastungsinfektion wurden die Milzzellen mit NS-O Myelomzellen im HAT-Selektivmedium (HT-Medium mit 0,8 µM Aminopterin) fusioniert. Daraus wurde nach der Klonierung im Grenzverdünnungs-Verfahren der Hybridoma-Klon Bo-114 entwickelt. Er produziert Antikörper, die sich in der isoelektrischen Fokussierung als homogen erwiesen. In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigen die schweren Ketten ein einheitliches Molekulargewicht von 55 kD. Sie konnten im Isotyp-ELISA-Verfahren als IgG₁-kappa-Antikörper charakterisiert werden.

Indirekte intrazelluläre Immunofluoreszenz

Auf einem entfetteten Objektträger wurden die Felder für die Zellen mit Glycerintropfen markiert und mit PTFE-Teflonspray 650 übersprüht, mit Wasser abgespült und luftgetrocknet. Zwischen 1-5 × 10⁷ Zellen/ml wurden zweimal in kalter PBS gewaschen und fünf Minuten in 1 ml kalter, hypotoner Tri-Natrium-Zitratlösung (hyC) resuspendiert. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200 µl hyC aufgenommen und auf den

Objektträger pipettiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 1 : 3 verdünnter Methanol-Azeton-Lösung (10 Minuten bei -20°C). Für die Färbung wurden die Zellen fünf Minuten mit 5 μl nativem, humanen Gammaglobulin bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer vorinkubiert. Nach Entfernen des Gammaglobulins wurden die feuchten Zellen im 25 μl unverdünnten Überstand oder PBS mit 1% BSA (Negativkontrolle) 40 Minuten inkubiert (s. o.). Zum positiven Nachweis antigenhaltiger Zellen wurde Aszitesflüssigkeit des monoklonalen Antikörpers Bo-114 verwendet. Die Zellen wurden dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit 25 μl Fluoresceinisothiocyanat-konjugierten Antikörper (Ziege-anti-Maus-IgG + IgM [H + L] F [ab']₂) in einer Verdünnung von 1 : 25 für 40 Minuten inkubiert (s. o.). Nach dem Waschen (s. o.) wurden die luftgetrockneten Zellen mit 90%igen PBS-Glyzerin eingedeckt und bei 400 und 1000facher Vergrößerung unter UV-Licht ausgewertet.

TABELLE 1
Anteil der für BoLA-Klasse I- und II positiven Zellen

mAk	Spezifität gegen	Σ PBMC			Σ BoLCL		
		n	\bar{x}	s	n	\bar{x}	s
H 58 A	BoLA-Klasse I	n=6	$\bar{x}=97,0\%$	s \pm 0,9	n=72	$\bar{x}=93,3\%$	s \pm 7,7
TH 14 B	BoLA-Klasse II	n=9	$\bar{x}=22,6\%$	s \pm 8,7	n=76	$\bar{x}=84,3\%$	s \pm 15,6

mAk: monoklonaler Antikörper

Σ : Gesamtheit aller peripheren, mononukleären Blutlymphozyten (PBMC) und theilerientransformierten, bovinen, lymphoblastoiden Zelllinien (BoLCL)

n: Häufigkeit der FACS-Analyse

\bar{x} : Mittelwert

s: Standardabweichung

Ergebnisse und Diskussion

Phänotypisierung permanenter BoLCL mit monoklonalen Antikörpern

Die prozentuale Verteilung der für MHC-Klasse I und -II positiven PBMC und BoLCL verschiedener DSB-Rinder wurde wiederholt im FACS durchflußzytometrisch bestimmt (Tab. 1).

Die Ausgangszellen (PBMC) verschiedener Rinder wurden durchflußzytometrisch analysiert und anschließend mit *T. annulata* transformiert. Acht permanente BoLCL wurden zwischen dem 33. bis 131. dpi viermal durchflußzytometrisch analysiert und auf diese Weise die Expressionskinetik der Oberflächendeterminanten beobachtet (Abb. 1, 2a u. 2b). Die BoLCL No-T4A4 und No-T4A5 (Abb. 2b) wurden nach 52 oder 83 Tagen als adhärent wachsende PBMC mit Sporoziten infiziert. Phänotypisch unterschieden sie sich nicht von den übrigen BoLCL, die schon nach 24 Stunden Vorinkubation mit *T. annulata*-Sporoziten infiziert worden waren.

Fast 100% der Ausgangszellen und der BoLCL exprimierten das vom bovinen MHC kodierte Klasse-I-Antigen (Abb. 1). Dies weist auf eine konstante Expression von BoLA-Klasse-II-Antigen während und nach der Transformation hin.

Nur etwa 20% der PBMC exprimierten BoLA-Klasse-II-Antigene (Abb. 2a). Nach der Transformation stieg die Anzahl der für Klasse II positiven BoLCL-Zellen auf über 80% an. Im Verlauf der Kultivierung blieb der Anteil der für Klasse II positiven Zellen entweder konstant oder nahm erheblich ab (Abb. 2b). Dieses Verhalten spricht für ein bevorzugt selektives Wachstum der für Klasse II positiven Zellen, aber auch für einige der für Klasse II negativen Zellen. Ein Einfluß von Zytokinen, insbesondere Interferon-Gamma (1), die unter der Transformation freigesetzt werden und die

TABELLE 2

Affinität des monoklonalen Antikörpers Bo-114 zu Zielzellen in der indirekten intrazellulären Immunfluoreszenz

Zielzellen	Fluoreszenz
Rind OI-T.a.-BoLCL	positiv
Rind Bo-T.a.-BoLCL	positiv
Rind Be-T.a.-BoLCL	positiv
Rind Ba-T.a.-BoLCL	positiv
BL3*-BoLCL	positiv
Rind Bo-PBMC	schwach positiv
Rind Be-PBMC	
Rind Ba-PBMC	
Rind Bo-PBMC/ConA ¹⁾	
Equine PBMC-1	negativ
Equine PBMC-2	
MfT-B-1	negativ
PDe-B-1	
Jurkat	
K-562	
Hep-2	

¹⁾ Die PBMC wurden vier Tage mit 5 µg/ml Concanavain A stimuliert. Die Bezeichnung der Zellen wird im Text erklärt.

Expression der Klasse-II-Antigene verstärken, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Abnahme positiver Zellen kann in der verstärkten Proliferation der für Klasse II negativen Zellen oder in einer abnehmenden Zytokinsekretion begründet sein. Somit werden bevorzugt die für Klasse II positiven, aber auch für Klasse II negativen Zellen von *Theileria annulata* transformiert, was SPOONER et al. ebenso beobachteten (15, 16, 17). Zu klären bleibt, um welche Subpopulationen es sich bei den für MHC-Klasse II positiven und negativen, theilerientransformierten, lymphoblastoiden Zellen handelt. Weitergehende, analytische Untersuchungen werden veröffentlicht werden, sobald sie abgeschlossen sind.

Intrazelluläre Immunfluoreszenz

Mit dem mAk BO-114 wurden bovine und equine ruhende sowie bovine, mitogenstimulierte PBMC in der indirekten intrazellulären und in der Membran-Immunfluoreszenz getestet (Tab. 2). Zusätzlich wurden sowohl theilerientransformierte (T. a.-BoLCL) als auch theilerienfreie, bovine (BL 3*: mit Leukosevirus transformierte BoLCL [10]) und humane, permanente Zelllinien untersucht (MfT-B-1, PDe-B-1: mit Epstein-Barr-Virus transformierte Lymphozyten gesunder Spender [8]; Jurkat: T-Lymphoblastoid-Zelllinie, die von einem Patienten mit akuter lymphatischer T- Zell-Leukämie spontan etabliert wurde [14]; K 562: myeloische Leukämie-Zelllinie [11]; Hep-2: Epidermoid-Larynxkarzinom-Zelllinie [12]).

Im Gegensatz zu den equinen PBMC ragierte der mAk Bo-114 mit bovinen Zellen. Während in ruhenden und mitogenstimulierten PBMC nur eine schwache Fluoreszenz zu beobachten war, die sich aber von der Negativkontrolle deutlich unterschied, wurde in allen theilerien- und virustransformierten BoLCL, aber nicht in den permanenten,

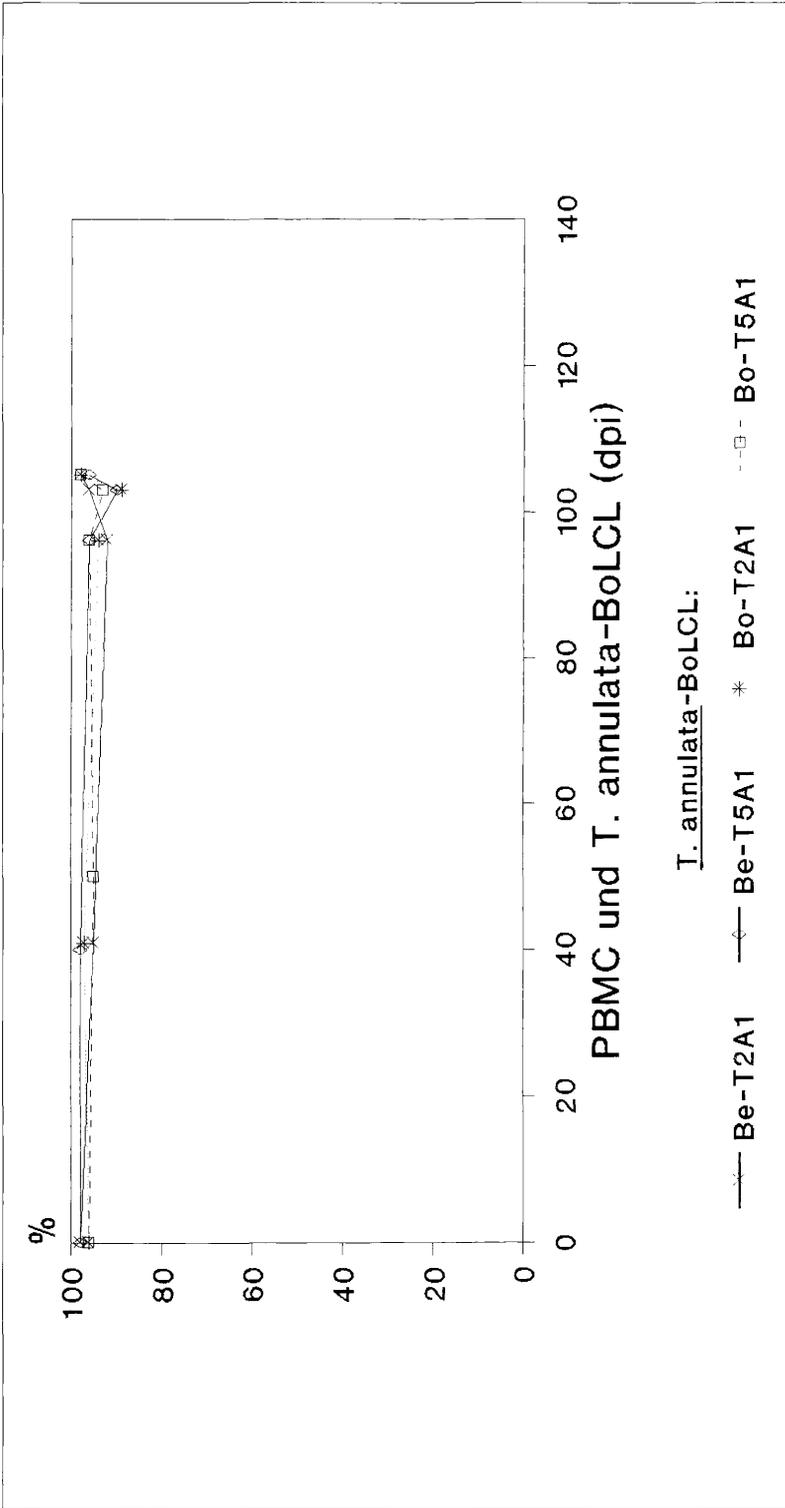


Abb. 1: Expressionskinetik der für BoLA-Klasse I positiven Zellen (monoklonaler Antikörper: H 58 A), mononukleären Blutlymphozyten (PBMC) verschiedener Rinder wurden mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper angefärbt (Nullpunkt der X-Achse) und anschließend auch als theilertransformierte, lymphoblastoide Zelllinien (*T. annulata*-BoLCL) während der Kultivierung (dpi) wiederholt untersucht. Der Anteil positiver Zellen ist auf der Y-Achse dargestellt (%).

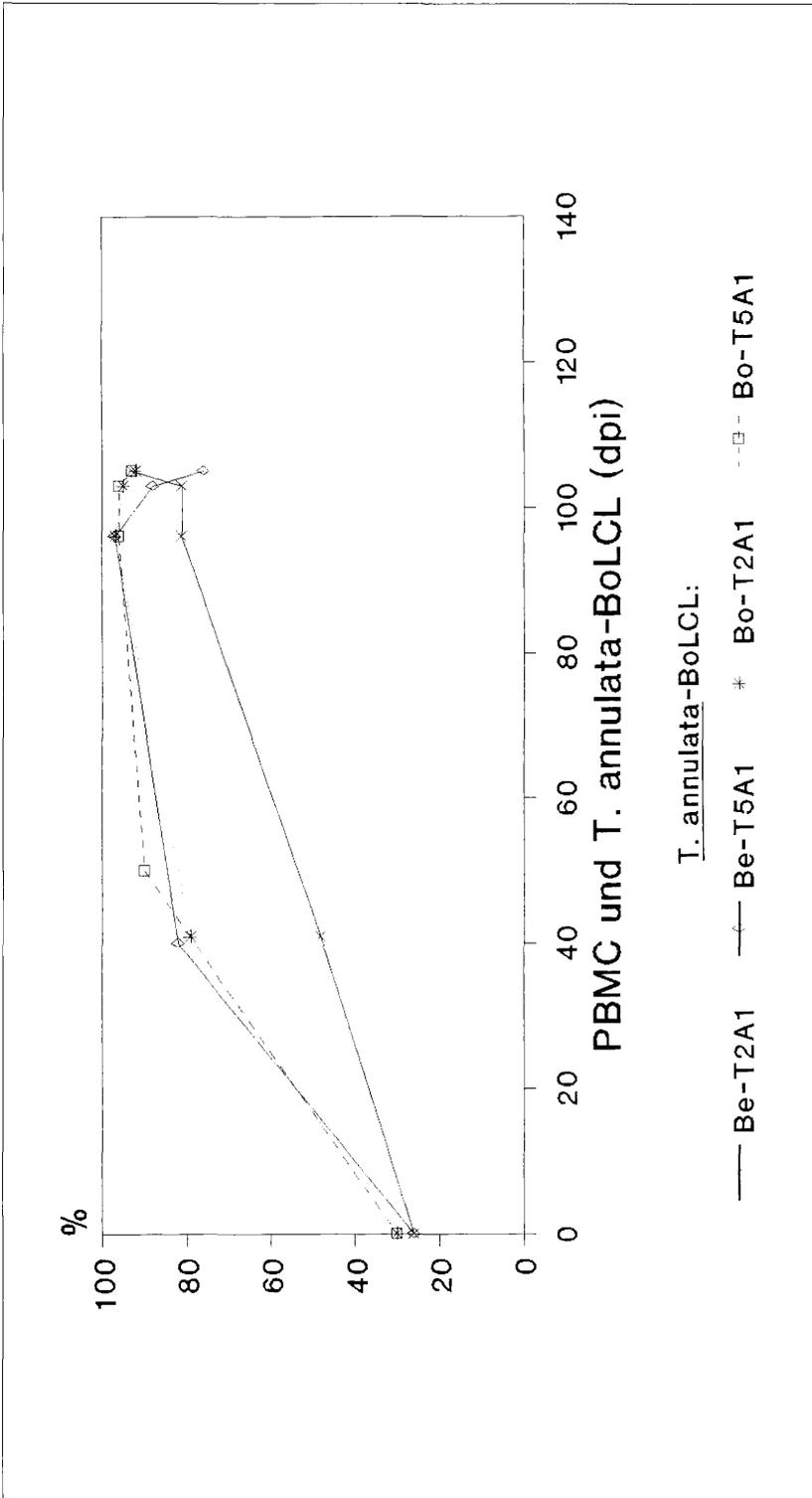


Abb. 2a:

Expressionskinetik der für BoLA-Klasse II positiven Zellen (monoklonaler Antikörper: TH 14 B). Erklärung siehe Abbildung 1.

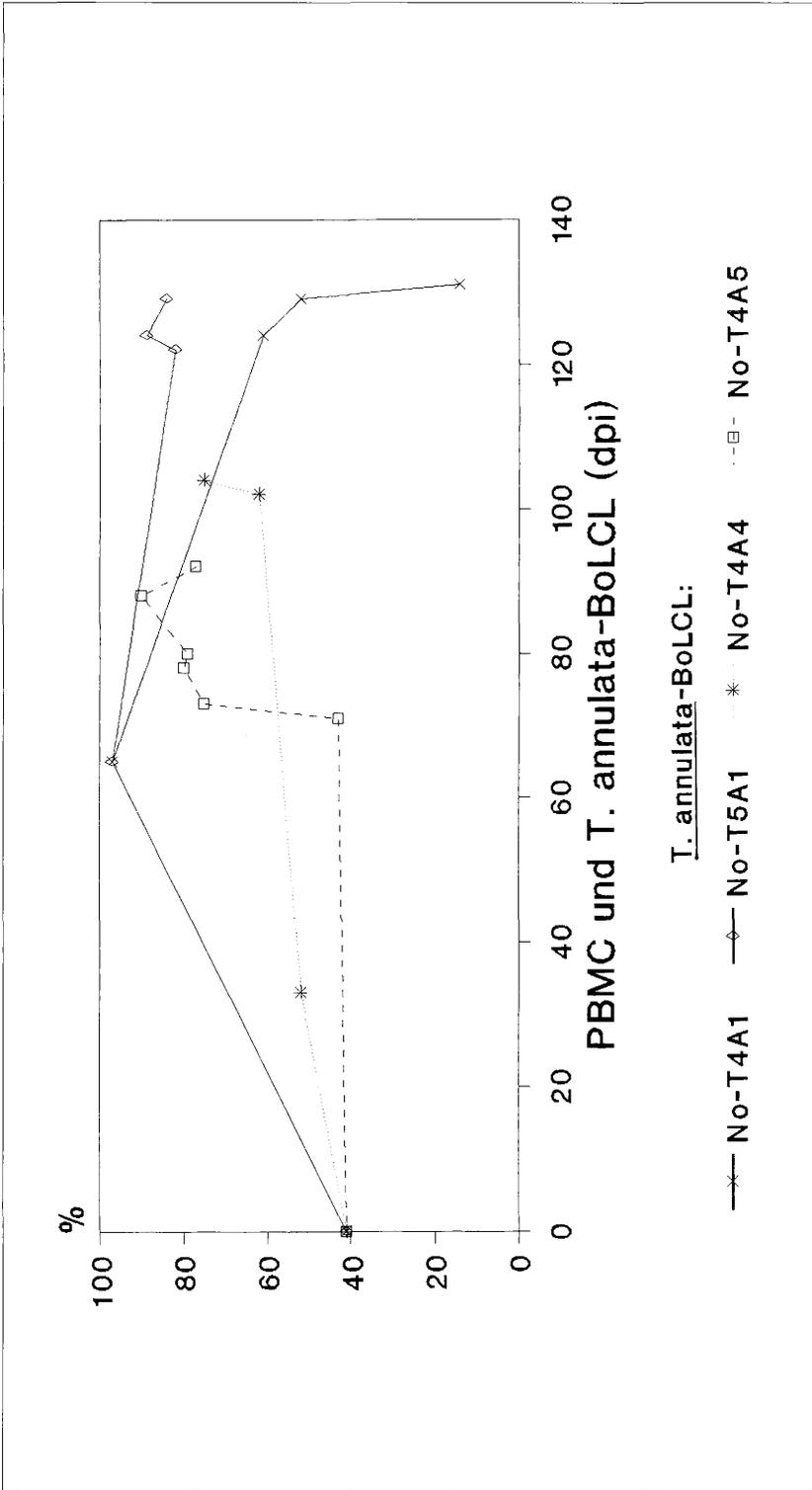


Abb. 2b:

Expressionskinetik der für BoLA-Klasse II positiven Zellen (monoklonaler Antikörper: TH 14 B). Erklärung siehe Abbildung 1.

humanen Zelllinien, eine intensive intrazelluläre Fluoreszenz nachgewiesen. Die Fluoreszenz war diffus und fein- oder grobschollig im Zytoplasma verteilt. Außerdem konnte kein Unterschied der Fluoreszenzintensität und des -musters festgestellt werden. Eine Membranfluoreszenz wurde mit dem mAk Bo-114 nicht beobachtet (FACS, Fluoreszenzmikroskop). Das ausschließlich im Zytoplasma der bovinen Zellen lokalisierte Antigen wurde bei allen theilerien- und virustransformierten BoLCL deutlich stärker exprimiert, als bei den mit Concanavalin A stimulierten PBMC-Blasten. Die Bedeutung dieses Antigens für die normale Zellteilung als auch für die Zelltransformation ist unklar. Der mit der Transformation verbundene Anstieg der Fluoreszenz läßt jedoch ein permanentes transformations-assoziiertes Antigen vermuten, dessen biochemische und funktionelle Charakterisierung noch aussteht. Für die Expression eines solchen Antigens sprechen die Untersuchungen von DYER u. TAIT (7), die eine Beeinflussung der Wirtszell-DNA durch *Theileria annulata* feststellen konnten. AHMED et al. beobachteten transformations-assoziierte morphologische und funktionelle Veränderungen der theilerientransformierten Zellen, auch nachdem die intrazellulären Schizonten mit Halofuginonsalzen aus den Lymphoblastoidzellen fast vollständig entfernt worden waren (3).

Zusammenfassung

Bei vergleichenden Untersuchungen von bovinen, peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mit durch *Theileria annulata* transformierten, lymphoblastoiden Zelllinien (BoLCL) konnte festgestellt werden, daß bovine Lymphozyten-Antigene (BoLA) der Klasse I konstant exprimiert werden. Der Anteil der für BoLA-Klasse II positiven BoLCL war im Vergleich zu den Ausgangszellen deutlich erhöht, variierte aber zwischen den permanenten Linien. Ein Grund dafür könnte sein, daß *Theileria annulata*-Sporoziten neben den für BoLA-Klasse II positiven auch die für BoLA-Klasse II negativen PBMC zu BoLA transformieren können. Zusätzlich wurde ein monoklonaler Antikörper Bo-114 entwickelt, der ein bovines, zytoplasmatisches Antigen erkennt, das nur schwach in ruhenden PBMC und in mit Concanavalin A induzierten Lymphoblasten, jedoch stark in mit *Theileria annulata* oder mit Leukosevirus transformierten BoLCL exprimiert wird.

Schlüsselwörter

Theileria annulata, zytoplasmatisches Antigen, BoLA, monoklonale Antikörper.

Summary

Characterization of *Theileria* sensitive subpopulations of bovine cells

In the present study bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and *Theileria annulata*-transformed lymphoblastoid cell lines (BoLCL) were compared for their expression of bovine lymphocyte antigens-(BoLA) class I and class II. While almost all PBMC and BoLCL cells expressed BoLA-class I consistently throughout the transformation the number of cells expressing BoLA-class II changed variably after transformation depending on the single BoLCL rather than on the donor. Transformation kinetic studies indicated that *Theileria annulata* sporozoites are capable of transforming BoLA class II-positive as well as -negative PBMC into BoLCL. Moreover, we have produced a monoclonal antibody Bo 114 recognizing a cytoplasmic antigen, which is hardly detectable in resting bovine PBMC and in Concanavalin A induced lymphoblasts, but strongly expressed in permanently transformed BoLCL by *Theileria annulata* or by leukemia virus.

Key words

Theileria annulata, cytoplasmic antigen, BoLA, monoclonal antibodies.

Literatur

1. AHMED, J. S. (1986):
Immunreaktionen gegen intra- (*Theileria annulata*) und extra- (*Trypanosoma* spp.) zelluläre Protozoen.
Habil. Schr. Fachber. Veterinärmed. Freie Univ., Berlin.
2. AHMED, J. S., REHBEIN, G., SCHEIN, E. (1984):
Characterization of *Theileria annulata* infected lymphoblastoid cells.
Z. Parasitenk. 70, 819-821.
3. AHMED, J. S., SANFT, S., LENDNER, G., SCHEIN, E. (1987):
Effect of chemotherapy on the biological functions of lymphoblastoid cells infected with *Theileria annulata*.
J. vet. Med. B 34, 465-470.
4. BOYUM, A. (1968):
Isolation of leucocytes from human blood. A two phase system for removal of red cells with methyl cellulose as erythrocyte-aggregating agent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, 4-29.
5. BROWN, C. G. D. (1987):
Theileriidae in:
TAYLOR, A. E. R., BAKER, J. R. (Hersg.): In vitro methods of parasite cultivation.
Academic Press, London, 230-253.
6. DAVIS, W. C., MARUSIC, S., LEWIN, H., SPLITTER, G. A., PERRYMAN, L. E., MC GUIRE, T. C., GORHAM, J. R. (1987):
The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leucocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species.
Vet. Immunol. Immunopath. 15, 337-376.
7. DYER, M., TAIT, A. (1987):
Control of lymphoproliferation by *Theileria annulata*.
Parasitol. Today 3, 309-311.
8. GATTI, R. A., LEIBOLD, W. (1979):
HLA-D typing with lymphoblastoid cell lines. IV. Allelic relationships.
Tissue Antigens 13, 35-44.
9. GREMMELS, H. -D. (1983):
In-vitro-Infektion von bovinen Lymphozyten mit *Theileria*-Sporozoitien.
Diplomarbeit, Univ. Hannover.
10. LEWIN, H. et al. (1989):
Publikation in Vorbereitung.
11. LOZZIO, C. B., LOZZIO, B. B. (1975):
Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosom.
Blood 45, 321-334.
12. MOORE, A. E., SABACHEWSKY, L., TOOLAN, H. W. (1955):
Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells.
Cancer Res. 15, 598-602.
13. SCHEIN, E., FRIEDHOFF, K. T. (1978):
Lichtmikroskopische Untersuchung über die Entwicklung von *Theileria annulata* (Dschunkowsky und Luhs, 1904) in Hämolymphe und Speicheldrüsen.
Z. Parasitenk. 56, 287-303.
14. SCHNEIDER, U., SCHWENK, H. -U., BORNKAMM, G. (1977):
Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.
Int. J. Cancer 19, 621-626.
15. SPOONER, R. L., BROWN, C. G. D. (1980):
Bovine lymphocyte antigens (BoLA) of bovine lymphocytes and derived lymphoblastoid lines transformed by *Theileria parva* and *Theileria annulata*.
Parasite Immunol. 2, 163-174.

16. SPOONER, R. L., INNES, A. A., GLASS, E. J., BROWN, C. G. D. (1989):
Theileria annulata and T. parva infect and transform different bovine mononuclear cells.
Immunol. 66, 284-288.
17. SPOONER, R. L., INNES, A. A., GLASS, E. J., MILLAR, P., BROWN, C. G. D. (1988):
Bovine mononuclear cell lines transformed by Theileria parva or Theileria annulata express different subpopulation markers.
Parasite Immunol. 10, 619-629.
18. WEBER, G., WALTER, W. (1982):
A note on the production of unfed nymphs of the tick Hyalomma anatolicum anatolicum for experimental use.
Ann. Trop. Med. Parasit. 76, 583-584.

KORRESPONDENZADRESSEN:

D. E. Rebeski
Institut für Parasitologie, Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 17
D-3000 Hannover · Bundesrepublik Deutschland

Pro. Dr. W. Leibold
Arbeitsgruppe für Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
D-3000 Hannover · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: [12](#)

Autor(en)/Author(s): Rebeski D. E., Friedhoff K. T., Hadam M., Schuberth H.-J., Leibold W.

Artikel/Article: [Charakterisierung theilerienempfindlicher Subpopulationen von Rinderzellen. 121-130](#)