

Die Fähigkeit der Sporozoiten von *Theileria annulata* (Apicomplexa, Piroplasmida), ihre Wirtszelle permanent zu transformieren, ist eine prinzipiell neue Möglichkeit, periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMC) von gesunden Rindern *in vitro* zu unbegrenzt proliferierenden, bovinen lymphoblastoide Zelllinien (BoLCL) zu transformieren, ohne Parasiten-DNA in das zelluläre Genom zu integrieren. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Sporozoiten von *T. annulata*, Stamm Ankara, unterschiedliche Subpopulationen mononukleärer Zellen eines Spenders permanent transformieren können.

Bei der Herstellung von sterilen Sporozoitenpräparationen wurde erstmals versucht, Kriterien für die *in vitro*-Infektiosität der Sporozoiten zu ermitteln. Zudem wurden Faktoren untersucht, die eine Zelltransformation durch *T. annulata*-Sporozoiten *in vitro* beeinflussen. Der alleinige Nachweis von Sporozoiten und Sporonten in den *Acini* frischer Speicheldrüsen der Überträgerzecke *Hyalomma anatolicum excavatum* war kein ausreichendes Bewertungskriterium für die *in vitro*-Infektiosität von kryokonservierten Sporozoiten (Sporozoitenstabilat). Für die Entwicklung der Zecken und die *in vitro*-Infektiosität des Sporozoitenstabilats war während der Zeckeninfestation eine Parasitämie am Wirtsrind zwischen 1 - 7 % besonders günstig. Die Sporozoitenqualität bei dieser Parasitämie (1 - 7 %) unterschied sich *in vitro* deutlich von der Sporozoitenqualität bei niedrigerer (≤ 1 %) oder höherer Parasitämie (≥ 10 %). Demnach scheint eine qualitative Beurteilung der *in vitro*-Infektiosität des Sporozoitenstabilats schon während des Zeckenbefalls am theilerieninfizierten Wirtstier möglich zu sein. Die Zelltransformation wurde nicht nur von der Qualität des Sporozoitenstabilats, sondern auch vom Spendertier, dem Serum im Zellkulturmedium und der Art des Zellkulturgefäßes entscheidend beeinflusst. So waren die PBMC eines Rindes im Vergleich zu denen anderer Spender unter identischen Bedingungen schwieriger zu transformieren. Der Ersatz fetalen Kälberserums durch bovines Serumersatz (Serum Plus^R) führte zu stark vermindertem Transformationserfolg. *In vitro*-Transformationen waren in Zellkulturflaschen zuverlässiger durchzuführen als in Rundboden-Mikrotiterplatten mit 96 wells.

Die phänotypische Charakterisierung theilerientransformierter Subpopulationen boviner PBMC zeigte, daß *T. annulata*-Sporozoiten weder reife T-Lymphozyten noch reife B-Lymphozyten, jedoch überwiegend monozytäre Zellen zu permanenten BoLCL transformieren. Dafür spricht nicht nur das Spektrum gegen Oberflächenstrukturen positiv und negativ reagierender, monoklonaler Antikörper (mAk), sondern auch die Transformation hochreiner, adhärenter Zellen nach ≥ 80 Tagen Vorinkubation *in vitro*. Die unterschiedliche Expression von Determinanten der BoLA-Klasse II und BoCD2 Antigen deuten darauf hin, daß sehr wahrscheinlich keine einheitliche Population, sondern Subpopulationen oder verschiedene Differenzierungsstadien

monozytärer Zellen zu BoLCL transformiert werden. Weder an Hand der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), noch mittels eines mAk (Bo-114), der bovine, intrazytoplasmatische Moleküle insbesondere in transformierten Zellen erkennt, war eine weitergehende Differenzierung transformierter Zellen möglich. Somit sprechen die Untersuchungen dafür, daß *T. annulata*-Sporozoiten von den aus dem Blut gesunder Rinder isolierten, lymphoiden Zellen bevorzugt monozytäre Zellen zu BoLCL transformieren, die unterschiedlichen Subpopulationen oder unterschiedlichen Differenzierungsstadien angehören. Diese Untersuchungen schließen nicht aus, daß auch frühe Differenzierungsstadien von T-Lymphozyten durch *T. annulata* permanent transformiert werden können.

D.E. Rebeski: Characterization of *Theileria annulata*-transformed subpopulations of bovine lymphoid cells

The ability of sporozoites of *Theileria annulata* (Apicomplexa, Piroplasmida) to transform normal bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) into lymphoblastoid cell lines (BoLCL) *in vitro* is a unique transformation method inasmuch as it does not integrate parasite DNA into the cellular genome. The objective of this thesis was to investigate, whether different subpopulations of bovine PBMC derived from the same donor animal could be transformed by sporozoites of *T. annulata* Ankara strain.

It was attempted to establish criteria for *in vitro* infectivity of sporozoites as well as criteria influencing the transformation process *in vitro*. The presence of sporozoites and sporonts in acini of freshly dissected salivary glands of the vector tick *Hyalomma anatolicum excavatum* was not sufficient as a sole criterium for the *in vitro* infectivity of cryopreserved sporozoites (sporozoites stabilate). During tick infestation cattle parasitaemia of 1 - 7 % was superior to that of below 1 % as well as of above 10 % regarding the infectivity of sporozoites stabilate. Thus, the *in vitro* infectivity of sporozoites stabilate might already be predictable at the stage of tick infestation. In addition to the infectivity of sporozoites stabilate cell transformation depended on the donor animal for PBMC, the type of serum used to supplement the culture medium and the type of culture vessels used. Bovine PBMC of one donor were more difficult to transform than PBMC of two other cattle under identical conditions. Transformation rate was greatly reduced when fetal calf serum in the culture medium was replaced by a synthetic serum supplement (Serum Plus^R). For successful transformation tissue culture flasks were more suitable than 96 well round bottomed microtitre plates.

Phenotypical characterization of *Theileria*-transformed cells with a panel of monoclonal antibodies with specificity for various cell surface determinants indicated that *T. annulata* sporozoites seem to transform neither mature T-cells nor B-cells but predominantly monocytic cells to permanently proliferating BoLCL. This is supported by the immortalization of a highly purified population of adherent cells after ≥ 80 days of preincubation *in vitro*. The differential expression of BoLA class II and BoCD2 antigens argued for the transformation of different subsets or differentiation stages of monocytic cells rather than for an immortalization of a single population. Neither the release of reactive oxygen species (ROS) nor a mAb Bo-114 with specificity for bovine intracytoplasmic molecules provided further differences among BoLCL. Thus, *T. annulata* sporozoites prefer to immortalize preferentially bovine peripheral blood monocytic cells of different subsets. On the other hand it can not entirely be excluded that precursor T-cells might become transformed as well.