



Cedars-Sinai Medical Center

&

RECOOP HST Consortium

Recognizes the Participation of

Zoltan Pethoe

And Awards Certificate of Appreciation
for the Outstanding Scientific Contribution to the Bridges in Life Sciences
Fifth Annual Meeting
April 9 - 11, 2010, Lviv, Ukraine

Edward M. Prunchunas
Senior Vice President, Finance & CFO
Cedars-Sinai Medical Center
Chairman of the Governing Council of
the RECOOP HST Consortium



Calvin Hobel, M.D.
Professor, Obstetrics/Gynecology
Cedars-Sinai Medical Center
Chairman of the Advisory Board of
the RECOOP HST Consortium

K⁺ current expression and proliferation of human T-lymphocytes induced by various stimuli

Pethoe Zoltan Denes, Balajthy Andras

Department of Biophysics and Cell Biology, Debrecen Medical and Health Science Centre,
University of Debrecen
98, Nagyerdei krt., Debrecen, Hungary, H-4012

pethozo@freemail.hu

Ion currents of human T-lymphocytes and specifically Kv1.3 potassium channel currents are crucially important for the triggering of an immune response. Resting T cells also express this channel, but as a result of stimulation (e.g. an immune reaction), the expression of the channel increases. In contrast to the *in vivo* activation of T cells, where the interaction with specialized antigen presenting cells triggers T cell proliferation, *in vitro* stimulation of the cells uses molecules that can act on specific signal pathways. Our aim was to investigate whether Kv1.3 channel expression in T-cells depends on the nature of the signaling pathway activated *in vitro*.

We used healthy human peripheral blood T-cells in our experiments. We monitored the division of the cells in a flow cytometer using CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) dilution assay. The cells were stimulated with a mitogenic lectin (phytohaemagglutinin: PHA); a combination of a diacylglycerol analog (phorbol 12-myristate 13-acetate: PMA) and a calcium ionophore (ionomycin); furthermore with antibodies affecting the TCR-CD3 complex (anti-CD3 by itself; anti-CD3 and anti-CD28 used in combination). Five days after application of the stimulus we measured the proportion of dividing cells, change in cell size and cellular granulation. Subsequently we measured the Kv1.3 ion currents through the T-cell membrane as well as biophysical parameters of this channel (e.g. activation and inactivation kinetics and voltage dependence of conductance), using the whole-cell patch-clamp technique.

Our flow cytometric measurements indicated that as the cells divided, cell size and amount of granulation increased after all treatments. Our patch-clamp experiments showed that there are significant changes in Kv1.3 ion currents at +50 mV depolarization after both PHA and anti-CD3+anti-CD28 stimulation. Inactivation kinetics changed only as a result of anti-CD3+anti-CD28, which could be a sign of posttranslational modulation of the channel. Similarly, increase in the current density was only significant in case of anti-CD3+anti-CD28 treatment. We can conclude that for measurement of Kv1.3 currents (e.g. for ion channel pharmacology), PHA treatment is sufficient but for the simulation of *in vivo* T-cell activation the most effective method is stimulation with anti-CD3+anti-CD28.

Proliferáció és ionáram- változás T-limfocitákon különböző mitogén-stimulusok hatására

Az emberi perifériás T-limfociták ionáramai és ezen belül legfőképpen a Kv1.3 K⁺ áramok kritikus fontossággal bírnak az immunválasz létrejötte szempontjából. A nyugodt T-sejtek is kifejezik ezt az ioncsatornát, de stimulus (pl.: immunreakció) hatására a csatornaexpresszió sokszorosára fokozódik. Az elektrofiziológiai és sejtbiológiai kísérletekben stimulációhoz nem patogéneket, hanem általában egy adott szignálútvonalon ható anyagot használunk fel. Vizsgálatainkban azt vizsgáltuk meg, hogy a szignál minőségétől (pl. PKC útvonal, Ras/Rac útvonal, Ca²⁺ koncentráció változás) függ-e, és ha igen, akkor milyen mértékben, a sejteken a Kv1.3 expresszió.

A vizsgálatokhoz humán perifériás vér limfocitákat, vagyis PBMC-ket használtunk fel. A sejtek osztódását CFSE- hígítási esszével áramlási citométeren követtük. A sejteket diacilglicerol analóggal (forbol 12-mirisztát 13-acetát: PMA) és Ca²⁺-ionofór kombinációjával (ionomycin; mitogén lektinnel (fitohemagglutinin: PHA); továbbá TCR-CD3 komplexen keresztül ható antitestekkel (anti-CD3 magában; anti-CD3+ anti-CD28 együtt) stimuláltuk. Ezt követően az 5. napon áramlási citométerrel megmértük a sejtosztódás mértékét és a sejtek felépítésének változását, majd patch-clamp technikával teljes-sejt konfigurációban a T-sejtek membránján átfolyó Kv1.3 ionáramokat.

Áramlási citométeren vizsgálva a PHA-val kezelt sejtek osztódtak, sejtméretük a kontroll 1,6 - 1,9x-esére nőtt meg, komplexitásuk szintén szignifikánsan megnőtt. Az egy sejten mérhető maximális ionáram patch-clamp technikával mérve +50 mV depolarizációnál 1 nA-tól 4 nA-ig terjedt, ami a kontrollokon mért 200 - 600 pA-es áram sokszorososa. Az anti-CD3, valamint az anti-CD3+anti-CD28 kezelés kifejezettebb osztódást okozott, de ionáramokat itt csak a 800 pA - 2 nA nagyságrendben mértünk. A PMA+ionomycin kezelésekkor a sejtek szintén stimulálódtak, ekkor a mért áram 700 pA - 1,6 nA volt. Konklúzióként levonható, hogy a humán T-sejteken a Kv1.3 expresszió szempontjából a PHA kezelés bizonyult a leghatásosabbnak.