



T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FİTOHEMAGLUTİNİN VE ANTİ-CD3&ANTİ-CD28 TABANLI
CD19 SPESİFİK CAR-T HÜCRE ÜRETİMLERİNİN IN VİTRO VE
IN VİVO ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BERRANUR SERT

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Cihan TAŞTAN**

İSTANBUL-2024

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİTOHEMAGLUTİNİN VE ANTİ-CD3&ANTİ-CD28 TABANLI
CD19 SPESİFİK CAR-T HÜCRE ÜRETİMLERİNİN IN VİTRO VE
IN VİVO ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BERRANUR SERT

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Cihan TAŞTAN

İSTANBUL-2024

ÖZET

FİTOHEMAGLUTİNİN VE ANTİ-CD3&ANTİ-CD28 TABANLI CD19 SPESİFİK CAR-T HÜCRE ÜRETİMLERİNİN IN VİTRO VE IN VİVO ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kanser, dünya genelinde ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir ve 2020 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) yaptığı çalışmada kanserle ilgili yaklaşık 10 milyon ölüm rapor edilmiştir. Mevcut kemoterapi ve radyasyon gibi geleneksel kanser tedavileri etkili olsa da sağlıklı hücrelere zarar vermekte ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Son yıllarda lösemi/lenfoma kanseri olan hastalara umut sağlayan önemli gelişmelerden biri ise, süregelen bu geleneksel yöntemlerin aksine kanserin tedavisi için hastanın kendi vücudundan veya bir donörden alınan hücrelerin kullanımını içermektedir. Kimerik Antijen Reseptör T (CAR-T) hücre terapisi, kanser tedavisi için yenilikçi bir immünoterapötik yaklaşım olarak büyük bir umut vaat etmektedir. CAR-T hücre tedavisi, T hücrelerini genetik mühendislik yoluyla kanser hücrelerinin yüzeyindeki belirli antijenleri tanıyan ve bağlanan CAR'ları ifade etmelerini içeren bir tür immünoterapidir. Literatür çalışmaları, merkezi bellek T hücreleri (TCM) ve kök hücre benzeri bellek T hücreleri (TSCM) oranlarının CAR-T hücre popülasyonu içinde yüksek olmasının immünoterapinin etkinliği için önemli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, CAR-T hücrelerinin uzun süreli ve sitotoksik (anti-tümör) etkili kalabilmesini sağlamak amacıyla CAR eksprese eden TCM ve TSCM hücre popülasyonlarının arttırılması hedeflenmektedir. Söz konusu tezdeki amaç ise CD19 spesifik CAR-T hücrelerini aktiveleştirme yönteminde, Fitohemaglutinin (PHA) veya anti-CD3&anti-CD28, yapılacak değişikliklerle uzun süreli stabil ve sitotoksik etkin CAR-T hücre üretim yöntemi geliştirilmesidir. T hücrelerinin zarlarına bağlanan ve metabolik aktiviteyi artıran PHA kullanılarak üretilen CAR-T hücrelerinin stabilitesi ve etkinliğinin, anti-CD3/anti-CD28 ile çoğaltılan CAR-T hücreleri ile kıyaslanması hedeflenmiştir. Bu tez kapsamında, CD19+ Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'ye karşı geliştirilen CAR-T hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* modelde etkinlik ve stabilitesi değerlendirilerek *in vivo* kanserli hayvan modelinde sağkalım süresini uzatmak ve kanser relaps olasılığını azaltmak hedeflenmektedir.

Tez kapsamında elde edilen bulgular, CAR-T hücre üretiminde PHA'nın geleneksel yöntemle kıyasla bir kostimülasyon yöntemi olarak kullanılmasının potansiyel faydalarını vurgulayarak, bu yöntemin CAR-T hücrelerinin stabilite ve kalıcılığını artırmak için umut vaat eden bir strateji sunabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, kanser tedavisi için daha etkili ve kalıcı immünoterapötik yaklaşımların geliştirilmesine dair değerli öngörüler sunmaktadır. PHA ile aktive edilen CAR-T hücreleri, klinik uygulamalarda kanser immünoterapisini ilerletmek için etkileyici bir terapötik seçenek sunabilir.

Anahtar Kelimeler: Fitohemaglutinin (PHA), İmmünoterapi, Kimerik Antijen Reseptörü, CAR-T



ABSTRACT

INVESTIGATION OF IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF PHYTOHEMAGGLUTININ AND ANTI-CD3&ANTI-CD28 BASED CD19 SPECIFIC CAR-T CELL PRODUCTION

Cancer, being one of the leading causes of mortality worldwide, accounted for approximately 10 million deaths according to a study conducted by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in 2020. While conventional cancer treatments such as chemotherapy and radiation are effective, they often result in damage to healthy cells and entail significant side effects. In recent years, a significant development offering hope to patients with leukemia/lymphoma cancer is the utilization of cells sourced either from the patient's own body or from a donor, in contrast to the ongoing conventional methods. Chimeric Antigen Receptor T (CAR-T) cell therapy presents a promising innovative immunotherapeutic approach for cancer treatment. CAR-T cell therapy involves the genetic engineering of T cells to express chimeric antigen receptors (CARs) capable of recognizing and binding specific antigens on the surface of cancer cells. Literature studies indicate that high levels of central memory T cells (TCM) and stem cell-like memory T cells (TSCM) within the CAR-T cell population are crucial for the effectiveness of immunotherapy. Therefore, the aim is to increase the populations of CAR-expressing TCM and TSCM cells to ensure the long-term cytotoxic (anti-tumor) efficacy of CAR-T cells. The objective of the present thesis is to develop a method for producing CAR-T cells targeting CD19 with modifications in the activation method, either using Phytohemagglutinin (PHA) or anti-CD3&anti-CD28, to achieve a long-lasting stable and cytotoxic CAR-T cell production. The stability and effectiveness of CAR-T cells produced using PHA, which binds to the membranes of T cells and enhances metabolic activity, will be compared with CAR-T cells amplified using anti-CD3/anti-CD28. Within the scope of this thesis, the effectiveness and stability of CAR-T cells developed against CD19+ Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) will be evaluated *in vitro* and *in vivo* models, with the aim of extending survival time in an *in vivo* cancer animal model and reducing the likelihood of cancer relapse.

The findings obtained within the scope of this thesis emphasize the potential benefits of using PHA as a co-stimulation method compared to the traditional approach in activating CD19-specific CAR-T cells, suggesting that this method could offer a promising strategy to enhance the stability and persistence of CAR-T cells. These results provide valuable insights into the development of more effective and durable immunotherapeutic approaches for cancer treatment. PHA-activated CAR-T cells may offer an impressive therapeutic option to advance cancer immunotherapy in clinical applications.

Keywords: Phytohemagglutinin (PHA), Immunotherapy, Chimeric Antigen Receptor, CAR-T

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim ve beraber geçirdiğimiz zaman boyunca desteğini hissettiğim, birlikte nice projelerde çalışma şansı bulduğum, sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Cihan TAŞTAN'a,

Hayatım boyunca her anımda yanımda olup, sonucu ne olursa olsun her zaman beni sonuna kadar destekleyen; mutlu, stresli, heyecanlı tüm duygularıma ortak olan ve her aşamada beni motive edip cesaretlendiren sevgili ailem; annem Selvi SERT, babam Abdulkerim SERT, kardeşlerim Mahmut Sami SERT, Ahmet Emin SERT ve Esmanur SERT'e,

Bunun yanı sıra yüksek lisans eğitimimin bana kazandırdığı, ekip arkadaşlığının yanı sıra aile ortamı hissettiren, gece gündüz beraber çalışıp nice başarılarla ulaştığımız, desteklerini her zaman hissettiren değerli dostlarım ve meslektaşlarım; sevgili laboratuvar sorumlusu labmate'im ve ekip arkadaşım Gamze GÜLDEN'e, sevgili ekip arkadaşlarım Yasin AY, Tarık TEYMUR'a, sevgili arkadaşlarım Fatmanur ERKEK, Nilüfer Neslihan TİRYAKİ ve 2023 yılının benim için en anlamlı hediyesi, hayatımdaki anlamı çok büyük olan sevgili ENES BAL'a,

Laboratuvarımızın kurulmasından geçen 3 yılda nice başarılarla ve arkadaşlıklara kucak açan TRGENMER ailesine, bununla birlikte desteklerini esirgemeyen kardeş laboratuvar olan ÜSKÖKMER'e,

Başarılarını ve duruşunu hep örnek aldığım canım mentörüm, sevgili hocam Nesibe Gül ASLIER'e, lisans eğitimimden beri motivasyon desteğini esirgemeyen sevgili hocam Büşra YUSUFOĞLU'na, hayvan çalışmasında bilgi ve birikimleriyle destek olan değerli hocam Raife Dilek TURAN'a,

Yüksek lisans hayatımda gerçekleştirdiğim çalışmalarda Yenilikçi İlaç Geliştirme Stratejik Ar-Ge Proje çağrısı kapsamında bizlere proje desteği sağlayan TÜSEB kurumuna ve yüksek lisans eğitimim boyunca TÜBİTAK 2210-A bursuyla akademik yaşamıma destek veren TÜBİTAK kurumu ve Türkiye Cumhuriyeti Devleti'ne sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezimi hayatımdaki en güzel neşelerden biri olan sevgili anneannem *Zeynep Işıldak*'a ithaf etmekten gurur duyuyor, yaptığımız çalışmaların kanseri yenme yolundaki yapılardan biri olmasını temenni ediyorum.

BEYAN FORMU

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tarafımdan üretildiğini ve Üsküdar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim

25.01.2024

Berranur SERT

İmzası

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
BEYAN FORMU	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Bağışıklık Sistemi ve İmmünite.....	4
2.2. T Hücreleri.....	4
2.3.T Hücre Farklılaşması ve Alt Tipleri.....	6
2.3.1.Naif T Hücreleri (Naive T Cell; TN).....	8
2.3.2.Kök Hücre Bellek T Hücreleri (Stem Cell like Memory T Cell; TSCM)	11
2.3.3. Merkezi Bellek T Hücreleri (Central Memory T Cells; TCM)	12
2.3.4. Efektör Bellek T Hücreleri (Effector Memory T Cells; TEM).....	12
2.3.5. Terminal Efektör T Hücreleri (Effector T Cells ;TEFF)	12
2.3.6. Tükenmiş T Hücreleri (Exhausted T Cells)	13
2.4. Hafıza T Hücreleri	13
2.4.1. Hafıza T hücrelerinin Oluşumu	13
2.4.2. Hafıza T Hücre Özellikleri ve Fenotipleri	15
2.4.3. Bellek T Hücrelerinin Tümörlere Karşı Etkinliği.....	16
2.5. T hücrelerinin Anti-Tümör Özellikleri	17
2.5.1. CD4+ T Hücrelerinin Kanser İmmünoterapisindeki Rolü.....	18

2.5.2. Kanser immünoterapisinde CD8+ sitotoksik T lenfositleri	19
2.6. T Hücre Aktivasyonu.....	19
2.6.1. TCR ve Ligandları	20
2.6.2. T Hücre Aktivasyon Reaktifleri.....	23
2.6.2.1. Anti-CD3&anti-CD28 ile Aktivasyon	24
2.6.2.2. Phytohemagglutinin (PHA) ile Aktivasyon.....	25
2.7. Kanser ve CAR-T Hücre Tedavisi.....	26
2.7.1. Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) ve CAR-T Hücresi.....	27
2.7.1.1. Major histokompatibilite kompleksi (MHC) bağımsızlığı	28
2.7.1.2. CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin CAR TCR'ye yönlendirilmesi.....	29
2.7.1.3. Canlı ilaçlar.....	29
2.7.1.4. Özgüllük.....	29
2.7.2. CAR Yapısı.....	29
2.7.2.1. Ligand bağlama bölgesi	32
2.7.2.2. Spacer Bölgesi	33
2.7.2.3. Transmembran Bölgesi	34
2.7.2.4. Hücre İçi Sinyalizasyon Alanları.....	35
2.7.3. TCR Ve Kimerik Antijen Reseptör (CAR) Aktivasyonu Ve Yakın Sinyal İletimi (Proximal Signaling).....	37
2.8. Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) T Hücrelerinin Öldürme Mekanizmaları	39
2.8.1. Fas/Fas Ligand (FasL) Yolağı ve CAR-T Ölüm Mekanizması	43
2.9. CAR Nesilleri ve Gelişimi	44
2.9.1. Birinci Nesil	44
2.9.2. İkinci Nesil.....	45
2.9.3. Üçüncü Nesil.....	46
2.9.4. Dördüncü Nesil	46
2.9.5. Beşinci Nesil	46

2.10. Mevcut CAR-T Hücre Tedavileri	47
2.11. CAR-T Hücre Tedavisinin Dezavantaj ve Yan etkileri	48
2.12. CAR-T Hücrelerinin Yorulması	50
2.13. T hücrelerinin Yorulması.....	50
2.13.1. PD-1 Yorgunluk Belirteci	52
2.13.2. LAG-3 Yorgunluk Belirteci.....	53
2.13.3. TIM-3 Yorgunluk Biyobelirteci.....	53
2.14. Kanser Araştırmalarında Kemirgen Modelleri	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	56
3.1. Araştırmanın Tipi.....	56
3.2. Araştırmanın Modeli.....	56
3.3. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	56
3.4. Araştırmanın Evren ve Örneklemi	56
3.4.1. Lentiviral Vektörlerin ve CD19'a Özel CAR Gen Dizisinin (CD19-CD8-CD28-CD3z) Sentezi ve Transformasyonu	56
3.4.2. Plasmid DNA Üretimi ve Agaroz Jel Elektrophorezi	58
3.4.3. Transfeksiyon ve Lentivirüs Üretimi	58
3.4.4. Lentivirüs Titrasyonu (Enfeksiyon Birimi; IFU/ml)	61
3.4.5. QuickTiter™ Lentivirüs Titre Testi p24 ELISA Testi	62
3.4.6. HEK 293 Host Cell Proteins (HCP) Assay.....	65
3.4.7. T Cell Transdüksiyonu and CAR-T Kültür Koşulları	65
3.4.8. T Hücre Alt-Popülasyonlarının Analizi ve Yorulma Profili.....	67
3.4.8.1. Antikor Boyama.....	67
3.4.8.2. T Hücre Alt-Popülasyon Analizi	68
3.4.8.3. T Hücrelerinin Yorulma Profili Analizi.....	68
3.4.9. İn Vitro Anti-Tümör Sitotoksosite ve Etkinlik Deneyi	68
3.4.10. In Vivo Metotlar	69

3.4.10.1. ALL <i>In Vivo</i> Fare Modelinde Anti-Tümör Oluşumu.....	69
3.4.10.2. ALL Fare Modelinde CAR-T Hücre Uygulaması	70
3.4.12. ALL Modeli Farelerde Biyokimyasal Analizler	71
3.4.13. Genomik DNA İzolasyonu	71
3.4.14. HIV-1 Real-Time PCR Testi	72
3.4.15. İstatistiksel Analiz.....	73
4. BULGULAR.....	74
4.1. Virüs Üretimi İçin Gerekli Olan CAR, VSV-G, psPAX2 Plazmidlerinin Transformasyon ve Plazmid DNA İzolasyonu ve Kalite Kontrolleri.....	74
4.2. CAR1928 Lentivirüslerinin Üretilmesi, Titrasyon ve Kalite Kontrol Testleri.....	75
4.3. CAR-T Hücre Üretimi, Proliferasyonu, Farklılaşma ve Anti-kanser Kapasitesinin <i>In Vitro</i> Değerlendirmesi.....	77
4.3.1. T hücre Aktivasyonu ve CAR-T Hücre Üretimi.....	78
4.3.2. Aktive Edilmiş T Hücresinin İmmün Profil Oluşturan Alt Popülasyonları (TN- TCM-TEM-TEF)	82
4.3.3. PHA veya aCD3/aCD28 ile Aktive Edilmiş CAR-T Hücrelerinin Sitotoksik Aktivitesi.....	96
4.4. ALL Modeli Farelerde <i>In Vivo</i> Yaklaşımlar	100
5. TARTIŞMA.....	111
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	117
KAYNAKLAR	118
EKLER	155
Ek 1.	155
Ek 2. Özgeçmiş	157

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. T hücresi naif fenotip ile ilişkili yüzey belirteçleri.....	9
Tablo 2. Plasmid DNA Kalite Kontrol Kriterleri (Taştan vd., 2020)	58
Tablo 3. Lentivirüs Kalite Kontrol Kabul Kriterleri (Taştan vd., 2020).....	61
Tablo 4. HIV-1 Real-Time PCR döngü ve sıcaklık bilgileri.	72



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. T hücre alt tipleri..	7
Şekil 2. Hafıza Hücrelerinin Oluşumu.....	14
Şekil 3. T hücre aktivasyon sinyalleri (Sinyal 1-2-3).	23
Şekil 4. CAR-T hücre üretimi ve uygulama süreci.....	27
Şekil 5. Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) molekülü yapısı	31
Şekil 6. TCR'lerin ve CAR'ların yapısal olarak kıyaslanması.	38
Şekil 7. CAR-T Hücresi Aktivasyonu.	40
Şekil 8. Doğal ve CAR T hücre öldürme mekanizmaları.	42
Şekil 9. FDA onaylı CAR-T hücre tedavileri.	48
Şekil 10. T hücresi tükenmesinin belirteçleri.	51
Şekil 11. CAR gene dizaynı ve bileşenleri.	57
Şekil 12. Transfeksiyon deney basamakları.	60
Şekil 13. Virüs titrasyon deney seti.	62
Şekil 14. QuickTiter™ Lentivirüs Titre Testi p24 ELISA Testi.	64
Şekil 15. Kandan PBMC izolasyonu ve CD3+T Hücre İzolasyonu	67
Şekil 16. T hücre alt-popülasyon, yorulma biyobelirteçleri ile Antikor boyama ve anti-kanser etkinlik sonrası kullanılan kanser paneli biyobelirteçleri.....	69
Şekil 17. <i>In vivo</i> enjeksiyon uygulama planı.	70
Şekil 18. CMV-VSV-G, psPAX2 ve CAR1928 plazmidlerinin plazmid DNA izolasyonu işleminden sonra kalite kontrollerinin gerçekleştirilmesi.....	75
Şekil 19. CAR ve GFP plazmidlerinin HEK293T hücreleriyle yapılan transfeksiyon sonucu 10X faz ve floresan görüntüleri.	76
Şekil 20. CAR1928 CAR konstraktıyla yapılan titrasyon sonuçları.	77
Şekil 21. CAR-T hücreleri içerisinde TCM ve TSCM alt popülasyonunu arttırmak amacıyla, hücreleri aktive etme yönteminde (PHA/ anti-CD3&anti-CD28) yapılacak değişikliklerle uzun süreli stabil ve sitotoksik etkin CAR-T hücre üretim planı.....	77
Şekil 22. PHA ve anti-D3/anti-CD28 ile aktive edilen CD3+T hücrelerinin, aktivasyon sonrası 2.günde inverted mikroskop altında çekilen 10X görüntüleri.	78
Şekil 23. Anti- CD3&Anti-CD28 veya PHA ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin 7. ve 14. gün inverted Mikroskop altındaki 10X hücre Görüntüleri.	79

Şekil 24. CD28 tabanlı CAR yapısına sahip CAR1928-T hücrelerinin aktivasyon sonrasındaki analizleri.	81
Şekil 25. Flow sitometri grafikleri, TN + TSCM (CD3+, CD45RA+, CD62L+), TCM (CD3+, CD45RA-, CD62L+), TemEarly (CD3+) dahil olmak üzere CD4+ ve CD8+'daki sağlıklı yetişkin bir donörden alınan T hücre alt popülasyonlarını (TN + TSCM, TCM, TEMEarly, TEMLate, TEMRA) göstermektedir.	83
Şekil 26. PHA veya anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CD3+ T hücrelerindeki alt populasyon dağılımı.....	85
Şekil 27. Anti-CD3&anti-CD28 veya PHA ile aktive edilen toplam CD4 + T ve CD8 + T hücrelerinin alt populasyon çubuk grafiği. 14-21. günde Tn + TSCM, TCM, TemEARLY, TemLATE ve Temra alt popülasyonlarının karşılaştırılması.....	87
Şekil 28. PHA veya anti-CD3& anti-CD28 ile aktive edilen CAR-T hücrelerde TSCM dağılımı.	90
Şekil 29. CAR(CD28) veya CAR(4-1BB) ifade eden T hücresi alt popülasyonları..	91
Şekil 30. PHA veya anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin yorgunluk profili.....	95
Şekil 31. CAR-T hücrelerinin sitotoksikite kapasitesi	97
Şekil 32. CD25 ve CD107a yukarı regülasyonu ile CAR-T hücrelerinin aktivasyonu. CAR-T hücrelerinin CD25 aktivasyonu ve CD107a sitotoksik degranülasyon biyobelirteçlerinin çubuk grafiği ve CAR-T: RAJI ortak kültür deneyleri.	99
Şekil 33. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) Nude/NSG fare modellerinde yürütülen <i>in vivo</i> CAR-T hücre etkinlik çalışmalarını gösteren plan	101
Şekil 34. CD19+B hücreli ALL kanser hayvan modeli farelerde CAR19BB-T hücre etkinliğinin zamana bağlı (7.-63. gün) görselleştirilmesi	105
Şekil 35. fLusiferaz biyolüminesans, mCherry ve GFP floresan <i>in vivo</i> Kantifikasyonları	108
Şekil 36. Kaplan Meier Sağ Kalım analizi ve CAR-T hücre In vivo PCR ile tespiti ...	109
Şekil 37. CAR-T hücre uygulama sonrası ALL kanser modeli farelerde hemogram ve biyokimya analizleri	110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACT	: Adoptif Hücre Transferi; Adoptive Cell Transfer
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi; Acute Lymphoblastic Leukemia
APC	: Antijen Sunan Hücre; Antigen Presenting Cell
BM	: Kemik İliği; Bone Marrow
CAR	: Kimerik Antijen Reseptörü; Chimeric Antigen Receptor
CCR7	: CC-kemokin reseptörü 7
CLL	: Kronik Lenfositik Lösemi; Chronic Lymphocytic Leukemia
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi; Central Nervous System
CRS	: Sitokin Salınım Sendromu; Cytokine Release Syndrome
CXCR3	: CXC-Kemokin Reseptör 3
DC	: Dendritik Hücre; Dendritic Cell
FADD	: FAS ile İlişkili Ölüm Domain Proteinini; FAS-Associated Death Domain Protein
FBS	: Fetal Sığır Serumı; Fetal Bovine Serum
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi; Food and Drug Administration
FOXP3	: Forkhead Box Protein P3
HCP	: Konakçı Hücre Proteinini; Host Cell Protein
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni; Human Leukocyte Antigen
HSCT	: Hematopoietik Kök Hücre Transplantasyonu; Hematopoietic Stem Cell Transplantation
ICOS	: Uyarılabilir T Hücresi Kostimülatörü; Inducible T Cell Co-Stimulator
Ig	: İmmünoglobulin

IL-2	: İnterlökin-2
IFN-γ	: İnterferon gama; Interferon gamma
IP	: İnteraperitoneal Enjeksiyon
ITAM	: İmmünoreseptör Tirozin Bazlı Aktivasyon Motifleri; Immunoreceptor Tyrosine Activation Motifs
KLGR-1	: Öldürücü hücre lektin benzeri reseptör alt ailesi G, üye 1; Killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1
LAG-3	: Lenfosit Aktivasyon Geni 3; Lymphocyte-Activation Gene 3
Lck	: Lenfosit Özgü Protein Tirozin Kinaz; Lymphocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase
MHC	: Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi; Major Histocompatibility Complex
MM	: Multipl Miyelom; Multiple Myeloma
NEAA	: Esansiyel Olmayan Amino Asit; Non-Essential Amino Acid
NHL	: Hodgkin Dışı Lenfoma
NK	: Doğal Öldürücü; Natural Killer
PBMC	: Periferik Kan Mononükleer Hücre; Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1	: Programlanmış Hücre Ölümü Proteini-1; Programmed Cell Death Protein 1
PDL-1	: Programlı Ölüm Ligandı-1
PEI	: Polietilenimin; Polyethylenimine
PHA	: Fitohemaglutinin; Phytohemagglutinin
pMHC	: peptit-MHC kompleksi
PTK	: Protein Tirozin Kinaz; Protein Tyrosine Kinase
scFv	: Tek Zincirli Fragman Varyantı; Single-Chain Variable Fragment

SFK	: Protein Tirozin Kinazların Src Ailesi; Src family of protein tyrosine kinases
STAT3	: Sinyal Dönüştürücü Ve Transkripsiyon 3 Aktivatörü
TAA	: Tümör-İlişkili Antijen ; Tumor-Associated Antigen
TC cell	: Sitotoksik T Hücresi
TCM	: Merkezi Bellek T Hücreleri; Central Memory T Cell
TCR	: T Hücre Reseptörü; T Cell Receptor
TEFF	: Terminal Efektör T Hücreleri ; Effector T Cells
TEM	: Efektör Bellek T Hücreleri ; Effector Memory T Cells
TH cell	: Yardımcı T Hücresi
TIM-3	: T Hücresi İmmünoglobulin Ve Müsin Alanı-3; T Cell İmmunoglobulin And Mucin Domain-3
TME	: Tümör Mikroçevresi; Tumor Microenvironment
TN	: Naif T Hücreleri ; Naive T Cell
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa ; Tumor Necrosis Factor-Alpha
TPEX	: Tükenmiş T Hücrelerin Öncüsü
Treg	: Düzenleyici T Hücreleri; Regulatory T cell
TRUCK	: Antijenle Sınırlandırılmamış Sitokinle Başlatılan Öldürme İçin Yönlendirilen T Hücreleri; T cells Redirected for Antigen-Unrestricted Cytokine-Initiated Killing
TSCM	: Kök Hücre Benzeri Bellek T Hücreleri; Stem Cell-Like Memory T Cell
TTEX	: Tükenmiş T Hücreleri
VSV-G	: Vesiküler Stomatit Virüsü G; Vesicular Stomatitis Virus G

1. GİRİŞ

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), lenfoblastların ve lenfoid hücrelerin kontrolsüz ve kusurlu proliferasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. ALL, çocuklarda ve genç erişkinlerde yaygın olarak görülmektedir. Yıllık insidans oranı 100.000 kişi başına yaklaşık 3 vakadır (Acute Lymphocytic Leukemia — Cancer Stat Facts, t.y.; Puckett & Chan, 2023). ALL'ye karşı uygulanan tedavi alternatiflerinden olan kemoterapi veya hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HSCT) uygulansa da tedavi sonrası nüksetme eğilimi gözlemlenmektedir (Poondla vd., 2022). Moleküler biyoloji ve genetik modifikasyon tekniklerinin geliştirilmesi, kanser tedavilerinde kemoterapi ve monoklonal antikör gibi geleneksel tedavilerin dışında yeni bir dönemin açılmasına yol açmıştır. Konakçı bağışıklık hücrelerinin, düşük anti-tümör aktivitesi veya efektör T hücrelerinin eksikliği nedeniyle kanser hücreleri tarafından yeterince aktifleştirilememesi, geleneksel tedavilerin başarısız olmasının ana nedenidir (Frey, 2015). Bununla birlikte, yüksek afiniteli kimerik bir antijen reseptörünün (CAR) kanser hastalarından izole edilen otolog T (CAR-T) hücrelerine genetik transferi, hem T hücre reseptörü (TCR) hem de majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) gerekmeden efektör fonksiyonlar gösterebilen bir hücreye dönüşmesini sağlayabilmektedir (Chmielewski vd., 2013; Finney vd., 1998). Tümör-ilişkili antijen (Tumor-associated antigen, TAA; örneğin, CD19, BCMA, vb.) spesifik CAR-T hücreleri, TAA eksprese eden kanser hücrelerini tanıyabilmekte ve etkili bir şekilde ortadan kaldırabilmektedir (Gross vd., 1989; Kochenderfer vd., 2009). CAR-T hücreleri, genetik olarak değiştirilmiş poliklonal T hücreleri veya doğal öldürücü (Natural Killer; NK olarak da bilinir) hücrelerdir. Tümör hücresi yüzeyindeki belirli bir moleküle yönlendirmek için füzyon proteinlerine sahiptir (Poondla vd., 2022). CAR bileşenleri modüler bir tasarıma sahip olup, bir ektodomain, bir transmembran alanı, bir hücre içi sinyal alanı ve bir menteşe içermektedir. Ektodomain, bir monoklonal antikordan türetilen hücre dışı MHC'den bağımsız bir antijen bağlama alanı olan tek zincirli Fragman varyantı (scFv) olan bir immünoglobulinin ağır ve hafif zincirlerinin değişken kısımları tarafından oluşturulan bir sinyal peptididir. CAR yapısının ilk nesli, TCR'nin CD3z hücre içi aktifleşme sinyal bölgesi ve ilgili antijene spesifik bağlanma için bir immünoglobülin türevli scFv bölgesinin birleştirilerek T hücre yüzeyinde eksprese edilerek oluşturulan en basit formdur (Fan vd., 2017; Kochenderfer vd., 2009).

Birinci nesil CAR konstraktlarının etkinliğinin zayıf görölmesine takiben, CD28 veya 4-1BB gibi ilave kostimulatör belirleyici proteinlerin sitoplazmik bölgelerini içeren tek veya kombinasyon halinde ikinci ve üçüncü nesil CAR'ların geliştirilmiştir (Brentjens vd., 2007; Sadelain vd., 2013). Bu modüler tasarım, doğal T hücre aktivasyonunun birçok yönünü başarılı bir şekilde gerçekleştirebilmekte ve CAR-T hücrelerinin çoğalmasını ve işlevini arttırdığı gösterilmektedir (Maus vd., 2014). Transgenik CAR-T hücreleri kullanılarak yapılan ilk klinik çalışmaları, B hücreli akut lenfoblastik lösemi (ALL), Hodgkin Dışı Lenfoma (NHL), kronik lenfositik lösemi (CLL) ve Multipl Miyelom (MM) dahil olmak üzere hematolojik kanseri olan hastaları incelemiştir. Bu durum, önemli ölçüde hastalıksız ve genel sağkalım olduğunu ve iyileşmiş yanıt oranlarının %50 ila %85 arasında değiştğini göstermiştir (Brentjens vd., 2007; Sadelain vd., 2013). ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), akut lenfoblastik lösemili olan pediatrik ve genç yetişkin hastalar için Novartis tarafından Kymriah'ı (Tisagenlecleucel) ve bunun yanında relaps veya refrakter büyük B hücreli lenfomalı yetişkinlerin tedavisi için ise KYTE Gilead tarafından Yescarta'yı (Axicabtagene ciloleucel) onaylamıştır. CAR(CD28)-T hücrelerinin uzun süreli ekspresyonu ve efektör fonksiyonu *in vivo* çalışmalarda 30 gün olduğu görölmüştür (Porter vd., 2015).

Literatür çalışmaları, merkezi bellek T hücrelerinin (TCM) ve kök hücre benzeri bellek T hücrelerinin (TSCM) CAR-T hücre popölasyonlarında yüksek olduğunu göstermektedir. Bu tür hücreler, immunoterapinin etkili olması için sürekli çoğalma ve uzun süreli kalıcılığı sağlamaktadır (Blaeschke vd., 2016, 2018). TCM ve TSCM popölasyonunu arttırmak için anti-CD3/anti-CD28 mikrobuncukları ve Fitohemaglutinin (PHA) ile T hücre aktivasyonu sağlanmaktadır. Retroviral transdüksiyon protokollerinde yaygın olarak poliklonal bir uyarıcı olarak kullanılan PHA (Duarte vd., 2002), kırmızı barbunya fasulyesinden elde edilen bir lektindir. T hücre zarlarına bağlanarak metabolik aktiviteyi ve hücre bölünmesini başlatır (Movafagh vd., 2011). İnsan CD8+T hücrelerinin uzun süre (>3 hafta) kültüre edilmesi zor olduğu literatürde bilinmektedir. PHA, TCR/CD3 kompleksine bağlanır ve anti-CD3 antikorları tarafından tetiklenen tüm hücre içi aktivasyon olaylarını taklit eder (Duarte vd., 2002). CD8+TCM ve CD8+TN hücrelerinde PHA seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Daha da önemlisi, CD8+ CCR7-TEM ve TEF alt kümelerinde, sitotoksik kapasite ve performans ifadesi gibi efektör fenotiplerini gösterirler.

Yapılan alışmalar, IL-15 ile kültürde canlı CD8+ T hücrelerinin ideal canlılığı 21 güne kadar korunabilirken, IL-15 ve PHA'yı birleştirerek CD8+ T lenfositlerinin kültürde 90 güne kadar kültüre edilebileceğini göstermiştir (Isabel Da Cunha & Terra, t.y.). PHA, hücre proliferasyonunu teşvik etmesine rağmen, Fas-FasL etkileşimleri IL-15 tarafından inhibe edilebilmektedir. Bu durum, hücre apoptozisini teşvik etmektedir (Bulfone-Paus vd., 1997; Kabelitz & Janssen, 1997). Bu nedenle, PHA ve IL-15 sinyallerinin birleşimi, CD8+ T hücrelerinin büyümesi ve genişlemesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Bu sebeple, CAR- T hücre üretim ve çoğaltımında besiyerinde IL-15 sitokini de eklenerek etkinlik kapasitesi korunacaktır (Bulfone-Paus vd., 1997; Kabelitz & Janssen, 1997).

Bu tez çalışması ile, CD19 spesifik CAR-T hücrelerini aktifleştirme yönteminde, Fitohemaglutinin (PHA) veya anti-CD3&anti-CD28, yapılacak değişikliklerle uzun süreli stabil ve sitotoksik etkin CAR-T hücre üretim yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. T hücrelerinin zarlarına bağlanan ve metabolik aktiviteyi artıran PHA kullanılarak üretilen CAR-T hücrelerinin stabilitesi ve etkinliğinin, anti-CD3/anti-CD28 ile çoğaltılan CAR-T hücreleri ile kıyaslanması hedeflenmiştir. Ayrıca, CD19+Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'ye karşı geliştirilen CAR-T hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* modelde etkinlik ve stabilitesi değerlendirilerek *in vivo* kanserli hayvan modelinde sağkalım süresini uzatmak, sitotoksik aktiviteyi sürdürmelerine olanak tanıyan TCM ve TSCM profilleri kazandırmak ve kanser relaps olasılığını azaltmak hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bağışıklık Sistemi ve İmmünite

Bağışıklık sistemi; cildi, solunum sistemini, bağırsak sistemini ve diğer bölgeleri mikroorganizmalar (bakteri, mantar ve parazit gibi organizmalar), virüslerden ve kanser gibi dış kaynaklardan koruyan hücreler, kimyasallar ve süreçlerden inşa edilmiştir. Bağışıklık sistemi, yapısal ve kimyasal engellerin yanı sıra bizi enfeksiyondan koruyan iki "savunma hattına" sahiptir (Marshall vd., 2018). İnate veya doğuştan gelen bağışıklık, izinsiz bir patojene karşı ilk savunma hattıdır. Bir antijenle karşılaştıktan hemen sonra veya birkaç saat içinde kullanılan, antijenden bağımsız bir savunma yöntemidir. Vücut, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin immünolojik hafızası olmadığından, vücudun daha sonra bu patojeni tanıyamaz veya "ezberleyemez". Edinilmiş bir diğer deyişle adaptif bağışıklık (adaptive immunity), antijene bağımlı ve spesifiktir, dolayısıyla antijene maruz kalma ile maksimum yanıt arasında bir süre geçmektedir (Marshall vd., 2018). Uyarlanabilir bağışıklık, konakçının antijene daha sonra maruz kalması üzerine daha hızlı ve etkili bir bağışıklık tepkisi oluşturmalarını sağlayan hafıza yeteneği ile tanınmaktadır. Uyarlanabilir ve doğuştan bağışıklık, konakçı savunmasını tamamlamakta olup, bu iki sistemdeki hatalar, konakçının savunmasız veya yanlış yanıtlara neden olduğu düşünülmektedir (Bonilla & Oettgen, 2010; Turvey SE, 2010).

2.2. T Hücresi

Bağışıklık sistemi, vücudu enfeksiyonlardan, hastalıklardan ve diğer zararlı organizmalardan koruyan karmaşık bir yapıdır. Bu sistemin önemli bileşenlerinden biri T hücreleridir. T hücreleri, lenfosit olarak bilinen beyaz kan hücrelerinin bir alt sınıfıdır ve yaşam boyunca patojenlere, alerjenlere ve tümörlere karşı tepkileri düzenlemektedir (Chaplin, 2010; Kumar vd., 2018). T hücrelerinin kökeni, işlevleri ve görevleri oldukça çeşitli ve hayati öneme sahiptir. T hücreleri, patojenleri, tümörleri ve çevresel faktörleri içeren çeşitli antijenleri tanıma yeteneğine sahip bir reseptörü ifade etmekle birlikte, immünolojik hafızayı ve kendine toleransı (self-tolerance) korumaktadır (Kumar vd., 2018).

T hücreleri aynı zamanda birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalığın ana nedenleri olarak da rol oynamaktadır (Cohen, 2014). T hücrelerinin kökeni, oluşumları ve olgunlaşma süreçleri bağışıklık sisteminin temel taşlarından birini oluşturmaktadır. T lenfositler, kemik iliği kökenli hücre atalarından türetilir ve olgunlaşma, seçilme ve ardından çevreye gönderilme süreci için timüse göç etmektedir (Kumar vd., 2018). T hücrelerinin olgunlaşma süreci timus içinde olmakla birlikte, timus T hücrelerinin kendi vücut hücrelerine zarar vermesini önlemek için onları yönlendirmektedir. Bu süreç, T hücrelerinin kendi vücut hücrelerine karşı toleransını oluştururken, yabancı patojenlere karşı etkili bir yanıt verebilme yeteneklerini de geliştirmektedir (Thapa & Farber, 2019).

T lenfositleri, olgunlaşma, seçilim ve daha sonra çevreye taşınma için timusa göç eden kemik iliği (BM) progenitörlerinden oluşmaktadır (Wu vd., 2022). Periferik T hücreleri, yeni antijenlere yanıt verebilen saf/naif T hücrelerini, önceki antijen aktivasyonundan ortaya çıkan ve uzun süreli bağışıklığı koruyan hafıza T hücrelerini ve bağışıklık tepkisini kontrol eden düzenleyici T hücrelerini (Treg'ler) içermektedir (Kumar vd., 2018). Bağışıklık tepkileri, naif T hücrelerinin antijen ve dendritik hücreler (DC) tarafından sunulan kostimülatuar ligandları tanınması sonucu başlamakta, bu da interleukin-2 (IL-2) üretimine, proliferasyona ve patojen temizlemeyi teşvik etmek için farklı bölgelere göç eden efektör hücrelere dönüşümü içermektedir. Aktive olan efektör hücreler kısa ömürlüdür, ancak bir kısmı hafıza T hücreleri olarak hayatta kalmakta ve göç, doku lokalizasyonu ve kendini yenileme yeteneklerine dayanan heterojen alt kümeler halinde kalmaktadır (Charles A Janeway vd., 2001). Her bellek alt kümesi, uzun süreli bağışıklığı sürdürmeye ve koruyucu yanıtları hatırlamaya katkıda bulunmaktadır ancak kökenleri ve hücre soyu ilişkileri hala tam olarak çözümlenmemiştir (Kumar vd., 2018). T hücreleri, vücudun farklı yaşam aşamalarında ve bağışıklık tepkilerinde farklı yerlerde bulunur. T hücreleri, beyin ve merkezi sinir sistemi (CNS) dahil olmak üzere vücuttaki neredeyse her organ ve dokuda örneğin birincil (primer) ve ikincil (sekonder) lenfoid doku, mukozal ve bariyer bölgeleri, eksojen organlar, yağ dokusunda yer almaktadır. T hücrelerinin çoğunun, insan vücudundaki lenfoid dokularda (dalak, bademcik, kemik iliği ve 500 ila 700 lenf düğümü) bulunduğu düşünülmektedir. İnsan periferik kanında toplam T lenfosit sayısının %2-3'ünün mevcut olduğu tahmin edilmektedir (Clark, 2010; Ganusov & De Boer, 2007).

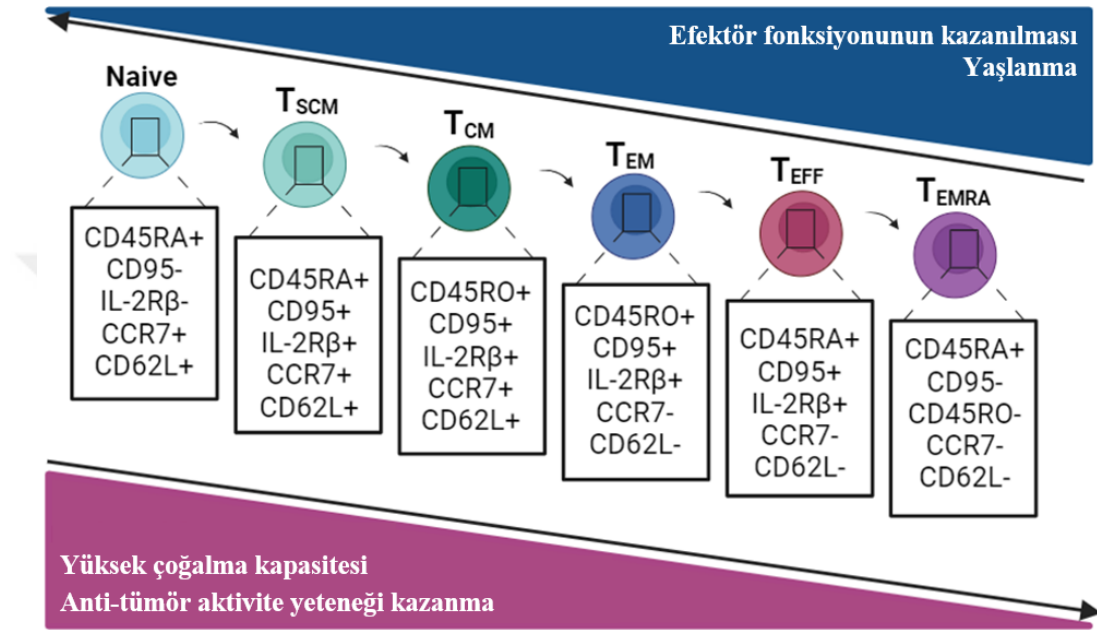
2.3.T Hücre Farklılaşması ve Alt Tipleri

Farklılaşma durumu, T hücrelerinin bağışıklık fonksiyonu ve ömrünü belirleyen önemli bir özelliktir. Olgun T hücreleri, hücre yüzeyi belirteçleri CD4 veya CD8'in spesifik ifadesine dayalı olarak iki ana fonksiyonel gruba ayrılır (Germain, 2002). Yardımcı T hücreleri (TH) olarak da bilinen CD4+T hücreleri, sitokinler üreterek veya iltihabı baskılayarak bağışıklık sistemi tepkilerini düzenler (Ziegler, 2016). CD8+T hücreleri sitotoksik T hücreleri (TC hücreleri) olarak bilinmekte ve patojenle enfekte olmuş veya malign hücreleri perforin ve granzim gibi hücrel lizis molekülleri ile birlikte inflamatuvar sitokinler salgılayarak öldürme işlemi gerçekleştirmektedir (N. Zhang & Bevan, 2011). CD4+ hem de CD8+T hücreleri tümöre karşı immün yanıtlar oluşturabilmektedir (Quezada vd., 2010).

CD4+ ve CD8+ hücreleri vücutta dolaşarak T hücresi reseptörlerini (TCR) uyaran antijenleri arar. Bu, enfeksiyonun veya kötü huylu/malign büyümenin varlığını göstermektedir (Gowans ve Knight, 1964). İlk antijenle karşılaşmadan önce, T hücreleri "naif" (TN) olarak adlandırılmaktadır (Cossarizza vd., 1996). Antijenle karşılaştıktan sonra, T hücreleri aktive olur, hızla büyür, çoğalır ve sitotoksik granüller ve inflamatuvar sitokinler üretmeye başlamaktadır (Smith-Garvin vd., 2009). **Farklılaşma** olarak adlandırılan bu süreç, hücrel fonksiyonda bir dizi değişikliğe yol açan inflamatuvar özelliklerin kazanılmasını içermektedir (Gattinoni vd., 2012). Ayrıca, antijenle karşılaşmayı takiben, T hücreleri sitokin ortamına bağlı olarak kendilerini bir dizi farklı alt gruba özgü hale getirebilirler (Masopust & Schenkel, 2013); bu alt gruplar, fonksiyonel olarak belirleyici transkripsiyon faktörlerinin ifadesi ile karakterize edilmektedir (J. Zhu vd., 2010). T hücreleri, CD4+ hücreler için Th1 veya Th17 gibi inflamatuvar alt gruplara veya CD8+ hücreler için Tc1 ve Tc17 gibi alt gruplara özgü olabilmektedir (Huber vd., 2009; Sad vd., 1995; J. Zhu vd., 2010).

T hücreleri ayrıca, immün suppressif/baskılayıcı özelliklere sahip olabilmekte ve bu durumda düzenleyici T hücreleri (Treg) olarak adlandırılmaktadır (Smith & Kumar, 2008; J. Zhu vd., 2010). T hücrelerinin farklılaşması ve alt grup belirleme süreci, hücrel sinyalleşme ve metabolik yollarında dramatik değişikliklere yol açmakta ve aynı zamanda bu değişikliklere şekil vermektedir (Sukumar vd., 2017). Kök hücre bellek T hücreleri (TSCM), Merkezi Bellek T hücreleri (TCM), Efektör Bellek T hücreleri (TEM), Efektör Bellek T hücreleri (TEFF) ve son olarak terminal olarak farklılaşmış TEMRA, CD8+T

hücre farklılaşma durumlarından bazılarıdır (**Şekil 1**) (Restifo & Gattinoni, 2013). TEM, TEFF ve TEMRA ile karşılaştırıldığında, TN, TSCM ve TCM hücreleri daha uzun ömürlü ve replikatif kapasiteye sahiptir. TN'den TEMRA durumuna geçiş, efektör karakterin kazanılmasını destekleyen epigenetik ve metabolik değişikliklerin yanı sıra, transkripsiyon faktörlerinin ifadesinde ilerici bir değişiklik ile işaretlenmektedir (Crompton vd., 2016; Gattinoni vd., 2012).



Şekil 1. T hücre alt tipleri. Naif T hücreleri, antijenle karşılaştıklarında aktivasyona uğramakta ve TSCM, TCM ve efektör T hücrelerine farklılaşmaktadır. Bu farklılaşma, çeşitli hücre yüzeyi belirteçleri ile belirlenmektedir (Kishton vd., 2017).

Aynı zamanda, artan T hücre farklılaşması, telomer uzunluğunun azalmasına ve hücre kendini yenileme ve hücre ömrünü destekleyen transkripsiyon faktörlerinin baskılanmasına neden olmaktadır (Gattinoni vd., 2012; Weng vd., 1995).

Artan farklılaşma durumu, kendini yenileme kapasitesi ve uzun ömre sahip olma yeteneğinin azalmasıyla karakterizedir, ancak bu durumlar, aynı zamanda inflamatuvar sitokinlerinin ve granzim B ve interferon γ gibi hücre lizit moleküllerinin artan üretimi gibi immün fonksiyonelliğin artması ile de ilişkilidir (Gattinoni vd., 2006). Hücre alt grup spesifikasyonu muhtemelen T hücresi ömrünü de düzenlemektedir; Th17 ve Tc17 hücreleri genellikle kendini yenileme kapasitesine sahipken, Th1 ve Tc1 hücreleri kısa ömürlü terminal efektörler olma eğilimindedir (Muranski vd., 2011). Genel olarak hücre farklılaşması ve alt gruplama sürecinin, T hücrelerinin kendini yenileme yeteneği ve uzun

ömürlülüğü üzerinde önemli bir etkisi vardır (Kishton vd., 2017). T hücreleri, hücre yüzeyinde ifade edilen moleküllerin kombinasyonu ile tanımlanan farklı alt gruplara bölünebilir. Her T hücresi alt popülasyonunun göç ve fonksiyonel özellikleri, bu fenotipik farklılıklarla ilişkilidir (Tsao vd., 2022; Van Den Broek vd., 2018).

2.3.1.Naif T Hücreleri (Naive T Cell; TN)

Timusta pozitif ve negatif seçilime tabi tutulduktan sonra, T hücreleri perifere göç etmekte ve naif T hücre bölmesine girmektedir. Periferde, naif T hücreleri, lenfatik sistemi kullanarak sekonder lenfoid organlar ve kan arasında sürekli olarak dolaşım yapmakta, bu dolaşımı CC-kemokin reseptörü 7 (CCR7) ve CD62 ligandı (CD62L; aynı zamanda L-selektin olarak da bilinir) lenfoid homing reseptörlerini ifade ederek gerçekleştirmektedir (**Tablo 1**). Periferde kognat antijenlerle karşılaşma ve etkileşim sonucunda, naif T hücreler çeşitli efektör ve bellek T hücre tiplerine farklılaşarak çoğalmaktadır (Van Den Broek vd., 2018).

Tablo 1. T hücresi naif fenotip ile ilişkili yüzey belirteçleri.

Marker	Ligand	Ekspresyon	Fonksiyon	Referans
CD45RA ve CD45RO (Lökosit Ortak Antijeninin İzoformları)	Bilinmeyen	CD45RO tercihen bellek T hücrelerinde ifade edilir.		
		CD45RA hem naif T hücrelerinde hem de efektör bellek T hücrelerinde ifade edilir.	CD45 fosfataz aktivitesi, TCR sinyal iletiminde rol oynar ve protein tirozin kinazların Src ailesi olarak adlandırılan SFK'ler onların birincil hedefleri olarak tanımlanmıştır.	Akbar vd., 1989; Michie vd., 1992; Picker vd., 1993; Trowbridge & Thomas, 1994
		CD45RO ve CD45RA'nın ikili ekspresyonu, naif T hücrelerinin efektör veya hafıza T hücrelerine farklılaşması ve TEM hücrelerinin CD45RA'yı yeniden eksprese etmesi sonucunda gerçekleşir.		
		Bu nedenle, naif T hücresi popülasyonlarını tanımlarken CD45RA+ T hücresi havuzunda CD45RO ifade eden hücrelerin hariç tutulması önerilir.		
CD62L	GLYCAM1, CD34 and MADCAM1	CD62L, CD4+ ve CD8+ naif ve TCM hücrelerinde yüksek seviyelerde ifade edilir, ancak TEM hücreleri heterojen ifade gösterir.	CD62L, T hücrelerinin çeşitli ikincil lenfoid organlara yönlendirilmesinde rol oynayan bir hücre adhezyon molekülüdür.	Hengel vd., 2003; Marelli-Berg vd., 2013; Picker vd., 1993
		CD62L ve CD45RA birlikte ekspresyonu naif T hücrelerini CD45RA+ TEM hücrelerinden ayırt etmek için kullanılır.	CD62L, yuvarlanarak adhezyon yoluyla, yüksek endotelial venüllerde ifade edilen ligandlarla etkileşime girerek lenfositleri yavaşlatır.	
		Bu, CD4+ T hücrelerine kıyasla daha fazla CD45RA+ TEM hücresi gösteren CD8+ T hücreleri için özellikle kritiktir.		
CD27 (TNFR Süper Ailesinin Üyesi)	CD70	CD27 neredeyse tüm CD4+ ve CD8+ naif T hücreleri tarafından ifade edilir.	CD27, T hücresi ve T hücresi-B hücresi etkileşimlerinde önemli bir rol oynar ve aynı zamanda T hücresi bağışıklığının geliştirilmesi ve sürdürülmesi için gerekli olan ortak uyarıcı sinyalleri sağlar.	Camerini vd., 1991; de Jong vd., 1992; Koch vd., 2008
		CD27 ifadesi, CD45RA+CD8+ TEM hücrelerinde de bulunabilir ve CD28 ile birlikte çeşitli CD45RA+ TEM alt kümelerini belirlemek için kullanılabilir.	CD27- T hücreleri uzun süreli antijenik uyarımdan sonra ortaya çıkar ve farklılaşmanın geç bir aşamasını gösterir.	

Ortaya çıkan patojenlere karşı yeterli bir bağışıklık tepkisi sağlamak için, saf/naif T hücresi bölmesinin, sınırlı bir fiziksel alanda benzersiz T hücresi reseptörlerine (TCR'ler) sahip çok sayıda hücreyi muhafaza etmesi gerekmektedir. Timus, hem insanlarda hem de farelerde yaşla birlikte küçülüp atrofiye uğradığından, bu gereksinim zordur. Homeostatik çoğalmanın ve T hücrelerinin hayatta kalmasının bu kaybı telafi ettiği düşünülmektedir, ancak bazı T hücresi klonlarının diğerlerinin pahasına aşırı büyümesine neden olabilir (den Braber vd., 2012). Ayrıca, insanlardaki naif T hücreler son derece uzun ömürlüdür; beklenen ömürleri 6 ila 9 yıldır, bu süreçte farelerdeki naif T hücreler her 6 ila 11 haftada bir yenilenmektedir (den Braber vd., 2012; Mestas & Hughes, 2004).

IL-7 ve self-peptide MHC kompleksleri gibi homeostatik faktörler naif T hücrelerin hayatta kalması ve çoğalmasını sağlamaktadır (Takada & Jameson, 2009). Fonksiyonel olarak, T hücreleri, periferde kognat antijenleri ile karşılaşana kadar naif olarak kabul edilmekte ve daha sonra efektör veya bellek T hücrelerine farklılaşmaktadır. T hücrelerinin antijen tanıma geçmişini *in vivo* olarak değerlendirmek zor olduğu için saf/naif T hücrelerini tanımak için sıklıkla yüzey işaretleyicilerinin ekspresyonu kullanılır. İnsanlarda naif T hücreleri, bellekle ilgili işaretleyici CD45RO ekspresyonu bulunmayıp, CD45RA'yı eksprese etmektedir (**Tablo 1**). Naif T hücrelerini, CCR7, CD62L veya CD27 gibi en az bir ek naif T hücre işaretleyicisini ifade etmeleri (**Tablo 1**) ile, CCR7, CD62L veya CD27 işaretleyicilerini ifade etmeyen ancak CD45RA'yı yeniden ifade eden terminalli farklılaşmış efektör bellek T (TEM) hücrelerinden ayırmak gerekmektedir (CD45RA+ TEM hücreleri) (Sallusto vd., 1999). Düzenleyici T hücreleri, Kök hücre hafıza T hücreleri ve Naif fenotipli hafıza T hücreleri gibi 3 farklı Naif-benzeri T hücreler de bulunmaktadır.

Düzenleyici CD4+T (Treg) hücreleri, kendiliğinden tolere edebilme (self-tolerance) ve bağışıklık homeostazının korunmasında kritik bir rol oynayan özel bir hücre hattını temsil etmektedir. Timustan çıkan Treg hücreleri, CD45RA, CC-kemokin reseptörü 7 (CCR7) ve CD62 ligandı (CD62L) dahil olmak üzere klasik naif T hücre işaretleyicilerini ifade etmekte, ancak tipik naif T hücrelere kıyasla nispeten düşük düzeyde IL-7 reseptör- α (CD127) ifade etmektedir (Caramalho vd., 2015).

Naif benzeri bellek T hücrelerinin içinde, CD95, CD122, CXC-kemokin reseptör 3 (CXCR3) ve integrin CD11a (LFA1'in $\beta 2$ integrin alt birimi) ekspresyonuna sahip bir

alt grup olan kök hücre bellek T (TSCM) hücreleri bulunmaktadır. Tscm hücreleri naif benzeri fenotiplerini korumaktadır (Ahmed vd., 2016; Fuertes Marraco vd., 2015). Bu hücreler, kendini yenileme gibi kök hücrelerle benzer özelliklere sahiptir ve onlarca yıl boyunca hayatta kalabilirler (Ahmed vd., 2016).

CD8+ T hücrelerinin başka bir naif benzeri bellek alt kümesi, yüksek CXCR3 ve CD49d ifadesi, yüksek IFN γ üretimi ve T-box transkripsiyon faktörü TBX2'in yüksek ekspresyonu ile karakterize edilir. Ancak fenotipik ve transkripsiyonel olarak hafıza T hücrelerinden ve efektör hücrelerden farklıdır (Pulko vd., 2016). Naif benzeri bellek T hücreleri, naif/saf T hücrelere benzer telomer uzunluklarına sahiptir (Pulko vd., 2016).

2.3.2.Kök Hücre Bellek T Hücreleri (Stem Cell like Memory T Cell; TSCM)

TSCM hücre alt kümesi, bellek T hücrelerinin en az farklılaşmış olanıdır (López-Cantillo vd., 2022). TSCM hücreleri, kendi kendini yenileme yeteneğine sahip olmaları ve çok yönlü farklılaşma yeteneklerine sahip olmaları açısından kategorize edilen bir T hafıza hücresi alt türüdür (Gattinoni vd., 2011). TSCM hücreleri, uzun ömürlü santral hafıza T hücreleri (TCM), efektör hafıza T hücreleri (TEM) ve kısa ömürlü efektör T hücrelerinden (TE) oluşan bir havuz oluşturabilmektedir (Frumento vd., 2020; Gattinoni vd., 2012). Diğer T alt popülasyonlarına kıyasla TSCM alt kısmı antijenik uyarım sonucunda daha hızlı bir yanıt geliştirir ve uzun süre varlığını sürdürebilir (McLellan & Ali Hosseini Rad, 2019). TSCM hücreleri, kök hücre benzeri özelliklere sahiptir ve fenotip olarak TN hücrelere benzerler. Her iki alt küme de CD45RA, CD62L, CCR7, CD27 ve CD28 gibi belirteçleri ifade etmektedir (Ando vd., 2020; Brummelman vd., 2018; Van Den Broek vd., 2018) ancak CD122 ve CD95 ifadelerinde farklılaşırlar, bu da daha önce antijenle karşılaşmış olan bellek alt kümelerini belirleyen belirteçlerdir (Gattinoni vd., 2011). İnsanlardaki dolaşımdaki T hücrelerinin sadece %2-%3'ünde TSCM hücre fenotipine sahip olması ve sayı bakımından az olması sebebiyle TSCM hücrelerinin araştırılması zor olmuştur (D. G. M. Tantaló vd., 2021; Y. Zhang vd., 2005). TSCM hücreleri, kendi kendini yenileme yetenekleri, diğer T hücre alt türlerini oluşturma yetenekleri ve daha iyi yerleşme yetenekleri nedeniyle CAR-T hücre ürünleri için en iyi fenotip olarak kabul edilmektedir (Gattinoni vd., 2011).

2.3.3. Merkezi Bellek T Hücreleri (Central Memory T Cells; TCM)

İkincil lenfoid organlar arasında dolaşan merkezi hafıza T hücreleri (TCM) uzun ömürlüdür. TCM hafıza hücrelerinin TE hücrelerinden daha az sitotoksik kapasiteleri olmasına rağmen, spesifik antijen tarafından uyarıldıktan sonra hızla çoğalabilmekte ve erken bir grup sitokin üretmektedirler (McLellan & Ali Hosseini Rad, 2019; Samji & Khanna, 2017). Özel antijenle uyarıldıktan sonra, özellikle tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) olmak üzere çeşitli sitokinler salgılamakta ancak daha verimli bir şekilde IL-2 üretmektedir. Ayrıca, CD45RO, CD62L, CD28, CD27, CCR7, CD127, CD11a, IL-18R α , CXCR4 ve CXCR3 ifadesine sahiptir, ancak CD45RA ifadesi bulunmamaktadır (Brummelman vd., 2018; Gattinoni vd., 2012; M. D. Martin & Badovinac, 2018; D. G. M. Tantaló vd., 2021). CCR7 ve CD62L'nin kaybı, merkezi bellek T hücrelerinin efektör bellek T hücre fenotipine geçişle birlikte gelmekte ve bu da hücrelerin artık lenfoid dokulara göç edememesine neden olur (McLellan & Ali Hosseini Rad, 2019).

2.3.4. Efektör Bellek T Hücreleri (Effector Memory T Cells; TEM)

Efektör bellek T hücreleri genellikle lenfoid olmayan dokulara dolaşırlar ve sıklıkla CD45RO, CD122, CD95, KLRG1, LFA-1, IL-18R α , kemokin reseptörleri ve doku homing reseptörlerini ifade ederler, ancak CD62L, CCR7 ve CD31 için negatiflerdir (Brummelman vd., 2018; M. D. Martin & Badovinac, 2018; D. G. M. Tantaló vd., 2021). TEM hücre alt kümesi ayrıca TNF- α salgılar, ancak interferon gama (IFN- γ) salgılamak kapasitesi daha yüksektir ve TCM lenfositlerinden daha sitotoksiktirler (Busch vd., 2016; Gattinoni vd., 2012).

2.3.5. Terminal Efektör T Hücreleri (Effector T Cells ;TEFF)

Bu hücre alt kümesi, hızlı yanıtlar ve güçlü efektör fonksiyonları için tamamen farklılaşmış T hücrelerinden oluşmaktadır. Bununla birlikte, kısa bir ömre sahiptirler ve kendini yenileme yetenekleri çok düşüktür (McLellan & Ali Hosseini Rad, 2019). Fenotipik olarak, TEFF hücreleri CD95, CD122, KLGR1 ve inflamasyon bölgelerine göç etmek için birkaç homing reseptörüne pozitif olup, CCR5 ve LFA-1 ifade etmektedir. Bununla birlikte, ayrıca CD45RA'yı yeniden ifade etmektedir (Brummelman vd., 2018; Henson vd., 2012) Bu hücreler CD45RO, CCR7, CD62L, IL7R α (CD127), CD27 veya CD28 ifade etmezler. Ayrıca, sınırlı bir genişleme (expansion) yeteneklerine sahiptirler ve hızla ölürler veya tükenirler (Ando vd., 2020).

2.3.6. Tükenmiş T Hücreleri (Exhausted T Cells)

Kronik enfeksiyonlar veya kansere karşı yanıtlarda, antijen spesifik CD8⁺T hücrelerinin sürekli antijenik uyarılması, efektör fonksiyonlarında kademeli bir kayba yol açmakta ve T hücreleri işlevsiz hale gelmektedir (Ando vd., 2020; Brummelman vd., 2018; Chan vd., 2021). İnhibitör reseptörlerin sürekli ekspresyonu, değişmiş metabolik uygunluk, azalmış proliferatif kapasite ve efektör sitokinlerin azalmış sekresyonu, tükenmiş T hücrelerinin ayırt edici özellikleridir (Hashimoto vd., 2018). Tükenmiş T hücrelerin öncüsü (TPEX) ve terminal olarak tükenmiş T hücreleri, tükenmiş T hücrelerin iki ana alt grubudur (Brummelman vd., 2018).

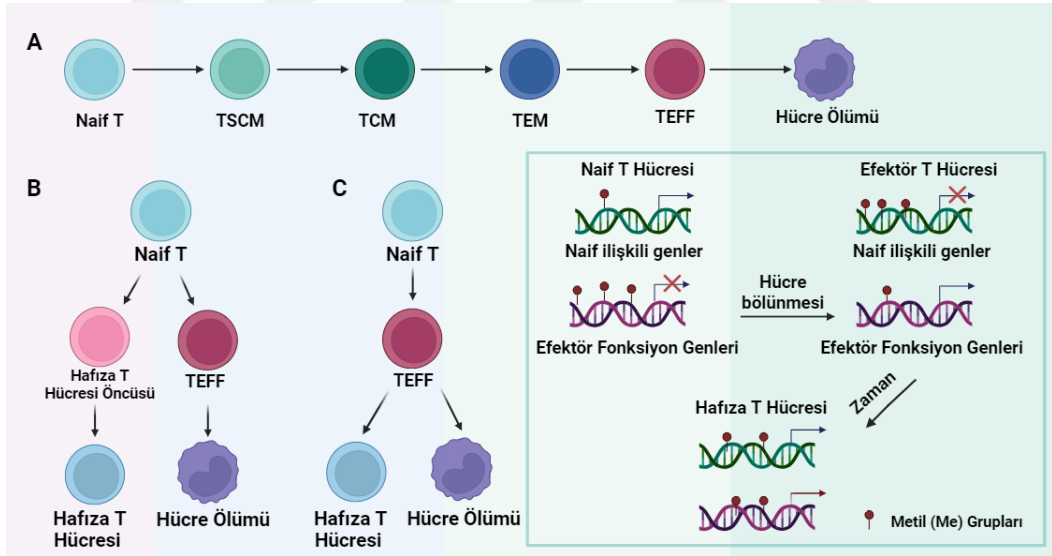
TPEX, TCF-1, CD62L, ID3 ve PD-1'in ekspresyonu gibi hafıza ve yorgunluk özellikleri sergiler ve azalmış sitokin salgısına sahiptir. Bu hücreler, immün kontrol noktası inhibitörlerine yanıt verir ve kendini yenileyebilir ve terminal olarak tükenmiş T hücrelerine (TTEX) farklılaşabilmektedir (Chan vd., 2021; Hashimoto vd., 2018). TTEX hücreleri genellikle PD-1, LAG-3, TIM-3, CD160 ve TIGIT'i birlikte ifade etmektedir (Ando vd., 2020; Brummelman vd., 2018). Bununla birlikte proliferasyon potansiyelleri bozulmuştur (Guo vd., 2021). T hücre tükenmesi, farklı özelliklere sahip her biri belirgin özelliklere sahip farklı aşamalardan oluşan dinamik bir süreçtir. Bu sürecin anlaşılması, daha hassas immünoterapi stratejileri tasarlamak için gereklidir. Bu yaklaşımlar, tükenmeye doğru farklılaşmayı engellemeye ve tükenmiş T hücrelerinin belirli aşamalarını tersine çevirmeye yardımcı olabileceği düşünülmektedir (W. Jiang vd., 2021).

2.4. Hafıza T Hücreleri

2.4.1. Hafıza T hücrelerinin Oluşumu

Hafıza T hücrelerinin oluşumuna dair üç model önerilmiştir (Q. Liu vd., 2020) (**Şekil 2**). İlk modelde, TSCM, TCM ve TEM hücreleri, daha sonlu bir fenotipe doğru ilerledikçe, naif T hücrelerinden aşamalı bir şekilde farklılaşmaktadır (Sallusto vd., 1999) (**Şekil 2A**). Bu modeli destekleyen bir çalışma, IL-2 üretme yeteneği açısından benzersiz olan KLRG1^{int} ifadesine sahip hafıza T hücrelerinin bir alt kümesini tanımlamıştır (Sarkar vd., 2008). İkinci modelde, intraklonal çeşitlenme ve TCR klonotip (clonotypic) öncü frekanslarındaki sayısal farklılıklar, hafıza T hücrelerinin önceden belirlenmesine yardımcı olmaktadır (**Şekil 2B**).

Üçüncü modelde ise, hafıza T hücreleri bağışıklık yanıtının kontraksiyon aşaması denilen “efektör T hücrelerinin büyük çoğunluğunun apoptoz yoluyla öldüğü ve uzun ömürlü hafıza hücrelerinden oluşan bir popülasyonun korunduğu bağışıklık aşaması”nda ortaya çıkmaktadır ve doğrudan efektör hücrelerden gelişmektedir (Şekil 2C). Ek olarak, Nature dergisinde yayınlanan, insan T hücrelerinde ve farelerde *in vivo* bellek T hücresi oluşumunu inceleyen iki çalışma, hafıza T hücrelerinin epigenetik modifikasyonlar yoluyla efektör T hücrelerinden oluşturulduğu ve Dnmt3a'nın hafıza T hücrelerinin oluşumunu kontrol eden anahtar bir DNA metiltransferaz olarak işlev gördüğünü ortaya koymuştur (Akondy vd., 2017; Youngblood vd., 2017). Çalışma, efektör fonksiyon genlerinin hem efektör hem de hafıza T hücrelerinde benzer metilasyon modellerine sahip olduğunu göstermiştir. Bu, hafıza T hücrelerinin patojenin yeniden enfeksiyonu üzerine bu genleri hızlı bir şekilde yeniden eksprese etmesine izin verebileceği görülmüştür (Omlusik & Goldrath, 2017). Antijen spesifik hafıza T hücrelerinin kendi kendini yenileme yetenekleri, asimetrik mitozlar aracılığıyla pluripotent kök hücrelere benzer şekilde sürdürülmektedir (Chang vd., 2007; Haining vd., 2008; Tomayko vd., 2008). Genel olarak, üçüncü model en popüler model olarak kabul edilmektedir.



Şekil 2. Hafıza Hücrelerinin Oluşumu. A, Bellek T hücresi oluşumuna yönelik birinci model, öncü hücrelerin hem efektör T hücrelerini hem de bellek T hücrelerini oluşturmak için naif T hücrelerinden bağımsız olarak geliştiğini öne sürmektedir. B-C, İkinci modelde efektör hücrelerin bir alt kümesi, hafıza T hücrelerine yol açmaktadır. Buna ek olarak, Naif hücrelerde, efektör hücrelerde ve hafıza hücrelerinde naif hücre fonksiyonu ve efektör hücre fonksiyonuyla ilişkili genlerin metilasyonu kutu içerisinde gösterilmektedir. Hafıza T hücreleri ve efektör T hücreleri, efektör fonksiyon genleri açısından benzer

metilasyon modellerine sahiptir. Bu durumun, patojenin yeniden enfeksiyonu üzerine hafıza T hücrelerinin bu genleri hızla yeniden eksprese etmesine izin verebileceği bulunmuştur (Omlusik & Goldrath, 2017).

2.4.2. Hafıza T Hücre Özellikleri ve Fenotipleri

Çalışmalar, hafıza T hücrelerinin, efektör hafıza T (TEM) hücreleri ve efektör T (TEFF) hücreleri ile karşılaştırıldığında, merkezi bellek (TCM) ve kök hücre bellek (TSCM) T hücrelerinin anti-tümör bağışıklık ve kalıcılık açısından daha iyi olduğunu göstermiştir (Q. Liu vd., 2020). Ayrıca TCM/TEFF oranının bazı tümörlere karşı bağışıklık tepkisini öngörmeye bir biyobelirteç olduğu da gösterilmiştir. Bu nedenle, çeşitli tümörlere karşı immünolojik stratejiler geliştirmek için efektör ve bellek T hücrelerinin farklılaşmasının altındaki mekanizmaların sistem düzeyinde anlaşılması giderek daha önemli hale gelmiştir. T hücrelerinin farklılaşması ve aktivasyonu, üç farklı reseptör tarafından iletilen sinyallere bağlıdır.

Bunlar arasında TCR'ler (sırasıyla MHC-II tarafından sunulan antijenlere ve MHC-I tarafından sunulan antijenlere yanıt veren CD4 ve CD8 reseptörleri dahil) (Q. Liu ve Gao, 2008), kostimülatör reseptörler ve sitokin reseptörleri yer almaktadır (Q. Liu & Gao, 2008). Bu sinyaller, naif T hücrelerini efektör veya bellek T hücrelerine yönlendirmektedir. Aktivasyon sonrasında T hücreleri, enfekte hücreler veya tümör hücreleri gibi aynı kökenli antijenin kaynağını yok etmek için sitokinler salgılar ve hedef hücreleri doğrudan öldürmektedir (Smith-Garvin vd., 2009).

Naif T hücreleri, küçük hücre boyutu, düşük proliferatif hız ve düşük bazal metabolizma ile karakterize edilen bir hipoaktivite durumunda aktif olarak korunmaktadır. Naif T hücreleri, CD45RA ekspresyonu ve lenf düğümü homing (lokalizasyon) belirteçleri CD62L ve CCR7'nin ekspresyonu ile tanımlanmaktadır. Bu işaretler sayesinde naif T hücreleri yüksek endotelial venüllerden ayrılır ve DC tarafından sunulan antijenlerle karşılaştıkları periferik lenf düğümlerini T hücre bölgelerine taşırlar. Antijen deneyimli T hücreleri, CD45RA ifadesini azaltmakta ve CD45RO ifade etmektedir (Q. Liu vd., 2020). Naif T hücrelerin TEFF hücrelere farklılaştıktan sonra, TCR'lerinin aynı kökenli antijenle birleşmesi üzerine sitotoksik granülleri ve efektör sitokinleri salgılamaya hazır hale gelmektedir. TEFF hücreleri, CD27, CD28 ve lenf düğümü homing işaretleyicileri için negatifken, terminal T hücre aktivasyonu işaretleyicileri olan Öldürücü hücre lektin benzeri reseptör alt ailesi G üye 1

(Killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1; KLGR-1) ve NK işaretleyicisi CD57 gibi işaretleyicilere sahiptir (Klebanoff vd., 2006; Sallusto vd., 1999).

Genel olarak, bellek T hücreleri, TSCM hücreleri, TCM hücreleri ve TEM hücrelerini içermekte ve bunlar farklı özel fenotiplere sahiptir. TSCM hücreleri, naif T hücrelerine kıyasla artan CD95, IL-2R β , CXCR3 ve LFA-1 seviyelerini eksprese etmektedir (Gattinoni vd., 2011). TCM hücreleri ve TEM hücreleri genellikle CCR7 ifadesi ile ayırt edilmekte ve fonksiyonlarına göre ayrılmaktadır (Sallusto vd., 1999, 2004). TCM hücreleri (CD45RO⁺CCR7⁺CD27⁺CD28⁺CD62L^{hi} fenotipi ile karakterize edilen) genellikle lenfoid organlarda lokalizedir ve doğrudan lizis fonksiyonuna sahip değildir, oysa TEM hücreleri lenfoid olmayan dokularda bulunur, lizis aktivitesine sahiptir ve CD62L^{lo}CCR7⁻ dir (Unsoeld & Pircher, 2005).

TEM hücreleri, TCM hücrelerinden daha güçlü bir efektör işlevi görür ve iltihaplı dokulara göç için sorumlu reseptörleri daha yüksek düzeyde ifade eder (Geginat vd., 2001; Sallusto vd., 2004).

2.4.3. Bellek T Hücrelerinin Tümörlere Karşı Etkinliği

T hücrelerinin, naif, TSCM veya TCM immüno-fenotipleriyle yapılan ön klinik testlerde üstün *in vivo* etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Biasco vd., 2021; Q. Liu vd., 2020). TSCM hücreleri, bilinen hafıza hücre popülasyonlarıyla karşılaştırıldığında artan bir çoğalma kapasitesine sahiptir, bağışıklık yetersizliği olan konakçılarda daha etkili yeniden yapılanma (daha etkili yeniden yapılanma) gerçekleştirmektedir (Gattinoni vd., 2011). TCM hücreleri, *in vitro*'da daha yüksek düzeyde sitokin üretmekte ve TEFF hücrelerine göre farelerdeki tümörleri yok etme yeteneğinde üstündür (Klebanoff vd., 2006; Sallusto vd., 1999). Yapılan bir başka çalışmada, TCM hücrelerinin *in vivo*'da TEM hücrelerinden daha uzun süre varlığını sürdürdüğü görülmüştür (Berger vd., 2008). Ayrıca, TCR transgenik farelerden elde edilen saf hücre fenotipine sahip T hücreleri, olgun T hücre karşıtlarına kıyasla tedavi sonrası gelişmiş anti-tümör aktivite sergilemiştir (Hinrichs vd., 2009).

IL-15'in varlığında kültüre edilen fare CD8⁺ T hücreleri, IL-2 ve T hücrelerinin hafıza fenotiplerine farklılaşmasını teşvik etmektedir. Tümör sitotoksitesinin, yalnızca IL-2 varlığında kültürlenen hücrelere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Klebanoff vd., 2004, 2006).

Hafıza T hücrelerinin üstün anti-tümör aktivitesi çeşitli faktörlere bağlı olabilir. Birincisi, hafıza T hücreleri, antijenin 100 kat daha düşük dozlarına yanıt verebilir ve kostimülasyon varlığında daha hızlı yanıt verirler. Bu durum, bellek T hücrelerinin naif T hücrelere kıyasla düşük aktivasyon eşiklerine sahip olduğunu göstermektedir (Lanzavecchia & Sallusto, 2001). Antijen dozu ve kostimülasyon seviyesine bağlı olarak, naif T hücrelerinin aktivasyonu için 6 saatten ≥ 30 saate kadar TCR stimülasyonu gerekebilirken, hafıza T hücreleri 0.5 saatten 2 saate kadar aktive olabilmektedir (Lanzavecchia & Sallusto, 2001). İkincisi, hafıza T hücreleri lenf düğümlerine göç etme kapasitelerini artırmışlardır. Bellek T hücreleri, lenf düğümü reseptörü CCR7'yi eksprese ettiğinden, dendritik hücrelerin (DC'ler) MHC molekülleri bağlamında kendilerine antijen sunabildiği lenf düğümlerine göç edebilirler. Üçüncü olarak, hafıza T hücrelerinin çok uzun süreler boyunca varlığını sürdürme yetenekleri vardır. Bu konudaki çalışmalar, TCM hücrelerinin on yıldan daha uzun süre dayanma yeteneğine sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Dördüncü olarak, bellek T hücreleri periferik dokulardaki birincil bağışıklık sistemini izlemektedir. TCM hücreleri, sağlıklı, iltihaplanmamış insan derisi, kolon, akciğerler ve rahim ağzı (serviks) dokularında bulunmaktadır.

Son olarak, Treg hücreleri tümör mikroçevresinde bulunur ve hafıza T hücrelerinin fonksiyonlarını engelleme yetenekleri nispeten zayıftır (Yang vd., 2007). Birkaç çalışma, hafıza T hücrelerinin hızlı hatırlama yeteneğinin, uygun genleri kodlayan DNA'ya bağlanma yeteneği tarafından aracılık edildiğini ve bunun yerel kromatin durumu tarafından epigenetik olarak düzenlendiğini göstermiştir. NF- κ B, hem saf hem de hafıza T hücrelerinde benzer seviyelerde aktive olur ve nükleusa taşınır, ancak sadece hafıza T hücrelerinde DNA'ya bağlanabilir ve Ifng'nin ekspresyonunu indükleyebilmektedir (Lai vd., 2011). İnsan CD4⁺ alt küme hafıza, TCM ve TEM hücrelerinin sitokin üretme yetenekleri, bu genlerin promotörlerinde ve gen transkripsiyonu hızlandırıcı/enhancer'lerinde bölgelerinde pozitif kromatin modifikasyonlarının varlığı ile ilişkilendirilmiştir (Barski vd., 2017).

2.5. T hücrelerinin Anti-Tümör Özellikleri

Kanser immünolojisi ve kanser immünoterapisi, tümöre özgü antijenleri hızlı ve spesifik bir şekilde tanıma yeteneğine dayanmaktadır (Hung vd., 1998). T hücreleri vücutta dolaşırken, T hücre reseptörlerini indükleyen MHC-sınıfı peptit komplekslerini taramaktadır.

Dendritik hücreler (DC'ler) gibi antijen üreten hücreler, tümör tanımlı T hücrelerini aktive edebilmektedir. Ayrıca T hücreleri, tümör hücrelerinin yüzeyindeki antijenleri doğrudan tanıyabilmektedir (June, 2007). Birkaç çalışma, CD4+ hücrelerin MHC I sınırlı (restriktif) CD8+ sitotoksik lenfositlerin tam aktivasyon ve efektör fonksiyon elde etmesi için kritik olduğunu göstermiştir. Ayrıca, CD4+ hücreler, antijen spesifitesi olmayan efektör hücreler için antijen özgü tanıma kapasitesine sahip değildir. Bu nedenle, klinik tümör aşı denemeleri için *in vitro*'da tümör hücrelerini parçalayan MHC I sınırlı (restriktif) CD8+ hücreler kullanılabilir (Hung vd., 1998; Schreiber vd., 2011).

2.5.1. CD4+ T Hücrelerinin Kanser İmmünoterapisindeki Rolü

MHC sınıf-1 reseptör kompleksleri aracılığıyla tümör hücrelerini tanımları ve tümör hücrelerini tanıdıktan sonra doğrudan parçalama potansiyeli nedeniyle kanseri ortadan kaldırmak için CD8+ T hücrelerine odaklanan çalışmalar bulunmaktadır (Toes vd., 1999). Ancak birçok çalışma, CD8+ T hücrelerinin, efektör aktiviteleri için CD4+ T hücrelerini kullandığını ve antijen sunan hücreler denilen APC'lerin yardımıyla fonksiyonel potansiyellerini koruduklarını göstermiştir (Bennett vd., 1997; Keene & Forman, 1982). Tümör spesifik CD4+T hücreleri, IL-2 sinyali aracılığıyla CD8+T hücrelerinin etkinliklerini artırır, proliferasyonlarını teşvik eder ve tümör bölgesine çekilmesini sağlamaktadır (Bos & Sherman, 2010). Ayrıca, CD4+ T hücre yanıtları, CD8+ T hücrelerinin ikincil genişlemesini ve hafıza T hücrelerinin oluşumunu destekler (Janssen vd., 2003). Ayrıca CD4+ hücreleri, DC aktivasyonu üzerine sitokinler (IFN- γ ve TNF- α) gibi efektör molekülleri salgılayarak tümör hücrelerini doğrudan öldürür (Kennedy & Celis, 2008). Naif CD4+ T hücreleri, DC'lerle etkileşimlerine ve sitokinlere maruz kalmalarına bağlı olarak birçok alt hücre grubuna (Th1, Th2, Th9, Th22, Treg, Th17 ve Tfh) farklılaşabilmektedir (Schmitt & Ueno, 2015). Bu hücre hatlarının farklılaşması, spesifik sitokin sinyalleme ve epigenetik modifikasyonlar tarafından düzenlenen belirli transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (Luckheeram vd., 2012). Th1 hücreleri, antijen uyarımı üzerine CD8+ hafıza T hücre gelişimini artıran IL-2 üretme eğilimindedir (Luckheeram vd., 2012). IL-4 ve IL-2, naif T hücrelerinden Th2 uyarmasını indüklerken, IL-4 tarafından indüklenen STAT6, ekspresyonu artırmaktadır (Luckheeram vd., 2012).

2.5.2. Kanser immünoterapisinde CD8+ sitotoksik T lenfositleri

Kanser immünoterapisinin temelini oluşturan sitotoksik CD8+ T hücreleri, adaptif bağışıklık sisteminin anti-kanser bağışıklık tepkisinde en güçlü etkenlerden biridir (Raskov vd., 2021). CD8, sitotoksik T lenfositlerde ifade edilen bir transmembran glikoprotein olup, anti-kanser bağışıklıkta hayati bir rol oynamakta ve patojenlerin ve neoplastik hücrelerin başlıca öldürücüleridir (Farhood vd., 2019; Raskov vd., 2021). Genetik olarak yeniden yapılandırılmış bir reseptör türü olan CAR, adoptif hücre transferi (ACT) sırasında CD8+T hücreleriyle birlikte kullanılmaktadır (Hernández-López vd., 2021). Klinik deneylerde CAR-T hücreleriyle birlikte immün kontrol noktaları ve yolları araştırılmaktadır (Feins vd., 2019).

CD8+ sitotoksik T hücreleri, APC'leri veya diğer istenen hücreleri tanıyan antijenik peptitlere yüzeysel olarak bağlanır ve antijenleri veya hedef hücreleri yok etmek için MHC-1 moleküllerine bağlanmaktadır (Farhood vd., 2019; Raskov vd., 2021). Ayrıca, CD8+T hücreleri, tümör hücreleri ile etkileşime girer ve mekanik kuvvetin yardımıyla gözenek oluşturarak apoptoz başlatır: Granzimler, katepsin C ve perforin içeren ölüm indükleyici granüllerin birleşmesini sağlarlar (Dolina vd., 2021). Gözenekler ayrıca hedef veya tümör hücrelerinde perforin ve granülisin endositoz yoluyla oluşturulabilmektedir. Perforin ve granülizin, çeşitli granzimlerin sitoplazmaya iletilmesini sağlayan gözenekli bir endozomal membran oluşturmaktadır (Lopez vd., 2013). CD8+T hücreleri, hedef hücreler üzerindeki Fas reseptörüne bağlanan ve kaspazları ve endonükleazları tetikleyen Fas ligandını eksprese etmektedir. Bu, hedef hücre DNA segmentasyonuna sebep olmaktadır ve Fas ile ilişkili ölüm alanlarının aktivasyonuna neden olmaktadır (Karas vd., 2001).

2.6. T Hücre Aktivasyonu

T hücre aktivasyonu, antijenik peptitlerin major histokompatibilite kompleksi (MHC) moleküllerinde sunulması yoluyla TCR tanıma prensibine dayanmaktadır. TCR, bir MHC-antijenik peptit kompleksi ile etkileşime girdiğinde, hem moleküler hem de hücresel düzeyde T hücrelerinde değişiklikler meydana gelmektedir. Hücre içinde, çevresel sinyaller çeşitli sinyal iletim yollarına çevrilir ve belirli, spesifik transkripsiyon faktörleri çeşitli genleri aktive etmektedir (K. Shah vd., 2021). Bu farklı sinyal iletim yollarının entegrasyonu, enzimatik olmayan adaptör proteinlerin yardımıyla yapılır ve bunlar çeşitli protein-protein etkileşimleri için bir iskele görevi görür.

Bu süreç, proximalden distale sinyal iletim yollarını birbirine bağlamaya yardımcı olarak T hücrelerinin tam aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır (K. Shah vd., 2021).

2.6.1. TCR ve Ligandları

TCR, α ve β zincirleri veya γ ve δ zincirleri olmak üzere oldukça değişken iki zincirin bir heterodimeridir. TCR molekülünün yapısı, immünoglobulinin (Ig) Fab bölgesine oldukça benzerdir (Davis & Bjorkman, 1988; Rudolph vd., 2006). Her TCR α veya β zinciri, bir değişken (V) ve bir sabit (C) alandan oluşmaktadır. TCR α ve β zincirlerinin her bir V alanı, peptit-MHC kompleksi (pMHC) ile doğrudan etkileşime giren, en uzak uçlarda oldukça değişken üç tamamlayıcı belirleyici bölge düğümü (region loop) içermektedir (Rudolph vd., 2006b). $\gamma\delta$ TCR yapısı, $\alpha\beta$ TCR yapısına benzer, ancak $\gamma\delta$ TCR, geleneksel olmayan MHC'ler tarafından sunulan veya bir MHC tarafından sunulmayan antijenlere bağlanmaktadır. $\alpha\beta$ TCR yapısını taşıyan T hücrelerinin bolluğu nedeniyle (%95), TCR olarak anılacak yapı $\alpha\beta$ TCR'ye odaklanmaktadır.

$\alpha\beta$ TCR'yi ifade eden geleneksel T hücreleri, major histokompatibilite kompleksi sınıf I (MHC-I) veya sınıf II (MHC-II) tarafından sunulan peptidi tanımaktadır (Rudolph vd., 2006c). TCR'in, CD4 veya CD8 ko-reseptörlerinin pMHC'ye bağlanmasıyla, kognat pMHC'yi tanınması artmaktadır. TCR'nin düşük konsantrasyonda antijenik pMHC ile uyarılması sırasında, CD8'in non-antijenik pMHC'ye bağlanması da TCR sinyalini artırabilir. Ko-reseptörler, T hücre aktivasyonunu hem pMHC ile bağlanma hem de lenfosit özgü protein tirozin kinazı (Lck) ile ilişkilendirme yoluyla artırır. Lck, TCR sinyalini başlatan ana Src ailesi kinazıdır (Palacios & Weiss, 2004).

Sinyal 1, TCR tarafından antijen tanıma sonrasında hemen genellikle LCK tarafından başlatılır. LCK, ITAM'lar olarak adlandırılan iki Yxx(I/L) motifi arasında altı ila sekiz amino asit bulunan kanonik immün reseptör aktivasyon alanlarında bulunan tirozinleri fosforile etmektedir (Love & Hayes, 2010; Reth, 1989). LCK ayrıca CD4/CD8 ortak reseptör alımını da kolaylaştırmaktadır, bu da TCR-peptit:MHC etkileşimini güçlendirmekte ve daha fazla LCK'nin toplanması için pozitif bir geri bildirim döngüsü oluşturmaktadır (Casas vd., 2014; N. Jiang vd., 2011). Bu, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ ve CD3 ζ zincirlerinde bulunan TCR kompleksindeki 10 ITAM'ın fosforile edilmesiyle sonuçlanmaktadır (Nika vd., 2010; Philipsen vd., 2017).

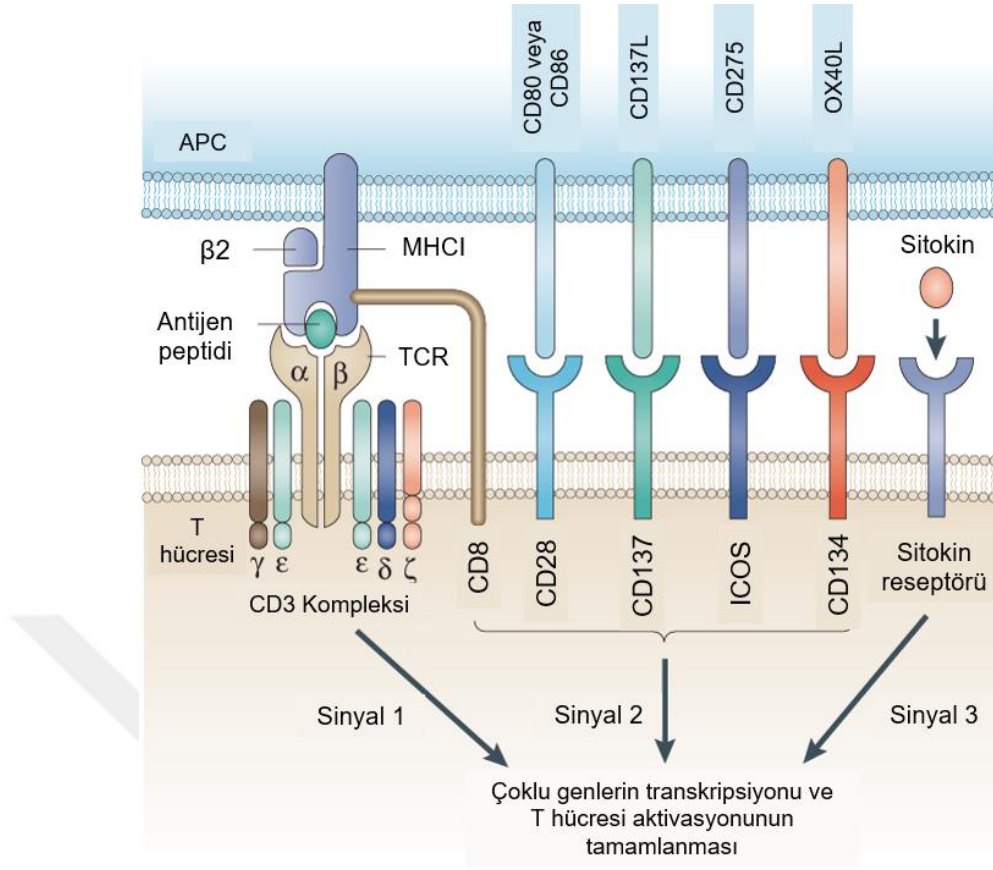
Bu ITAM'lar daha sonra Src homoloji 2 (SH2) ve SH3 içeren kinazlar gibi ZAP-70, LAT, SLP-76 ve fosfolipaz C- γ (PLC- γ) gibi sinyal ileten proteinlerin alımı ve aktivasyon bölgeleri olarak hizmet etmektedir (Casas vd., 2014; Gaud vd., 2018; N. Jiang vd., 2011; Love & Hayes, 2010; Nika vd., 2010; Philipsen vd., 2017; Reth, 1989). Hemen hemen tüm Kimerik Antijen Reseptör (CAR) yapıları, üç ITAM motifi içeren intrasellüler CD3 ζ alanını içermektedir (Eshhar vd., 1993); bunlar genellikle CAR yapılarında bulunan tek ITAM'lardır. Bu nedenle, endojen TCR kompleksi 10 ITAM içerirken, CAR'lar 3 (veya dimerize olurlarsa 6) ITAM içermektedir. CAR'lar ko-reseptörlerle etkileşime girmediğinden, CD3 ζ ITAM'lerin ko-reseptörden bağımsız fosforilasyonu CAR aktivitesinin başlatılması için kritik olabilir. Ayrıca ITAM motifinin sayısı ve yeri CAR-T hücre fonksiyonu için önemlidir. Çalışmalar ITAM sayısını 3'ten 6'ya veya 10'a çıkarmanın CAR aktivasyonunu artırabileceğini göstermiştir (J. R. James, 2018). CD3 ζ ITAM'lar fosforile olduktan sonra, ZAP-70, çift SH2 alanına sahip olan ZAP-70'un çift SH2 alanları aracılığıyla bağlanır ve bunun sonucunda bilinen bir dizi substratı, LAT, SLP-76 ve PLC- γ dahil olmak üzere fosforile etmektedir. ZAP-70, SLP-76 ve PLC- γ 'nin aynı zamanda CAR ligasyonu sonrasında fosforile olduğu gösterilmiştir (Ramello vd., 2019; Salter vd., 2018).

Sinyal 2; T hücrelerinin en iyi aktivasyonu sağlamak ve enerjii önlemek için kostimülasyona ihtiyaç duyar. Sinyal 1'in başlatılmasından sonra T hücreleri sinyal 2'ye ihtiyaç duymaktadır (Otten & Germain, 1991). Endojen T lenfositlerin kostimülasyonu genellikle, B7.1 ve B7.2 ligandları aracılığıyla T lenfositlerin APC'lerle temas noktasına toplanan CD28 tarafından sağlanmaktadır. CD28'in ligasyonu, membran-proksimal YNM motifinin SFTK tarafından fosforilasyonuna neden olur ve bu da PI3K'nin p85 alt biriminin AKT'ye bağlanmasını ve aktive olmasını sağlamaktadır. Bu durum ise, mTOR (Laplane & Sabatini, 2013), glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) (Maurer vd., 2014) ve GRB2-SOS (Boomer & Green, 2010) gibi distal sinyal iletim kaskadlarının başlatılmasına yol açmaktadır.

CAR'lar tipik olarak bir (ikinci nesil) veya iki (üçüncü nesil) membran-proksimal kostimülasyon alanını ekleyerek seri halinde kostimülasyon sağlamaktadır. En yaygın kullanılan alanlar CD28 ailesinden (CD28 ve ICOS) veya TNFR ailesindendir (4-1BB, CD27, OX40). CD28 ailesi ve TNFR ailesi moleküllerinin endojen bağlamlarındaki işleyişi arasındaki çarpıcı farklar göz önüne alındığında, CD28 ve 4-1BB kostimülatör

kısımlarını içeren tasarlanmış CAR-T hücrelerinin farklı şekilde işlev görmesi beklenmektedir. Veriler, bu CAR yapılarından farklı sinyallerin başlatıldığını göstermektedir. Proksimal sinyal yollarının spesifik incelemesi ayrıca sinyal transdüserinin ve transkripsiyon 3 (STAT3) ve PI3K aktivatörünün daha fazla aktivasyonunu göstermektedir (Salter vd., 2018). Bununla birlikte, CAR ligasyonu tarafından başlatılan sinyalleşme basamaklarının kapsamlı analizleri henüz başlangıç aşamasındadır ve ko-stimülasyonel alanların sinyal 1 alanlarıyla nasıl birleştirildiğinin sonuçları henüz aydınlatılmamıştır (Lindner vd., 2020).

Sinyal 3, T hücrelerinde sinyal 1 ve 2'nin uyarılmasından sonra başlar ve sitokinler gibi çözünebilir faktörler tarafından yönlendirilmektedir (Courtney vd., 2018). Sinyal 3, optimal T hücresi aktivasyonu için gereklidir (Curtis vd., 1999) ve yaygın olarak tam CAR-T hücresi fonksiyonu için gerekli olarak görülmektedir (Fraietta vd., 2018). Üretim sırasında, IL-2, IL-7 ve IL-15 gibi sitokinler CAR-T hücrelerini uyarmak için kullanılmaktadır (Vormittag vd., 2018; Xu vd., 2014). CAR-T hücresi terapötik aktivitesinin yanı sıra optimal transdüksiyon için de proliferasyon gereklidir (X. Wang & Rivière, 2016). *In vivo*'da optimal CAR-T hücresi aktivitesinin önemli bir bileşeni sitokin sinyalleşmesidir. IL-6/STAT3 sinyalleşmesi, anti-kronik lenfositik lösemi (CLL) CAR-T hücresi aktivitesini artırırken, IL-2, IL7, CCL19 ve IL-15 gibi sitokin sinyallerini ekzojen olarak sağlamaktadır (Fraietta vd., 2018). Çok sayıda araştırmacı, CAR-T hücrelerinin hayatta kalma, kalıcılık ve anti-tümör özelliklerini geliştirmek için sinyal 3'ü doğrudan CAR tasarımına entegre etmek için çalışmaktadır (Kagoya vd., 2018).



Şekil 3. T hücre aktivasyon sinyalleri (Sinyal 1-2-3) (Kershaw vd., 2013).

2.6.2. T Hücre Aktivasyon Reaktifleri

Yıllar içinde, T hücrelerini *in vitro* olarak uyarmak için birçok yöntemi geliştirilmekle beraber, bu yöntemlerin çoğu, yeterli hücrel sinyal iletimini başlatan, etkili aktivasyonu, çoğalmayı ve farklılaşmayı sürdüren TCR ile etkileşimi hedeflemektedir (Huppa & Davis, 2003). Stimülasyon, sadece bağışıklık hücrelerinin uzun süreli kültürünü sağlamakla kalmaz, aynı zamanda genetik modifikasyon metodlarının verimliliğini de artırmaktadır (Riddell & Greenberg, 1990; Schober vd., 2019). Sonuç olarak, T hücre aktivasyonu, genetiği değiştirilmiş T hücrelerinin üretiminde bir aşamadır (Vormittag vd., 2018). T hücre stimülasyon reaktifini doğru seçmek, yeterli T hücre tepkilerini indüklemek için önemlidir. T hücre aktivasyonu için birçok reaktif geliştirilmiştir. Bunlar, PHA mitojeni gibi daha az spesifik reaktiflerden, anti-CD3 monoklonal antikorlar gibi daha hedefli reaktiflere ve antikor kaplı mikroküreler/boncuklar gibi klinik GMP dereceli reaktiflere kadar uzanmaktadır (Poltorak vd., 2020).

Literatürde kullanılan tipik poliklonal uyaranlar, heterojen bir birincil T hücresi popülasyonunu aktive edebilen ve en az iki değerlikli anti-CD3 ve anti-CD28 antikorlarına dayanmaktadır. Tek başına TCR'nin ligasyonu (sinyal 1) tam T hücresi aktivasyonunu indüklemeyeceği için yanıt vermeyen bir durumla sonuçlanacaktır. Bu nedenle, TCR ile birlikte ortak uyarıcı reseptörlerin (en önemlisi CD28) destekleyici sinyaller iletilmesi gerekmektedir. CD28 aracılı kostimülasyon, hayatta kalmayı, klonal genişlemeyi ve farklılaşmayı teşvik eden TCR sinyalleriyle sinerji oluşturmaktadır (Lenschow vd., 1996; Rudd vd., 2009). TCR ve CD28 aracılı sinyallemeye (sinyal 1 ve 2) dışında, T hücresi uyarımının sonraki aşamaları, IL-2 (sinyal 3) gibi sitokinler tarafından kolaylaştırılmaktadır. Bu nedenle medya bileşimi, sitokin ortamı, kültür yöntemi ve donör hücreleri gibi çeşitli kültür parametrelerinin aktivasyon gücünü etkileyebileceğini belirtmek önemlidir.

2.6.2.1. Anti-CD3&anti-CD28 ile Aktivasyon

Anti-CD3&anti-CD28 ile aktivasyon, zenginleştirilmiş T hücresi popülasyonlarını veya periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC'ler) insan T hücrelerini aktive etmek ve genişletmek için tasarlanmıştır. CD3'e karşı antikorlar, çok sayıda T hücresi çoğalma protokolünün önemli bir bileşenidir. Yüzeye immobilize edildiğinde anti-CD3, T hücresi reseptör kompleksi (sinyal 1) yoluyla güçlü bir proliferatif sinyal iletmektedir ancak ek ko-stimülatör sinyallerin (sinyal 2) olmaksızın, ortaya çıkan proliferasyonu sıklıkla erken T hücresi apoptozu veya anerjisi takip etmektedir (Schwartz, 1990). Anti-CD3'ü ve anti-CD28'i immobilize ederek hem sinyal 1'i hem de kostimülatör sinyal 2'yi aynı anda ileten, proliferasyonu erken hücre ölümünü tetiklemeden artırabilen bir yöntem geliştirilmiştir (Levine vd., 1997).

Çoğalan hücreler ayrıca sitokin salınımını artırma ve hedef hücreleri MHC kısıtlamasız bir şekilde lizis etme yeteneği göstermektedir (Garlie vd., 1999). Sonuç olarak, anti-CD3 ve anti-CD28 ile kaplanmış manyetik boncukların (TransAct), immün sistemi baskılanmış kanser hastalarında T hücresi bağışıklığını artırmak için deneysel olarak kullanılan uygun bir reaktif olduğu kanıtlanmıştır (Laport vd., 2003; Rapoport vd., 2005). Bu araştırmalar, boncukların fonksiyonel T hücrelerini çoğaltmak için kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, *in vivo* infüzyondan sonra da bazı fonksiyonel T hücreleri varlığını sürdürebileceği kanıtlanmıştır (Li & Kurlander, 2010).

2.6.2.2. Phytohemagglutinin (PHA) ile Aktivasyon

T hücrelerinin zarlarına bağlanıp, metabolik aktiviteyi başlatan ve hücre bölünmesini teşvik eden PHA, *Phaseolus Vulgaris* adı verilen kırmızı barbunya fasülyesinden elde edilen bir lektindir (Movafagh vd., 2011). Retroviral transdüksiyon protokollerinde PHA, yaygın olarak kullanılan poliklonal bir uyarıcıdır (Duarte vd., 2002). İnsan CD8+ T hücrelerinin uzun süre (> 3 hafta) kültüre edilmesi zordur. PHA, TCR/CD3 kompleksine bağlanarak anti-CD3 antikorları tarafından başlatılan tüm hücre içi aktivasyon olaylarını taklit etmektedir (Faguet, 1977). PHA, CD8+ TCM ve CD8+ TN hücrelerinde artış göstermiştir. Daha da önemlisi, efektör fenotipini sergileyen CD8+CCR7-TEM ve TEFf alt kümelerinde, sitotoksik kapasite ve performans ifadesi dahil olmak üzere artışa neden olmuştur. Yapılan çalışmalar, IL-15 ile canlı CD8+ T hücrelerinin kültürde ideal canlılığını 21 güne kadar koruyabileceğini göstermiştir. Ancak, IL-15 ve PHA'yı birleştirerek CD8+ T lenfositlerinin kültürde 90 güne kadar daha uzun süre kültüre edilebileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Isabel Da Cunha & Terra, t.y.).

PHA, hücre proliferasyonunu teşvik etmesine rağmen, IL-15 (Bulfone-Paus vd., 1997) tarafından inhibe edilebilen Fas-FasL etkileşimleri nedeniyle hücre apoptozisini de teşvik etmektedir (Kabelitz & Janssen, 1997). PHA ve IL-15 sitokin sinyalleşmesinin birleşimi, CD8+T hücrelerinin büyümesi ve genişlemesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır (Dubois vd., 2002; Fehniger vd., 2001; Villinger vd., 2004). Bu sebeple, CAR-T hücre üretim ve çoğaltımında besiyerinde IL-15 sitokini de eklenerek, etkinlik kapasitesinin korunması sağlanmaktadır.

Kolanjiokarsinom'a karşı geliştirilen CAR-T hücre tedavisinde T hücrelerinin aktivasyonu PHA ile sağlanmakla beraber üç gün süren PHA aktivasyonundan sonra hücre genişlemesi (cell expansion) akış sitometrisi ile tespit edilmiştir. Transdükte edilmemiş T hücrelerine kıyasla anti-MUC1-CAR-T hücrelerinin transdüksiyon verimliliğinin >%50 olduğu gösterilmekle birlikte, anti-MUC1-CAR-T hücreleri >%60'ın üzerinde öldürme aktivitesini göstermiştir. Anti-MUC1-CAR-T hücrelerinin fenotiplerini diğer hücrelerle karşılaştırmak için hücreler, aktivasyon öncesi (aktif olmayan PBMC'ler), aktivasyon sonrası (PHA ile aktive edilmiş lenfositler) ve transdüksiyon sonrası (anti-MUC1-CAR-T hücreleri) akış sitometrisi ile analiz edilmiştir.

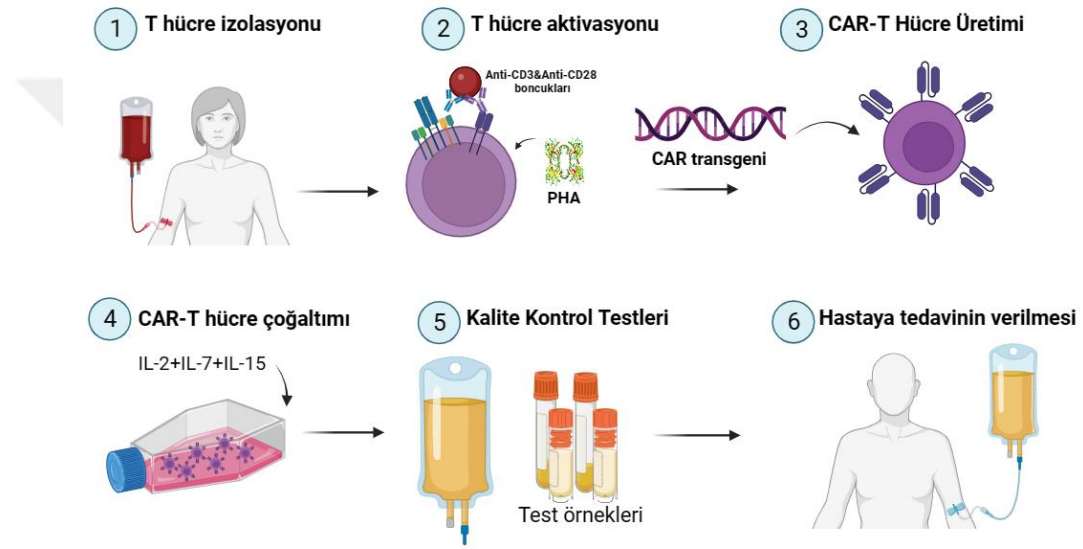
Sitotoksik T (CD3+ CD8+) hücreleri, PHA ile aktive edilmiş lenfositlerde ve anti-MUC1-CAR-T hücrelerinde, aktive edilmemiş PBMC'lere kıyasla önemli ölçüde artmıştır. PHA ile aktive edilen hücreler ve anti-MUC1-CAR-T hücreleri, aktive edilmemiş PBMC'lerle karşılaştırıldığında, hem CD25+ hem de CD69+ aktivasyon belirteçlerinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Supimon vd., 2021).

2.7. Kanser ve CAR-T Hücre Tedavisi

Kanser, dünya genelinde ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir ve 2020 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) yaptığı çalışmada kanserle ilgili yaklaşık 10 milyon ölüm rapor edilmiştir (Ferlay vd., 2021). Şu anda mevcut kemoterapi ve radyasyon gibi geleneksel kanser tedavileri etkili olsa da sağlıklı hücrelere zarar vermekte ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Son yıllarda lösemi/lenfoma kanseri olan hastalara umut sağlayan önemli gelişmelerden biri ise, süregelen bu geleneksel yöntemlerin aksine kanserin tedavisi için hastanın kendi vücudundan veya bir donörden alınan hücrelerin kullanımını içermektedir (Ahmad vd., 2023; Jogalekar vd., 2022). Kanser immünoterapisinin en umut verici yöntemlerinden biri CAR-T veya uzun adıyla kimerik antijen reseptörü T hücre tedavileridir. CAR-T hücre tedavisi, kanser hücrelerinin yüzeyindeki spesifik antijenleri tanımak ve CAR eksprese etmek için T hücrelerinde genetik mühendisliği içermektedir.

CAR-T hücreleri, kanser hücresine bağlandığında intraselüler sinyal alanını etkinleştirir ve T hücrelerini çoğalmaya ve kanserli hücreleri öldürmesini sağlayan sitokinleri salgılamaya teşvik eder (Labanieh vd., 2018). CAR-T hücre tedavisinin süreci, T hücrelerinin toplanması ve izole edilmesi, *ex vivo* kültür için T hücresi aktivasyonu (genellikle CD3 ve CD28 uyarımı yoluyla), CAR ekspresyonunu indüklemeye yönelik genetik modifikasyon çalışmaları, istenilen sayıda hücreye ulaşmak için CAR-T hücrelerinin çoğaltılması (genellikle IL-2 veya IL-7 ve IL-15 eklenmesi), CAR-T hücre tedavisi kalite kontrol testlerinin yapılması, hastaya uygulanması/infüzyon adımlarını içermektedir (C. Aparicio vd., 2023) (**Şekil 4**). Hastanın kanından T hücrelerinin elde edilmesi, CAR-T üretim sürecinin ilk adımıdır. T hücrelerini toplamak için hastaya lökoferez adı verilen bir işlem uygulanmaktadır. Bu işlem ile beyaz kan hücreleri uzaklaştırılmaktadır. Ardından, lökoferezle elde edilen T hücreleri; kırmızı kan hücreleri, trombositler ve plazma gibi diğer kan hücrelerinden ayrılarak hastanın kan dolaşımına geri verilir. Bu işlem için özel bir makine kullanılmaktadır (Schwella vd., 2003).

T hücreleri toplandıktan sonra, CAR genini ifade etmek üzere genetik mühendislik çalışmaları yapılmaktadır. Viral (lentivirüs veya retrovirüs) veya viral olmayan (transpozonlar veya CRISPR-Cas9) gen transfer sistemleri kullanılarak CAR geni T hücrelerine transdükte edilmektedir (McGuirk vd., 2017; Milone vd., 2009; Pang vd., 2018). Gen transferinden sonra, CAR ifade eden T hücrelerinin ex vivo olarak çoğaltılmaktadır. Genetiği değiştirilmiş ve çoğaltılan T hücreleri, hastanın kan dolaşımına tekrar infüze edilmeye hazırdır. Hastanın kan dolaşımına verilen CAR-T hücreleri, kanserin bulunduğu bölgeye doğru hareket eder ve CAR tarafından tanınan hedef proteini gösteren kanser hücrelerini tanımayla ve yok etmeye başlar (Pang vd., 2018).



Şekil 4. CAR-T hücre üretimi ve uygulama süreci.

2.7.1. Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) ve CAR-T Hücresi

Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) T hücreleri, T hücrelerini tümör hücrelerinde bulunan belirli bir antijene yönlendiren mühendislik ürünü füzyon proteinleridir ve bu sayede anti-tümör bağışıklık yanıtı oluştururlar (Kochenderfer & Rosenberg, 2013; Sadelain vd., 2017). CAR hücreleri, antikor ve TCR'ın sentetik olarak birleştirilmiş hibrid T hücre reseptörleridir (Poondla vd., 2022). CAR'ın tümör antijeni ile bağlanmak ve T hücre aktivasyon işlevleri vardır (Maus & Levine, 2016). CAR'lar, bir transmembran alan, bir spacer veya menteşe alan, hücre dışı bir ligand bağlama alanından (en yaygın olarak tek zincirli değişken faktör (scFv)) ve hücre içi sinyal iletim alanından oluşmaktadır (Şekil 5).

CAR tasarımıındaki ilk konsept, bu ligand tanıma alanını, T hücre aktivasyonunu antijen bağlandığında tetiklemek için CD3ζ zincirinin bir kısmından oluşan bir hücresel sinyalleme modülüne bağlamaktı (Eshhar vd., 1993; Jensen & Riddell, 2015). Şu anda birinci nesil CAR olarak bilinen en basit CAR formu, bu iki modülü bir transmembran bölgesi ve ekstraselüler menteşe bölgesi aracılığıyla birleştirir. TCR CD3ζ zinciri, 3 ITAM içermektedir (Wange & Samelson, 1996), bu nedenle bu zincir yalnız başına TCR-CD3 kompleksi (γ, δ ve ε zincirleri) diğer bileşenleri olmadan güçlü bir “sinyal 1” sağlayabilir (Geiger vd., 1999; Haynes vd., 2001). Birinci nesil CAR'lar, çoğu durumda CD3ζ sitoplazmik alan olan tek bir etkinleştirici alan içerirken, birkaç çalışma Fc reseptörlerinin γ zincirini kullanmıştır. İkinci nesil CAR'lar genellikle CD28 ve 4-1BB gibi doğal yardımcı uyarıcı moleküllerden elde edilen ortak uyarıcı alanlara bağlı bir etkinleştirici alan (Fc reseptörlerinin CD3ζ/γ zinciri) içermektedir. Yapılan çalışmalar, CD3ζ'yi iki kostimülatör alanla birleştiren üçüncü nesil yapıların geliştirilmesini sağlamıştır (Jayaraman vd., 2020). Son zamanlarda, immünoterapi, çeşitli malignitelerde etkili ve cazip bir terapötik strateji olarak görülmektedir. Kimerik antijen reseptörü (CAR)-T hücre ve CAR-NK (Doğal öldürücü hücreler; Natural Killer; NK) hücre terapisi, genellikle hematolojik malignitelerin tedavisinde önemli başarılar elde etmiştir (Maalej vd., 2023). CAR-T hücre immünoterapisi, 2017'den bu yana Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayı almaya başlayan, insan vücudunun biyomoleküllerine yüksek uyumlu, hayat kurtaran bir yaklaşım haline gelmiştir (Press Announcements FDA, 2017). CAR T-hücre immünoterapisi aşağıda yer alan bazı özelliklerden dolayı daha kabul edilebilir bir yaklaşım haline gelmiştir:

2.7.1.1. Major histokompatibilite kompleksi (MHC) bağımsızlığı

Sadece MHC veya MHC molekülleri olarak bilinen proteinlerden antijen işlenip sunulduğunda, T hücre yanıtı oluşur. Antijenin tanınmasının ardından, tümörü ortadan kaldırmak için sinyal kaskadını başlatan üçlü kompleks, antijenik peptit, MHC ve T hücrelerinden oluşur. Ancak, sinyali aşağı regüle eden mekanizmalarda kusurlar vardır, bu da tümörün kaçmasına izin verir (Chmielewski vd., 2013). Bu sorunu çözmek için immünoterapi MHC'den bağımsız olmalıdır. Bu tedavi, MHC'nin aşağı regülasyonundan (down-regulation) yararlanabilen aynı bağımsız yöntemi kullanmaktadır.

2.7.1.2. CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin CAR TCR'ye yönlendirilmesi

T hücre alt tipleri olan CD4+ ve CD8+, hem MHC molekül kısıtlamasının sınıflarını saptarak hem de hedef hücre tanıma için yönlendirilebilir. CD4+ CAR ve CD8+ CAR-T hücreleri, seçilmiş hedeflere karşı güçlü sitotoksik hücrelerdir, ancak genellikle CD8+ CAR T hücrelerinin daha etkili olduğu bilinmektedir (Lustgarten vd., 1991).

2.7.1.3. Canlı ilaçlar

CAR-T hücre immünoterapisi, T hücrelerinin önce lökoferez yoluyla elde edilip daha sonra güçlü bir reseptöre dönüştürülerek lösemi veya lenfoma hastalarına infüze edilmesi nedeniyle bir "canlı ilaç" olarak bilinmektedir. Eğer infüzyon, T hücreleri alınan aynı hastaya yapılırsa, bu otojen infüzyon olarak adlandırılır, ancak hücreler farklı bir hastaya uygulandığında, bu allojenik infüzyon olarak adlandırılır. T hücreleri, CAR-T hücrelerinin üretim süreci sırasında etkinliğini (potency) kaybetmez. Bu CAR-TCR, yüzeyinde spesifik bir antijen bulunan kanser hücrelerini tanır ve öldürür. Persistansları, çoğalma kapasiteleri, sinyal başlatma ve antijen yüzeyinde mevcut olduğu sürece kanser hücrelerini etkili bir şekilde öldürme yetenekleri nedeniyle yüksektir (Miliotou & Papadopoulou, 2018). CAR-T hücreleri, en yüksek etkili tümör temizliği için tümör antijeni ile maksimum etkileşim ve yüksek çoğalma kapasitesine sahiptir (Ahmad vd., 2023).

2.7.1.4. Özgüllük

İmmün yanıt, yalnızca CAR ve hedef hücre arasındaki özel etkileşim sonucunda IFN- γ , IL-6 ve IL-15'in üretilmesiyle başlatılır (van der Schans vd., 2020). Bu özgüllük, antikorun scFv bölgesinin varlığından kaynaklanır. CAR'ın temel yapısında tek bir ζ zinciri bulunur ve bu da CAR-T hücrelerini hedeflerine karşı daha spesifik hale getirmekte ve çeşitli CAR-T hücre nesilleri geliştirilmektedir (Ahmad vd., 2023).

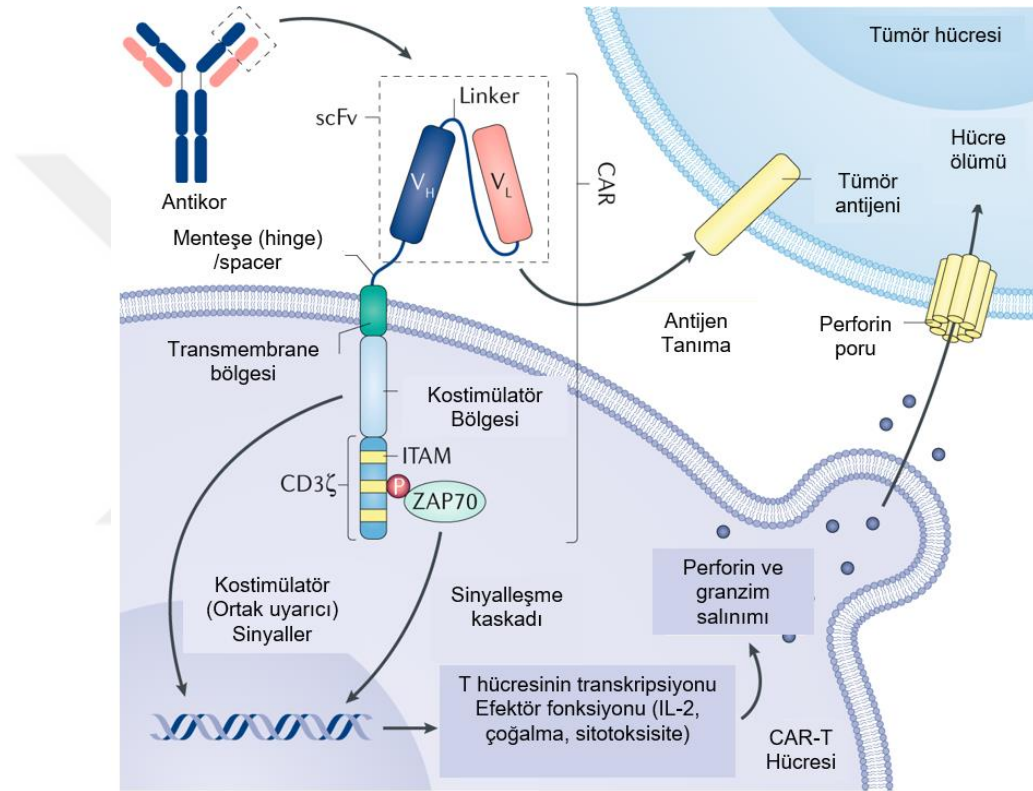
2.7.2. CAR Yapısı

Bir CAR'ın hücre dışı kısmı genellikle bir antikorun (scFv) tümör hedefine karşı olan değişken hafif (VL) ve değişken ağır (VH) bölgelerinden türetilmektedir (**Şekil 5**). Bu iki alan arasındaki bağlayıcı/linker genellikle tekrarlanan glisin ve serin kalıntılarından türetilmiştir, ancak Whitlow bağlayıcısı/linker gibi diğer bağlayıcı moleküller de kullanılmıştır (Whitlow vd., 1993).

Menteşe (hinge) (aynı zamanda spacer bölgesi olarak da adlandırılır), antijen tanıyan hücre dışı alanı transmembran bölgeye bağlamaktadır. Bu menteşe/hinge bölgesinin bir esnekliğe sahip olması, scFv alanının eşlenik antijenine bağlanmasına izin vermek için gereklidir. CD28 ve CD8'den türetilen alanlar da dahil olmak üzere çeşitli menteşe/hinge bölgeleri, CAR tasarımlarında kullanılmıştır (Brudno vd., 2020). CAR'ın transmembran kısmı, hücre zarı lipid çift tabakasını kapsamakta ve genellikle CD28 veya CD8'den türetmektedir. Bu alanın, orijinal proteinin endojen transmembran ilişkisine dayalı olarak homodimerler veya trimerler oluşturarak CAR'lar arasındaki moleküler etkileşimleri etkileyebileceği düşünülmektedir (Bridgeman vd., 2010; Schmidts vd., 2019). Tüm mevcut FDA onaylı CAR-T hücre ürünleri, CD28 veya 4-1BB ko-stimülasyon alanına sahip ikinci nesil bir tasarımıdır (Brentjens vd., 2013; Mullard, 2017). CD28 ve 4-1BB ko-stimülasyon domainlerinin yanı sıra diğer yaygın ko-stimülasyon alanları arasında OX40, CD27 ve Uyarılabilir T hücresi kostimülatörü (ICOS) bulunmaktadır (Guedan vd., 2014; Imai vd., 2004; Maher vd., 2002; Pulè vd., 2005; Song vd., 2012). CD3 ζ sitoplazmik bölgesi, CAR'ın en uzak iç kısmıdır. Bu molekül, fosforilasyon üzerine sinyal veren üç ITAM içermektedir (Feucht vd., 2019). CAR-T hücreleri, antijenin scFv tarafından tanınması sonucunda CAR moleküllerinin kümeleşmesine ve immobilizasyonuna neden olan bir aktivasyon sürecine girmektedir. CD3 ζ zinciri üzerindeki ITAM alanlarının fosforilasyonu, tıpkı TCR sinyali gibi, tirozin kinaz ζ ile ilişkilendirilmiş 70 kDa'lık bir protein (ZAP70) aracılığıyla sinyal başlatılmaktadır (Ramello vd., 2019). Bu, çoğalma, sitokin salınımı, metabolik değişiklikler ve sitotoksite de dahil olmak üzere bir T hücre etki yanıtını serbest bırakmaktadır. CAR-T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonlarını genellikle granzim ve perforin salgılayarak gerçekleştirdiği düşünülmekle birlikte, BH3 ile etkileşime giren alan ölüm agonisti (BID) ve FAS ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) gibi aşağı akış (downstream) moleküllerinin aktivasyonuna dayalı olarak ölüm reseptörlerinin de kullanıldığını gösteren bazı veriler vardır (Benmehbarek vd., 2019; Dufva vd., 2020; Singh vd., 2020).

Ko-stimülasyon alanından gelen sinyal, seçilen alanın özgül fonksiyonuna bağlıdır ve kanonik dizilerdeki belirli mutasyonlar tarafından modüle edilebilir (Guedan vd., 2020; Salter vd., 2018). CAR-T hücreleri, kanserli hücrelere spesifik olarak bağlanmak ve onları parçalamak için yeniden tasarlanmış hücre yüzeyi reseptörlerini kullanmaktadır (Jayaraman vd., 2020).

CAR'lar hücre dışı bir ligand bağlama alanından, çoğunlukla scFv, bir spacer alanından, bir transmembran alandan ve bir veya daha fazla sitoplazmik alandan oluşmaktadır (Sadelain vd., 2013). CAR yapısını oluşturan elementlerin tasarımı, CAR-T hücresi sinyal mekanizmalarına, efektör fonksiyonlarına ve bunun nihai etkinliğine ve toksisitesine katkıda bulunabilmektedir. scFv ve hücre içi sitoplazmik alanlar gibi modüllerin ligand tanıma ve sinyalleşmede anahtar rol oynadığı bilinirken, Spacer/hinge ve transmembran alanlar gibi sinyal vermeyen alanların da CAR fonksiyonlarını etkileyebileceği araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Jayaraman vd., 2020).



Şekil 5. Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) molekülü yapısı. CAR hücre dışı kısmı genellikle hedefe karşı olan bir monoklonal antikordan üretilir. Antikor dizisinden gelen değişken ağır (VH) ve değişken hafif (VL) zincirler, aynı zamanda tek zincirli değişken fragman (scFv) olarak bilinir, bir bağlayıcı ile birleştirilerek CAR molekülünün antijen spesifik bölgesini oluşturur. Menteşe (hinge) veya spacer bölgesi, scFv'yi hücre zarını aşan transmembran bölgeye bağlar. Hücre içinde, ko-stimülasyon alanı ve CD3ζ zinciri, CAR'ın scFv kısmı tümör antijenini tanıdığı ve bağlandığında sinyal verir. Ko-stimülasyon sinyalleri kullanılan ko-stimülasyon alanına bağlıdır: CD28, PI3K'ya bağımlıdır, 4-1BB ise tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü ile ilişkilendirilmiş faktörler (TRAF'lar) ve nükleer faktör-κB (NF-κB) gerektirir. CD3ζ zinciri, fosforilasyon (P) sonrasında ζ ile ilişkilendirilmiş 70 kDa'lık bir protein (ZAP70) aracılığıyla sinyal veren üç immün reseptör tirozin tabanlı aktivasyon motif (ITAM) alanı içerir. İlerleyen sinyal, T hücre etki fonksiyonlarına, perforin ve granzim salınımı da dahil olmak üzere, hedef tümör hücresinin ölümüne yol açar. (IL-2;interlökin 2)

2.7.2.1. Ligand bağlama bölgesi

CAR'ın hedef antijen özgülüğü, antijen bağlama alanı ile sağlanmaktadır. Monoklonal antikorların değişken ağır ve hafif zincirlerinden oluşan antijen bağlama alanları tek zincirli bir değişken fragman (scFv) oluşturmak için esnek bir linker kullanılarak bağlanmıştır. Klasik olarak, CAR yapılarında bulunan en yaygın ligand bağlama alanlarından biri olan scFv'ler, MHC bağımsız T hücresi aktivasyonuna neden olan hücrel yüzey kanser antijenlerini hedef alır, ancak MHC bağımlı, TCR taklit (mimic) CAR'lar kullanılarak hücrel tümörle ilişkilendirilmiş antijenlerin tanınması da tanımlanmıştır (G. Zhang vd., 2014).

scFv'nin basitçe hedef epitopa tanıma ve bağlanmanın ötesinde CAR fonksiyonunu etkileyen birkaç özelliği bulunmaktadır (Chailyan vd., 2011). Afinite, CAR fonksiyonunu belirleyen antijen bağlama alanının önemli bir parametresidir. CAR'ın antijen bağlama afinitesi, CAR sinyali başlatmak, T hücrelerini aktive etmek ve tümör hücrelerinde antijenleri tanımak için yeterince yüksek olmalıdır. Ancak, CAR ifade eden T hücresinin aktive edilmiş ölümüne ve toksisiteye neden olacak kadar yüksek olmamalıdır (Caruso vd., 2015; X. Liu vd., 2015). Benzer afinitelere sahip scFv'lerin bile CAR-T hücre fonksiyonunu farklı şekillerde etkileyebileceği gösterilmiştir. Bu, afinitenin şüphesiz en önemli faktörlerden biri olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, CAR'ın hedef antijenine bağlanmasını en üst düzeye çıkarmak için epitop konumu, hedef antijen yoğunluğu ve ligand bağımsız tonik sinyalle ilişkilendirilmiş scFv'lerden kaçınma gibi faktörlerin dikkate alınması gerekir (Stern & Stern, 2021).

CAR yapısını inceleyen çalışmalarda, afinite, avidite, antijen epitop konumu ve erişilebilirlik dahil olmak üzere ligand bağlama alanının kritik tasarım parametrelerinin yanı sıra bunların CAR-T hücresi işlevselliğini nasıl etkilediğini vurgulanmaktadır (Jayaraman vd., 2020). scFv afinitesi, CAR'ın özgülüğünü artırmak ve "hedef içi, tümör dışı" yan etkileri azaltmak için modüle edilmiş anahtar bir parametredir; bu, hedef antijen sağlıklı doku üzerinde her yerde eksprese edildiğinde özellikle önemlidir. Son olarak, CAR ifadesini kontrol etmek için çoklu moleküler mühendislik yöntemleri mevcuttur. Örneğin, EF-1 α promotörlü kendi kendini etkisizleştiren lentiviral vektörlerin, LTR (uzun terminal tekrarı) promotör bazlı gammaretroviral vektörlere kıyasla CAR ekspresyon seviyelerinde azalma ile sonuçlandığı gösterilmiştir.

scFv agregasyonu ayrıca, tonik sinyallemede yer aldığı CAR-T-hücre si aktivitesinin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Dolayısıyla aşırı tonik sinyalleme olarak tanımlanan antijenden bağımsız bir şekilde sinyal verme durumu, sonunda T hücrelerinin erken tükenmesine neden olabilmektedir (Gomes-Silva vd., 2017). scFv agregasyonu veya yanlış katlanmasının sebebi incelendiğinde, VH veya VL alanının düşük katlanma kararlılıklarından veya VH-VL arayüzünde hidrofobik kalıntıların açığa çıkmasından kaynaklanabileceği görülmüştür. scFv bağlayıcıları (linker), VH-VL alanı etkileşimini sterik olarak sınırlayabilir ve oligomerizasyona neden olabilmektedir (Ajina & Maher, 2018; Gil & Schrum, 2013).

2.7.2.2. Spacer Bölgesi

scFv'yi transmembran alana bağlayan ekstraselüler yapısal bir bölge, hinge veya spacer bölgesi olarak bilinmektedir. Bu bölge, etkinliği artırmaya ve esneklik özelliğini sağlamaya yardımcı olmaktadır. Hinge bölgesi, sterik engeli aşmak ve hedeflenen epitopa erişim sağlamak için esneklik sağlamak ve uzunluğa katkıda bulunmaktadır. Hinge bölgesinin uzunluğu ve kompozisyonundaki farklılıklar, CAR ekspresyonunu, sinyallemeyi, epitop tanımayı, aktivasyon sonuçlarının gücünü ve epitop tanıma yeteneğini etkileyebileceğinden, seçilen hinge dizisinin CAR'ın işlevselliğini önemli ölçüde etkilediği düşünülmektedir (Hudecek vd., 2015; Jensen & Riddell, 2015). Bu etkilerin yanı sıra, spacer uzunluğunun immunolojik sinaps oluşumuna izin vermek için yeterli hücre sel aralık sağlamak için kritik olduğu öne sürülmüştür (Srivastava & Riddell, 2015).

İlkeler açısından, "en uygun" spacer uzunluğu, hedef epitopun konumuna ve hedef hücredeki sterik engelleme düzeyine bağlıdır; uzun spacer dizileri ek esneklik sağlar ve membran-proksimal epitoplara veya kompleks glikozile epitoplara daha etkili erişim sağlarken, kısa hinge dizileri ise membran-distal epitoplara daha iyi bağlanma başarısını göstermektedir (Guest vd., 2005; Hudecek vd., 2015; S. E. James vd., 2008; Wilkie vd., 2008). Bununla birlikte, uygun spacer uzunluğu uygulamada genellikle deneysel olarak belirlenir ve her bir özel antijen bağlanma alanı çifti için özelleştirilmelidir (Guest vd., 2005; Wilkie vd., 2008). En sık kullanılan hinge bölgeleri CD8, CD28, IgG1 veya IgG4'tür. Bununla birlikte, IgG'den türetilen spacer'lar, Fcγ reseptörleri ile etkileşime girebileceği ve bu nedenle CAR-T hücre tükenmesine (depletion) neden olabileceği için, bu etkiler, farklı bir spacer bölgesi seçimi veya bu bölgenin fonksiyonel veya yapısal

hususlara dayalı olarak ilave mühendisliği yoluyla önlenebilmektedir (Almâsbak vd., 2015; Hombach vd., 2010).

Ek olarak, spacer bölgeleri CAR'ın yapısal konformasyonunu değiştirebilmektedir. Örneğin, bir araştırma, CD8 α hinge'nin uzunluğu kesilerek veya birkaç dizi eklenerek modüle edildiğini göstermektedir (Ying, Huang, vd., 2019). Bu değişiklikler, hücre dışı konformasyonu değiştirilmiş CAR'ların oluşumuna yol açarak *in vivo* ve *in vitro*'da önemli ölçüde farklı yanıtlara yol açmıştır. Çalışmada, *in vivo*'da şiddetli sitokin salınımı veya nörotoksisiteye neden olmayan modifiye edilmiş bir CD8 α hinge bölgesine sahip CAR'ı başarılı şekilde tanımlanmakla birlikte, bu modifikasyonların CD8 α 'ya mekanistik etkisi henüz anlaşılmamıştır. Bu çalışma spacer tasarımının CAR-T etkinliğine kritik bir katkıda bulunduğunu vurgulamaktadır (Jayaraman vd., 2020; Ying vd., 2019).

2.7.2.3. Transmembran Bölgesi

Endodomain'in membrana en yakın bileşeni olan ve membranı kaplayan hidrofobik bir alfa sarmalından oluşan transmembran alanı, CAR'ın tüm bileşenleri arasında, transmembran domain muhtemelen en az karakterize edilmiş bölgedir (Stern & Stern, 2021). CAR yapılarındaki transmembran alanları, CAR'ı T hücresi zarına bağlar ve ligand tanıma sinyallerini hücre içi sitoplazmik alana dönüştürmek için bir dayanak noktası görevi görmektedir. Daha spesifik olarak, yapılan çalışmalar, CAR transmembran domain'lerinin CAR ifade/ekspresyon düzeyini, stabilitesini etkilediğini, sinyalleme veya sinaps oluşumunda aktif olabileceğini ve endojen sinyalleme molekülleri ile dimerize olabileceğini öne sürmektedir (Bridgeman vd., 2010; Guedan vd., 2020; T. Zhang vd., 2012). Çoğu transmembran domain, CD3 ζ , CD4, CD8 α veya CD28 gibi doğal proteinlerden türetilmiştir. Transmembran domain genellikle ekstrasellüler spacer bölgesi veya intrasellüler sinyal domain'in gereksinimleri nedeniyle değiştirilir, bu nedenle bir transmembranın CAR işlevi üzerindeki etkisi hakkında çok az araştırma yapılmıştır. Özellikle, CD3 ζ transmembranın, CD3 ζ transmembran domain'inin CAR dimerleşmesini ve endojen TCR'lere entegrasyonunu aracılık ettiği için CAR aracılı T hücresi aktivasyonunu kolaylaştırabileceği önerilmektedir (Bridgeman vd., 2010).

CD3 ζ 'dan türetilen transmembran alanları, CAR'ların endojen TCR'lara dahil edilmesiyle sonuçlanır; buna genellikle artan T hücresi aktivasyonu ve azalan kompleks stabilitesi eşlik etmektedir. Genel olarak çalışmalar, uygun CAR-T hücresi sinyallemesinin en iyi şekilde proksimal hücre içi alanı uygun bir transmembran alanına

bağlayarak kolaylaştırılabileceğini, CAR ekspresyonu ve stabilitesinin ise sıkça kullanılan CD8α veya CD28 transmembran alanları kullanılarak artırılabilceğini öne sürmektedir (Sterner & Sterner, 2021).

Fizyolojik bir T hücresinde, TCR-CD3 kompleksinin transmembran alanları, kompleksin bir araya getirilmesinde önemli bir rol oynar. CAR yapısıyla alakalı olan, birinci nesil CAR'larda CD3ζ sitoplazmik alanla cis'e dahil edilen CD3ζ transmembran alanıdır. Transmembran alanlarının, CAR montajı, aktivasyonu ve kümelenmesinde yer alan diğer önemli reaksiyonları yönettiği gösterilmiştir. Ayrıca bu alanın, aşırı olması halinde yüksek spesifik olmayan toksisiteye yol açabilecek sitokin salınımını etkilediği bilinmektedir (Fujiwara vd., 2020). CD3ζ'nin dimerizasyonuna, CD3ζ'nun transmembran alanındaki ikinci pozisyonundaki bir sistein kalıntısı aracılık etmektedir. Transmembran alanında dimerizasyonu ortadan kaldıran bir C2G mutasyonu ile oluşturulan birinci nesil anti-CEA CAR'lar, doğal CD3ζ transmembran alanını kullanan CAR'larla karşılaştırıldığında antijen ile inkübe edildiğinde CD69 gibi erken aktivasyon belirtecinin yukarı regülasyonunda önemli bir bozulma göstermiştir (Bridgeman vd., 2010).

2.7.2.4. Hücre İçi Sinyalizasyon Alanları

T hücrelerinde, TCR-CD3 kompleksinin hücre içi sinyal alanı, sinyal zincirini başlatmak için gerekli "**sinyal 1**"i iletmektedir. Ko-stimülatör reseptörler, özellikle CD28, sürekli sinyal verme, anerjinin önlenmesi ve çoğalma için önemli olan "**sinyal 2**"yi taşımaktadır. 4-1BB, ICOS ve OX40, T hücresi farklılaşma yollarını, metabolik döngüleri, ayrıca apoptoz ve aktivasyonun neden olduğu hücre ölümünü etkileyen diğer ortak uyarıcı reseptörlerdir (Weinkove vd., 2019). CAR-T hücrelerinde, ortak uyarıcı sinyaller cis içinde CD3ζ sitoplazmik alanında bulunmaktadır. Literatürde ele alınan konular, ko-stimülatör sinyallerin sayısı ve türü, düzeni ve membrana yakınlığı gibi önemli parametrelerle ilgilidir. TCR-CD3 komplekslerinin sitoplazmik alanlarında bulunan ITAM'lar, kaskadların sinyallenmesi için gerekli olan ZAP70'i toplayan fosforilasyon bölgeleridir. T hücrelerinde ideal sinyalleme, ITAM çeşitliliği ve fonksiyonel CD3ζ ITAM sayısı ile ilgilidir (Ardouin vd., 1999; Bettini vd., 2017).

CAR-T hücrelerinde fonksiyonel ITAM'lerin sayısı, etkinliği sağlamak için önemli bir tasarım stratejisidir. Birinci nesil CAR'lar genellikle ligand etkileşimi üzerine bir aktive edici sinyal (sinyal 1) üreten birincil sinyal motifleri kullanılarak tasarlanmıştır. İkinci ve üçüncü nesil CAR'lar, bir aktive edici sinyal (sinyal 1) ve bir veya daha fazla

ko-stimülatör sinyal (sinyal 2) ile birlikte ligand etkileşimi üzerine tasarlanmıştır. Yapılan *in vivo* çalışmalar, birinci nesil CAR-T hücrelerinin çoğunun birincil sinyal motifi olarak yalnızca CD3 ζ alanını kullandığını ve bu hücrelerin çoğalma ve kalıcılık eksikliği göstermiştir (Brocker, 2000). İkinci nesil CAR yapılarına örnek olarak verilen CD28 ve 4-1BB bazlı CAR'lar, uzun vadeli kalıcılık ve artan etkinlik gibi işlevsellikler sağlama yetenekleri nedeniyle özellikle çekici hale gelmiş olup ve şu anda Kymriah® ve Yescarta gibi klinik olarak onaylanmış tedavilerde kullanılmaktadır (Finney vd., 2004; Savoldo vd., 2011; Van Der Stegen vd., 2015). Üçüncü nesil CAR'lar, CD28 ve 4-1BB alanlarını kullanarak CD19, PSMA, GD2 ve mezotelin gibi farklı hedeflere karşı test edilmiştir (Carpenito vd., 2009; Quintarelli vd., 2018; Ramos vd., 2018). Hücre içi sinyallemedeki farklılıkların araştırıldığı bir çalışmada, anti-CD19 ikinci nesil CAR'lar ve 4-1BB ve CD28 ortak uyarıcı alana sahip üçüncü nesil CAR'lar karşılaştırılmıştır. Bu çalışma, üçüncü nesil CAR-T hücrelerinin, sinyal proteinlerinin fosforilasyon durumunda genel bir artış gösterdiğini ortaya çıkarmış olup bu sonuç, ikinci nesil CAR'lara kıyasla üçüncü nesil CAR'ların potansiyel olarak daha yüksek sinyal güçlerine sahip olabileceğini göstermektedir (Karlsson vd., 2015). B hücreli malignitelerle ilgili olarak, Hodgkin Dışı Lenfoma ile ilgili ikinci nesil CD28 bazlı CAR'lar ile üçüncü nesil 4-1BB-CD28 bazlı CAR'lar arasında yapılan doğrudan karşılaştırmalı bir klinik çalışmada da, üçüncü nesil CAR'ların ikinci nesile kıyasla daha yüksek kalıcılık ve genişleme gösterdiğini göstermiştir (Ramos vd., 2018). Bununla birlikte, ikinci nesil CAR'ların anti-tümör potansiyel açısından üçüncü nesil formatlarından hala daha iyi performans gösterdiğini kanıtlayan çalışmaların varlığı sebebiyle, üçüncü nesil CAR'ların ikinci nesil karşısındaki üstünlüğü hala tartışmalı bir konudur (Abate-Daga vd., 2014).

Sinyalleşmede önemli rol oynayan bir başka faktör ise ITAM motifleridir. Fizyolojik T hücrelerinde, bir protein kinaz olan ZAP70, iki kat fosforile edilmiş ITAM'lara alınır ve bu da sinyal kaskadının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Karlsson vd., 2015). CD3 ζ 'nın ITAM'lerinin her biri mutasyona uğratıldığında, hem fonksiyonel ITAM'lerin sayısının hem de konumlarının CAR-T hücresi proliferasyonunu, *in vivo*'da tümör yok edilmesini ve farklılaşma fenotipini etkilediği bulunmuştur (Feucht vd., 2019). Fizyolojik T hücrelerinde, ITAM çokluğunun timustaki T hücrelerinin negatif seçiminde, çoğalmasında ve sitokin salgılanmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Pitcher & Van Oers, 2003). CAR-T hücrelerinde ITAM'lardan etkilenen sinyal mekanizmaları net değildir. Özellikle trans-trans ITAM'lerin mevcudiyeti, T hücrelerindeki farklı sinyal

mekanizmalarını güçlendirir. ITAM'lerin konumu, T hücrelerinde ZAP70 kinaza karşı afinitesini etkiler (Love & Hayes, 2010).

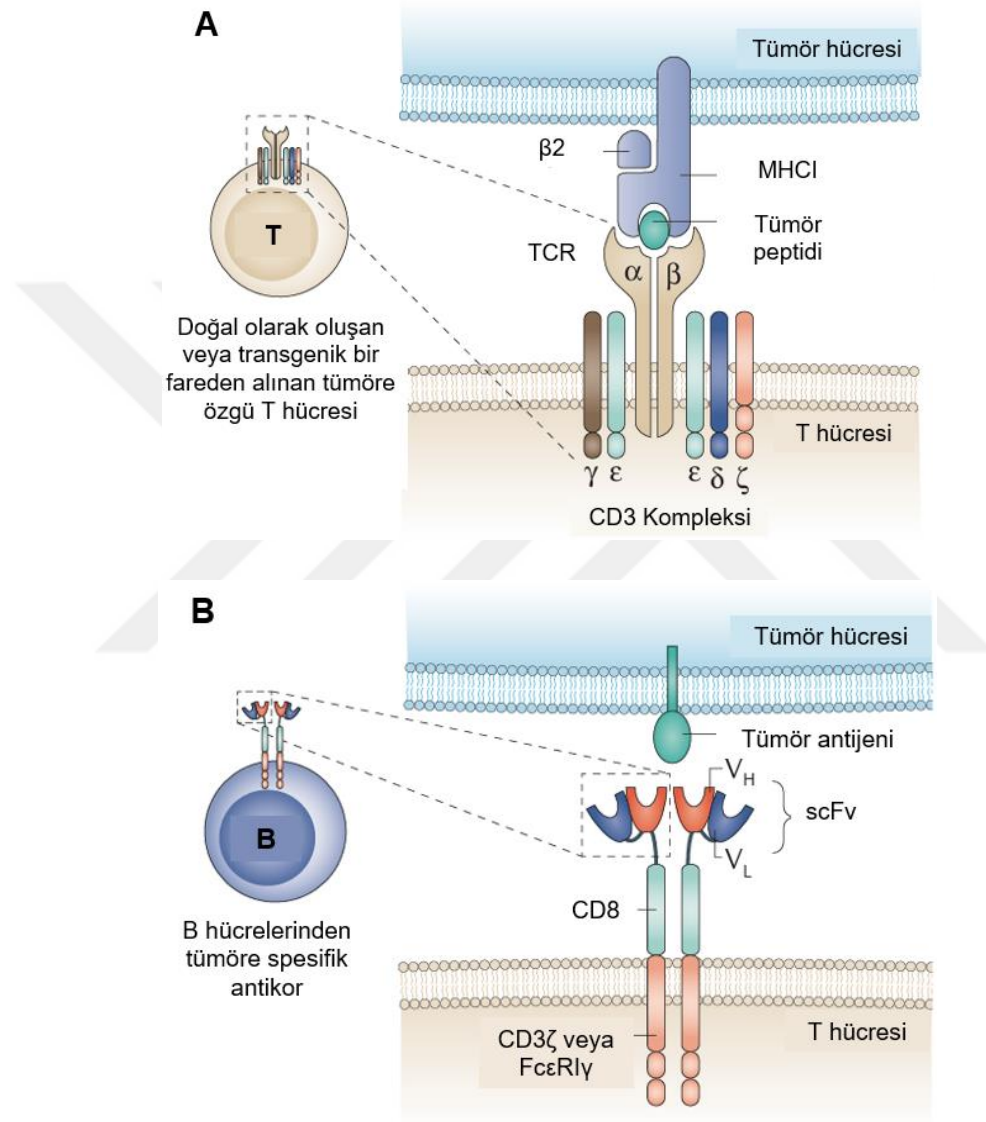
2.7.3. TCR Ve Kimerik Antijen Reseptör (CAR) Aktivasyonu Ve Yakın Sinyal İletimi (Proximal Signaling)

TCR aktivasyonu, kısa sürede gerçekleşen erken T hücre sinyal iletiminin ilk aşamasıdır. TCR'nin proximal sinyal iletimindeki erken bir olay, bir dizi protein tirozin kinazların (PTK) dahil olması ve aktive olmasıdır. LCK, FYN ve ZAP-70 gibi birkaç PTK, T hücre gelişimi ve TCR sinyal iletiminin CD3 üzerindeki tirozin fosforilasyonu yoluyla aktivasyonu için önemli sinyal bileşenleridir. CD3 proteinlerinin sitoplazmik kuyruğu, iki lösin/izolösin tarafından çevrili ve geniş aromatik amino asit ile boşluklu olan ITAM'lar adlı benzersiz bir motif içerir. CD3 δ , γ ve ϵ zincirlerinin her biri bir ITAM içerirken, CD3 ζ zincirleri her biri üç ITAM içerir, bu nedenle her TCR-CD3 kompleksi on adet ITAM içerir. TCR aktivasyonu için ITAM'ların tirozin kalıntılarının fosforile edilmesi gerekmektedir ve bu işlem, LCK tarafından başlatılır ve belirli ölçülerde FYN tarafından gerçekleştirilir. FYN, ITAM'ların fosforilasyonunu indükleyebilirken, rolü T hücre gelişimi için çok elzem değildir. Bununla birlikte, LCK'nın T hücre gelişimi sırasında CD3 ITAM'ları üzerindeki tirozin fosforilasyonu muhtemelen diğer tirozin kinazlarıyla değiştirilemez.

Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) olarak bilinen CAR'lar, T hücresi efektör işlevlerini başlatmak için CD3 ζ 'yı kullanacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle, CAR ve TCR'nin benzer bir sinyal iletim mekanizması paylaşması beklenmektedir. CAR ve TCR, sinyal iletimi için PLC γ , Zap-70, LAT ve Src ailesi kinazlar dahil olmak üzere benzer moleküler makineler kullanmaktadır. Bununla birlikte, 2. ve 3. nesil CAR'lar üzerinde yapılan ileri çalışmalar, CAR'ın TCR'a göre farklı bir sinyal iletim mekanizmasına sahip olduğuna işaret etmektedir. Endojen TCR'lar, reseptör bileşenleri ile birlikte intrasellüler kinazlar, substratlar ve ko-reseptörleri içeren oldukça karmaşık ve birbirine bağlı bir süreç aracılığıyla peptid:(MHC antijenini tanımaktadır (Lindner vd., 2020).

CAR bağlanması, CAR-T hücrelerini tamamen korunmuş endojen TCR sinyal iletim mekanizmalarını kullanarak etkinleştirip etkinleştirmedeği net değildir. Bununla birlikte, CAR'ların antijeni tanıma ve T hücresi aktivasyonunu başlatma yeteneğine sahip oldukları açıktır. Bu durum, CAR'ların genellikle sinyal 1, sinyal 2 ve sinyal 3 olarak adlandırılan kanonik T hücresi aktivasyon olaylarının etkilerini optimal bir şekilde taklit

edebildiğini önermektedir (Lindner vd., 2020) (**Şekil 6**). Buna ek olarak, CAR ve TCR'nin antijene hassasiyeti farklıdır; bir TCR çok az tepki verebilirken bir pMHC her bir CAR proteini en az yüzlerce antijen gerektirir, ancak CAR'ların antijenlere yönelik afinitesi TCR'lerden önemli ölçüde daha yüksektir. Bu farklı duyarlılık, duyarlılıkla ilişkili olduğu gösterilen farklı bir içsel sinyal iletim mekanizmasına işaret edebilir.

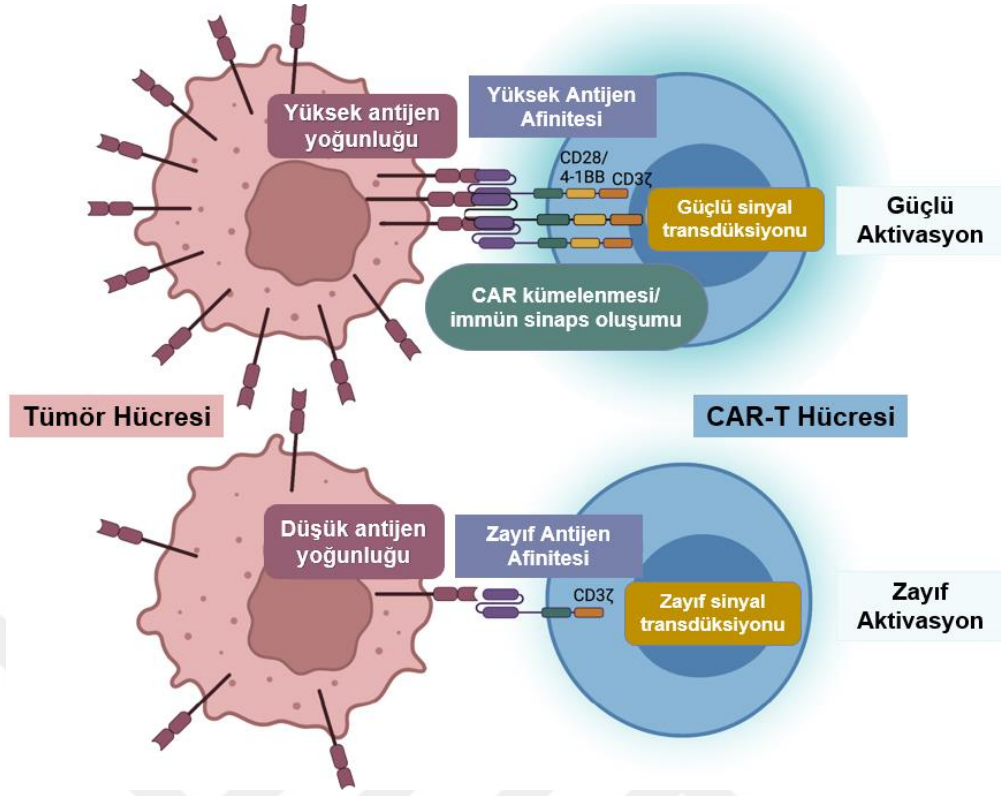


Şekil 6. TCR'lerin ve CAR'ların yapısal olarak kıyaslanması. A. TCR genleri, α- ve β-zincirlerinden oluşmaktadır ve doğal olarak insanlarda meydana gelebilen tümör spesifik T hücrelerinden veya insan lökosit antijen (HLA)-transgenik farelerin immunizasyonundan elde edilebilir. TCR, tümör hücresinin major histokompatibilite kompleksi (MHC) üzerinde gösterilen bir tümör antijen peptit fragmenti ile karşılaştığında, ITAM dizilerinin fosforilasyonu gerçekleşmekte, bu da T hücrelerinden sitokinlerin ve sitotoksik bileşiklerin salınmasına yol açan bir hücresel sinyal kaskadına neden olmaktadır.

B. Kimerik antijen reseptörleri (CAR'lar), scFv ekstrasellüler alanından, bir menteşe ve transmembran alan aracılığıyla bir sitoplazmik sinyal bölgesine bağlanan yapıya sahiptir. scFv'yi kodlayan genler, tümör spesifik bir antikör üreten B hücresinden türetilir. CAR'lar genellikle bir dimer olarak bulunmaktadır ve tümör hücresinin yüzeyinde (MHC gerektirmeyen) doğrudan tümör antijenini tanırlar (Kershaw vd., 2013). (Chao vd., 2011)

2.8. Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) T Hücrelerinin Öldürme Mekanizmaları

CAR-T hücreleri, antijen bağlama alanı hedef hücrenin antijenini tanıdığı ve ona bağladığı zaman aktive olmaktadır. Bu etkileşimden sonra, T hücresi yüzeyindeki CAR molekülleri küme oluşturmakta, bu da CAR molekülünün hareketsizleşmesine (Lim & June, 2017) ve bir immünolojik sinapsın oluşmasına (D. Liu vd., 2020) yol açmaktadır. Bu bağlantı, hedef hücre öldürmenin indüksiyonu için merkezi bir ögedir, çünkü bu, efektör T hücresi tarafından tümör hücre lizisinin başlatılmasına neden olacaktır (Benmeharek vd., 2019). CAR-T hücreleri, hedef hücreleri otonom olarak tanımlayarak ve lizisini gerçekleştirerek aynı zamanda T hücresi genişlemesini (expansion) ve farklılaşmasını indükleyecek şekilde tasarlanmıştır. Bu durum, CAR-T hücre etkinliği için önemli iki süreçtir ve uzun vadeli tümör kontrolü için artan tümör hücre hedefleme ve kalıcılığa yol açmaktadır. Ancak, CAR-T hücrelerinin aşırı aktivasyonu, sitokin salınımına bağlı toksisite veya düşük kalıcılık nedeniyle azalmış etkinlikle sonuçlanabilir. CAR-T hücre aktivasyon derecesi, immün sinaps oluşumu, hedef antijen yoğunluğu, CAR'ın hedef antijene bağlanma afiniteği ve sinyal iletim gücüne bağlıdır (Korell vd., 2022) (Şekil 7).



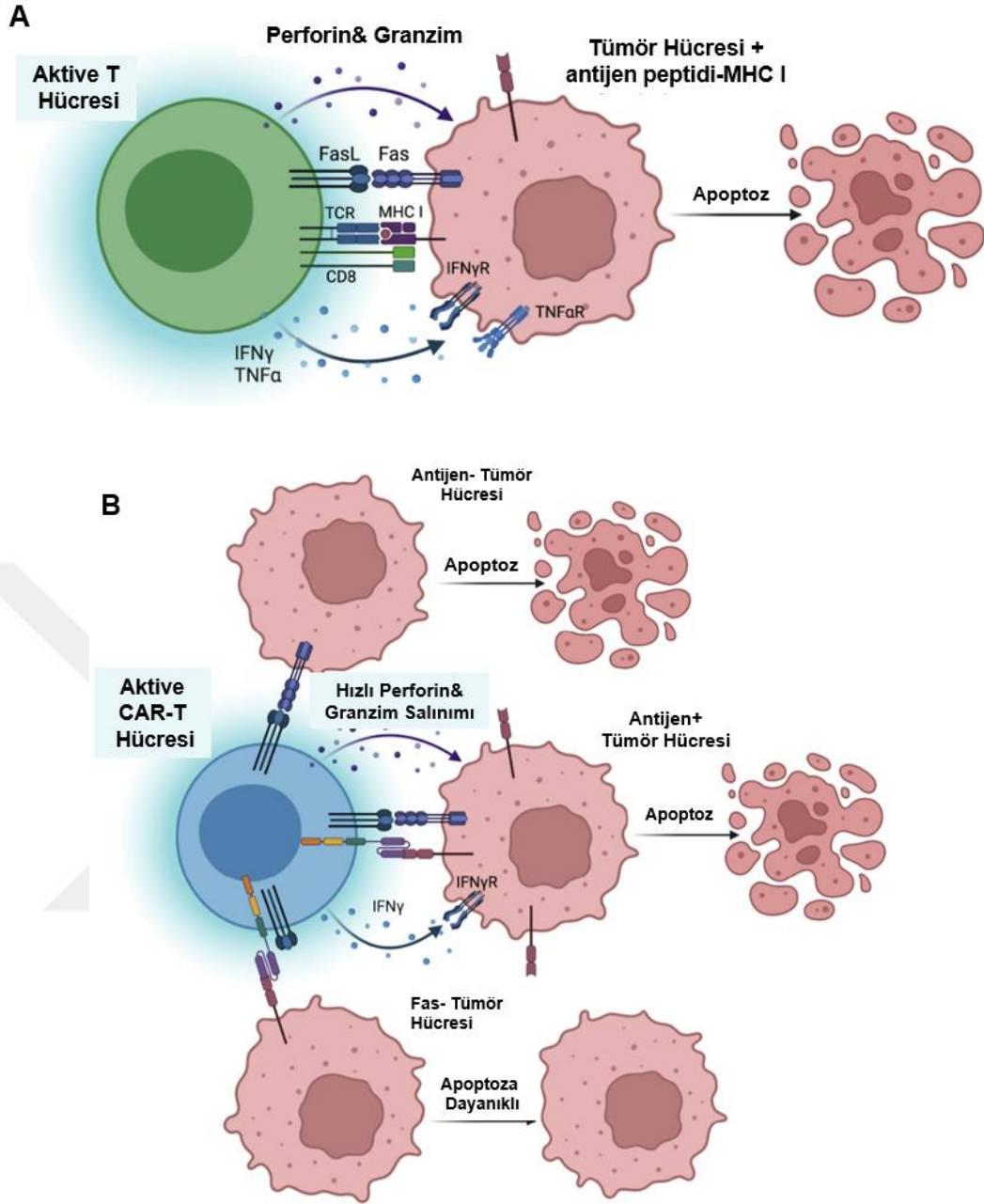
Şekil 7. CAR-T Hücresi Aktivasyonu (Korell vd., 2022).

CAR-T hücreleri, CAR'larının hedef antijenine bağlandığında aktive olur, bu da tümör hücresi ile bir immünolojik sinaps oluşturur ve intrasellüler CAR sinyal alanlarına sinyal göndererek T hücresi etki fonksiyonlarını başlatmaktadır. CAR-T hücresinin aktivasyon derecesi, tümör hücresinde mevcut antijen miktarına, CAR'ların tümör antijenine bağlanma yeteneğine (antijen afinitesi) ve CAR'da kullanılan ko-stimülatuar (4-1BB veya CD28) ve uyarıcı (CD3 ζ) alanlar tarafından başlatılan sinyal iletim gücüne bağlıdır (Korell vd., 2022). CAR-T hücrelerinin tümör hücrelerini tam olarak nasıl tanıdığı ve öldürdüğü sorusu, CAR T hücrelerinin işlevini ve güvenliğini geliştirmek açısından önemlidir. Doğal T hücrelerinde ana öldürme süreci, hücre içindeki önceden oluşturulmuş granüllerden sitotoksik efektör proteinlerin, perforin ve granzimin, salınmasına odaklanmaktadır (Davenport vd., 2015). Bir immünolojik sinaps oluştuğunda, bu granüller arayüze göç eder ve sitolitik molekülleri sinaptik yarık içine salmaktadır (Stinchcombe vd., 2006).

Perforin, hücre zarında delikler açarak hedef hücrenin apoptozu başlatmasına izin verir. T hücrelerinin sitotoksitesi için kullanılan başka bir mekanizma, ölüm reseptörü yoluyla olarak adlandırılır; burada T hücreleri tarafından ifade edilen ve hedef hücrede

apoptozu başlatan Fas ligandı (FasL) tarafından bağlanan Fas, hedef hücrede apoptozu başlatır (Martínez-Lostao vd., 2015). Sitotoksik T hücreleri ayrıca hedef hücreleri daha iyi tanımasını ve öldürmesini sağlayan tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) veya INF- γ gibi çeşitli sitokinler de salgılamaktadır (Seki vd., 2002).

CAR-T hücreleri, hedef hücrelerinde apoptozu başlatma konusunda doğal T hücreleriyle benzer mekanizmaları kullanmaktadır (**Şekil 8**). Her ne kadar CAR-T hücrelerinin tümör hücrelerini etkili bir şekilde öldürmek için ölüm reseptörleri yerine perforin ve granzim üzerine daha fazla güvendiği hipotezi öne sürülse de yapılan son çalışmalar her iki yolun da kullanıldığını göstermektedir. CAR-T hücreleri, doğal T hücrelerine kıyasla daha hızlı bir şekilde degranülasyona uğrayarak ve perforini serbest bırakarak tümör hücrelerini daha hızlı öldürmektedir (Davenport vd., 2015).



Şekil 8. Doğal ve CAR T hücre öldürme mekanizmaları. (A) Doğal T hücreleri, tümör hücrelerini, TCR ve MCH-I ile tümör hücresinde sunulan bir tümör antijen peptidi arasındaki etkileşimler yoluyla tanımaktadır. T hücreleri, tümör hücresini öldürmede başlıca olarak perforin ve granzim salınımı yoluyla aracılık eder, ancak aynı zamanda Fas/FasL etkileşimlerini ve IFN- γ veya TNF- α salınımını kullanarak tümör hücresinde apoptozu başlatabilir. **(B)** CAR-T hücreleri, tümör hücrelerini öldürmek için benzer mekanizmalar kullanır, ancak daha hızlı öldürmeye yol açan perforin ve granzimin daha hızlı salınması ile karakterize edilirler. Ayrıca, CAR T hücreleri, antijen-negatif tümör hücrelerini bu mekanizma aracılığıyla öldürebildikleri için tümör hücresini öldürme konusunda daha fazla Fas/FasL'ye bağlı olabilir ve Fas-negatif tümör hücreleri, CAR T hücreleri tarafından indüklenen apoptoza dirençlidir. CAR-T hücreleri ayrıca tümör hücresini öldürmeye yardımcı olan IFN- γ 'ı da salgılar.

Hem CD4+ hem de CD8+ CAR-T hücreleri, bu mekanizma aracılığıyla Fas ifadesinden bağımsız olarak etkili bir şekilde tümör hücrelerini öldürebilir, ancak CD4+ T hücreleri, doğal olarak, CD8+ T hücrelerine kıyasla daha düşük seviyelerde perforin ve granzime sahiptir (Hombach vd., 2006; Liadi vd., 2015). Perforin salınımı engellendiğinde, CAR-T hücrelerinin öldürme etkinliği azalmaktadır ancak öldürme işlemi hala gerçekleşebilir. Bu durum, CAR-T hücrelerinin perforin knockout farelerinden mühendislikle oluşturulduğu genetik olarak eş (sinjeneik) fare modelleri kullanılarak gösterilmiştir ve bu hücrelerin, kolon karsinomu ve B hücre lösemisine karşı azalmış öldürme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür (Haynes vd., 2002; Ishii vd., 2020). Benzer şekilde, etilen glikol tetraasetik asit ile perforin ve granzimi bloke etmek, *in vitro* ortamda insan CAR-T hücrelerinin lösemi hücrelerini öldürmesini azalttığı gözlemlenmiş olup tamamen ortadan kaldırmadığı gözlemlenmiştir (Mamonkin vd., 2015). Bu veriler, perforin ve granziminin CAR-T hücre öldürmesinde rol oynadığını, ancak kullanılan tek mekanizma olmadığını göstermektedir.

2.8.1. Fas/Fas Ligand (FasL) Yolağı ve CAR-T Ölüm Mekanizması

Ölüm reseptörü yolakları aynı zamanda CAR-T hücreleri tarafından da kullanılır ve tümör hücrelerinin öldürülmesinde çok önemli bir rol oynayabilir. TNF ailesine ait ölüm reseptörleri, hedef hücre üzerinde karşılık gelen reseptöre bağlanarak hücrede apoptozu başlatabilir (Nagata & Tanaka, 2017; Waring & Müllbacher, 1999). Reseptör etkileşimi, adaptör protein FADD'ın sitoplazmatik ölüm alanına bağlanması, kaspaz-8'in (CASP8; procaspase-8'in çekilmesi ve parçalanması yoluyla) aktivasyonu ve ardından kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açmaktadır (Fu vd., 2016; Walczak, 2013). Ölüm reseptörü yolakları, apoptozu indüklemek için kaspazlara bağlıdır ve apoptozun perforin/granzim modundan çok daha yavaştır ve kaspaz bağımlı veya bağımsız olabilir (Cullen & Martin, 2008). En iyi karakterize edilen ölüm reseptörü/ligand çiftlerinden biri Fas ve FasL'dir. Ancak TNF ile ilişkili apoptozu içeren ligand (TRAIL) ve TRAIL-R1/2 gibi başka ölüm reseptörü/ligand çiftleri de tanımlanmıştır (Suliman vd., 2001). FasL, T hücreleri tarafından ifade edilir ve hedef hücredeki FasL'ye bağlanarak apoptozu indükler. CAR-T hücrelerinde, FasL'nin Fas ile bağlanması, perforin ve granzim gibi efektör işlev için gereklidir.

FasL, *in vitro* bir anti-FasL antikoruyla bloke edildiğinde (Mamonkin vd., 2015) veya Fas ifadesi olmayan tümör hücreleri kullanılarak yapılan sinjeneik fare modelinde CAR-T hücre sitotoksitesinin azaldığı görülmüştür (Darcy vd., 1998). Tümör nekroz faktörü reseptör ailesine ait bir hücre yüzeyi proteini olan CD95 (Fas/APO-1/TNFRSF6), doğal ligandı CD95L'ye (CD178/TNFSF6) bağlandığında veya agonistik antikorlarla uyarıldığında apoptoza aracılık edebilir (Nagata, 1997). Timus, karaciğer, kalp ve böbrek başta olmak üzere vücutta her yerde bulunur. CD95L, göz ve testis gibi "bağışıklık ayrıcalıklı bölgelerdeki" dokularda yapısal olarak eksprese edilir ve esas olarak aktive edilmiş T lenfositlerde ve doğal öldürücü hücrelerde eksprese edilir (Nagata, 1997).

2.9. CAR Nesilleri ve Gelişimi

CAR'ların 1989'daki ilk geliştirilmesinden bu yana, CAR-T hücreleri endodomain yapısına göre beş farklı nesile ayrılmaktadır. Birinci nesil CAR'ların oluşturulması ilk kez 1990'larda Dr. Eshaar'ın temel çalışmasında tanımlanmış olup yalnızca CD3ζ endodomain'ini içeren intraselüler bir bölgeye sahiptir (Eshhar vd., 1993). Ancak o zamandan bu yana, ζ zincirinin tek başına tam bir T hücresi tepkisini tetiklemek ve dolayısıyla tükenmeyi ve ardından gelen AICD'yi önlemek için yeterli olmadığı ortaya çıkmıştır. Böylece, gelişmiş lenfositik etki ve kalıcılığını iyileştirmek için yapıya eklenen bir veya iki kostimülatör endodomain içeren ikinci ve üçüncü nesil CAR'lar ortaya çıkmıştır (Jayaraman vd., 2020; Vairy vd., 2018). Bu ortak uyarıcı alanlar, paralel hücre içi (intraselüler) sinyalleşme basamaklarını başlatarak CD3ζ aktivasyon sinyalinin etkisini artırır. Bu, çoğalmayı, sitotoksik etkiyi, sitokin salınımını, hücre hayatta kalmasını ve hafıza oluşumunu artırır (Weinkove vd., 2019). Günümüzde, deneysel olarak test edilen dördüncü ve beşinci nesil CAR'lar mevcuttur. Bunlar sırasıyla sitokin (Evrensel Sitokin Aracılı Öldürme İçin Yönlendirilmiş T Hücreleri; **T cells Redirected for Antigen-Unrestricted Cytokine-Initiated Killing**, TRUCKs) ve kemokin (self-driving CARs) sinyalleri gibi konstitütif veya indüklenir transgenik sinyalleri içerebilmektedir (De Marco vd., 2023).

2.9.1. Birinci Nesil

Birinci nesil CAR'lar, genellikle CD3 ζ-zinciri veya FcεRIγ'den türetilen hücre içi alana sahip tek bir yapı içermektedir ve endojen TCR'den gelen sinyallerin birincil temel ileticisidir (Eshhar vd., 1993; Gross vd., 1989).

Ancak bu CAR-T hücreleri yeterli miktarda IL-2 üretilmediğinden, tümör hücrelerini öldürmek için eksojen IL-2'nin uygulanması gerekmektedir. CD3ζ zincirine sahip CAR-T hücreleri ise T hücrelerini aktive etmede ve tümör hücrelerini öldürmede daha iyiydi. Bununla birlikte, bu CAR-T hücreleri *in vitro* olarak daha düşük ekspresyon seviyelerine sahipti. Farklı tümörleri tedavi etmek için oluşturulan birinci nesil CAR-T çalışmalarının çoğu, birinci nesil CAR-T hücrelerinin yetersiz çoğalma, *in vivo* 'daki kısa yaşam süresi ve salgılanan sitokinlerin yetersizliği nedeniyle istenilen sonuçlara ulaşamamıştır (Bridgeman vd., 2010; Kershaw vd., 2006; Lamers vd., 2007; Till vd., 2008).

2.9.2. İkinci Nesil

T hücresi antijen reseptörleri, sitokin reseptörleri ve ko-stimülatuar reseptörler, T hücresi aktivasyonu için yaygın olan çift sinyal alma özelliğini içerir. TCR tarafından başlatılan ilk sinyal, antijeni sunan hücrelerin yüzeyindeki antijenik peptit-MHC kompleksini tanır. T hücrelerinin aktivasyonunu tamamlamak ve apoptozu önlemek için IL-2 sentezini teşvik etmek için CD28/B7 gibi bir ko-stimülatuar molekül tarafından üretilen ikinci sinyal ko-stimülatuar bir sinyaldir. Antijen tarafından uyarılmış olsalar bile, naif T hücreleri ko-stimülatuar sinyal olmadan normal görevlerini yerine getiremez. Bu nedenle, yalnızca CD3ζ dizisini içeren CAR'lar, ko-stimülatuar bir sinyal olmaksızın CAR-T hücrelerini aktive edemez. Bu bağlamda, ikinci nesil CAR'lar, çeşitli ko-stimülatör protein reseptörlerinden, CD28 veya CD137 (4-1BB ve CD134 (OX40)) gibi hücre içi sinyal dizilerini ekleyerek T hücrelerine ek sinyaller sağlamıştır. Bu ek sinyaller, T hücrelerinin proliferasyonunu, sitotoksitesini ve sürdürülen yanıtını artırabilir ve CAR-T hücrelerinin *in vivo* yaşamını uzatabilir (Dotti vd., 2009; Finney vd., 1998; Park vd., 2011). CD28 aracılı ko-stimülasyon, efektör hücreler ve bellek hücreleri oluşturmada, lenfosit proliferasyonu ve yaşamını kontrol etmekte çok önemlidir. CD137, T hücrelerinin yanıt sinyalini sürdürebilir ve CD8⁺ T hücrelerinin yaşamı ve belleğinde önemli bir rol oynamaktadır (Acuto & Michel, 2003; Croft, 2009; Finney vd., 2004). B hücreli maligniteleri tedavi etmek için kullanılan ikinci nesil CAR-T hücreleri, birinci nesil CAR-T hücrelerine göre daha iyi sonuçlar göstermiştir (Cai vd., 2016; Hu vd., 2016). 4-1BBζ-CAR-T hücreleri, CD28ζ-CAR-T hücrelerinden daha uzun bir kalıcılığa sahip olduğu görülmektedir, ancak doğrudan karşılaştırma yapılmamıştır (Porter vd., 2015). CD28ζ-CAR-T hücreleri sürekli uyarı, proliferasyon ve büyümeye neden olabilir (Frigault vd.,

2015). Bununla birlikte, 4-1BB ζ -CAR-T hücreleri erken tükenmeye neden olabilir, bu da anti-tümör etkinliği sınırlayabilir (Kawalekar vd., 2016; Long vd., 2015).

2.9.3. Üçüncü Nesil

Üçüncü nesil CAR'lar, güçlü sitokin üretimi ve öldürme yeteneği ile etkinliği artırmak amacıyla CD3 ζ -CD28-OX40 veya CD3 ζ -CD28-41BB gibi çoklu sinyal dizilerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur (Marin vd., 2010). HER2-CAR-T hücreleri gibi bazı CAR-T hücreleri, lenfoma ve kolon kanserini tedavi etmek için kullanılmıştır ancak sonuçlar ikinci nesil ile karşılaştırıldığında iyileşme göstermemiştir (R. A. Morgan vd., 2010; Till vd., 2012). Bu durumun nedeni, incelenen vakaların sayısının az olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, bu tedavilerin güvenliğini ve etkinliğini test etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır ve yardımcı uyarıcı moleküllerin seçimi de önem arz etmektedir (C. Zhang vd., 2017).

2.9.4. Dördüncü Nesil

IL-12, ikinci nesil yapıların temeline eklenerek TRUCK olarak adlandırılan dördüncü nesil CAR-T hücreleri oluşturulmuştur (Chmielewski & Abken, 2015). Bu CAR-T hücreleri, istenen gen konstraktının TCR geninin ekspresyonunu değiştiren promötör bölgesine entegrasyonu ile modifiye edilmektedir. Bu istenen gen, tümör bölgesine iletilmek üzere kodlanan sitokinleri içermektedir. CAR, tümör hücrelerindeki antijenik epitopa bağlandığında, CD3 ζ zincirinin aşağı akış sinyallemesini başlatır ve bu da TCR geninin ekspresyonunu değiştirir. Bu, aktive olan T hücrelerinin nükleer faktörünü fosforile eden (NFAT) bir T hücresi transkripsiyon faktörünü harekete geçirir; bu nedenle, NFAT aktive olur ve NFAT-yanıt elementi-IL-2 promotörüne bağlanan TCR'yi aktive eder. Bu, transgenik proteinlerin (sitokinlerin) üretilmesine yol açar ve bu proteinler hedef bölgede birikerek normal hücrelere minimal toksisite ile kanser hücrelerini ortadan kaldırmaya yönelik bir süreç oluşturur (L. Zhang vd., 2011).

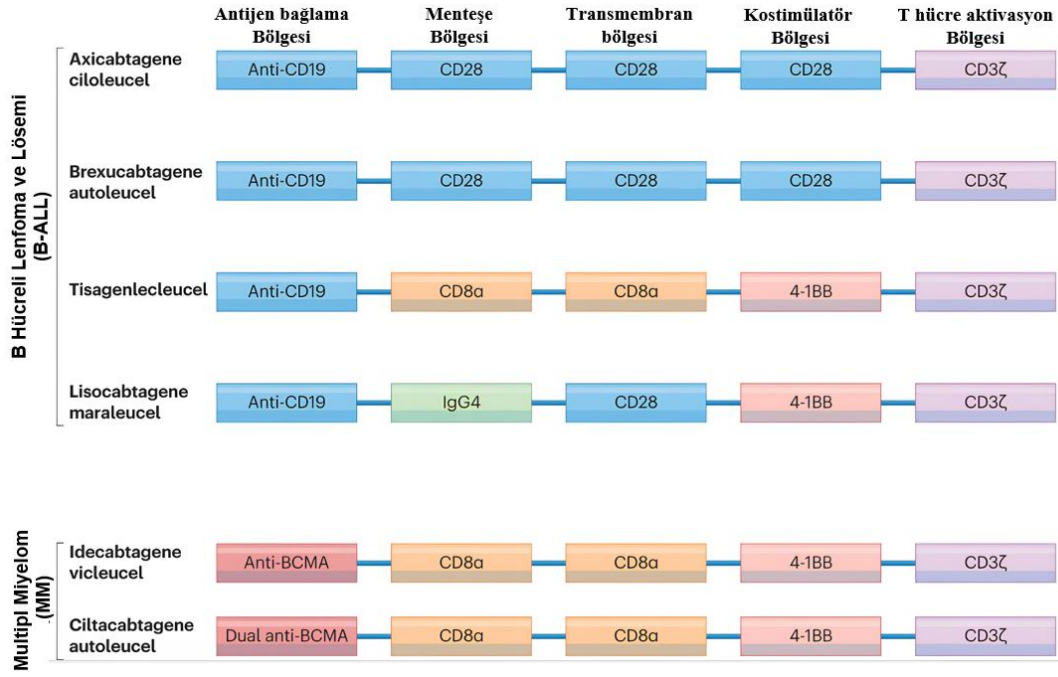
2.9.5. Beşinci Nesil

Beşinci nesil CAR-T hücrelerine olan ihtiyaç, yetersiz tümör eliminasyonu ve anti-tümör T hücresi fonksiyonlarının kısmi aktivasyonu nedeniyle ortaya çıkmakla birlikte, optimal tümör eliminasyonu için geliştirilmiş T hücresi aktivasyonu ve çoğalması için uygun sitokin etkileşimi kritik bir adımdır. Bu nesil, CD28 ve CD3 ζ alanları arasına ek bir IL-2R β aktivasyon alanına sahip yeni bir CAR tasarımına sahiptir.

Ayrıca, CD3ζ alanının C-terminusuna yönlendirilmiş mutajenezle eklenen bir tirozin motifinin, antijenin CAR-T hücresine bağlandığında sinyal iletimi için sinyal transdüser ve aktivatörü transkripsiyon faktörünü (STAT) çektiği bu nesil farklıdır. Ardından, sinyal, STAT'ın çekilmesi için iletilir, bu da CAR-T hücresinin çoğalmasını teşvik eder ve tümör hücrelerinde programlanmış ölüm ligandının aktivasyonunu destekler. Sonuç olarak, bu, tümörün maksimum derecede eradikasyonuna yol açacaktır (Kagoya vd., 2018).

2.10. Mevcut CAR-T Hücre Tedavileri

CD19'u hedefleyen CAR-T hücreleri, kötü huylu B hücrelerinde bulunan bu antijene yönelik olarak on yıl öncesinden başlayarak relaps ve/veya refrakter (R/R) B hücreli kanserli hastalarda yapılan erken faz klinik denemelerde güçlü bir aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (Kochenderfer & Rosenberg, 2013; Sadelain vd., 2017). Şu anda FDA tarafından onaylanan CD19 hedefli CAR T hücre ürünleri arasında axicabtagene ciloleucel, tisagenlecleucel, lisocabtagene maraleucel ve brexucabtagene autoleucel bulunmaktadır (Abramson vd., 2020; Jacobson vd., 2022; Maude vd., 2018; Neelapu vd., 2017; Schuster vd., 2019; B. D. Shah vd., 2021; M. Wang vd., 2020). BCMA hedefli CAR T hücre ürünleri arasında ise idecabtagene vicleucel ve ciltacabtagene autoleucel bulunmaktadır (T. Martin vd., 2022; Munshi vd., 2021) (**Şekil 9**). Bu ürünlerin tümü, otolog (hastadan elde edilen) T hücrelerine CAR yapısını ifade etmek üzere viral transdüksiyon ile oluşturulmaktadır (Kochenderfer & Rosenberg, 2013). Şu anda onaylanmış CAR-T hücre ürünleri, bir antijen bağlama alanı, menteşe ve transmembran alanları, bir ortak uyarıcı alanı (CD28 veya 4-1BB'den türetilmiş) ve bir T hücresi aktivasyon alanını içermekte olup ikinci nesil yapıları kullanmaktadır (Brudno & Kochenderfer, 2018; Cappell & Kochenderfer, 2021). Bu CAR-T hücre ürünleri, CAR'da yer alan bazı spesifik alanlar, CAR transgen iletimi için kullanılan viral vektör ve üretim sürecinin belirli yönleri bakımından farklılık göstermektedir (Brudno & Kochenderfer, 2018; Cappell & Kochenderfer, 2021; Mikkilineni & Kochenderfer, 2021).



Şekil 9. FDA onaylı CAR-T hücre tedavileri.

2.11. CAR-T Hücre Tedavisinin Dezavantaj ve Yan etkileri

CAR-T hücreleri kliniklerde kullanılmış olsa da optimal vektör tasarımı ve virüslerden, üretime ve hastaya ulaşması gibi yaşanabilecek pek çok sorunun hâlâ yanıtlanması gerekmektedir. Bununla birlikte, CAR-T hücre tedavilerinin potansiyelini artırmak için dikkat edilmesi ve geliştirilmesi gereken bazı durumlar vardır. CAR-T hücresi ürününün ana bileşeni, CAR'ları T hücrelerine transdükte eden viral vektördür. CAR'ları kodlayan viral vektörler, yaklaşık dokuz yıl boyunca -80 °C'de saklanabilmektedir (Przybylowski vd., 2006). Bu vektörlerle oluşturulan hücreler klinik aşamada hastalara verilecek olduğundan, vektörün steril olması çok önemlidir. Şu anda bilinen en güvenli vektörün minimal üçüncü nesil lentiviral vektör olduğu bilinmektedir (Dull vd., 1998). Güvenlik, sterilite, titre, saflık ve etkinlik gücüne ilişkin kalite kontrol testleri çok önemli olup, mutlaka yapılmalıdır.

Vektörlerin saflığı, stabilitesi ve fonksiyonunu karşılaştırmak önemli olup, CAR-T hücrelerinin üretimi için tek bir vektör kullanılarak bu değişkenlerin kontrol edilmesi en çok istenilen durumlardan biridir. Lisanslı CAR-T hücresi ürünleri şu anda mevcuttur ve otolog olup her hasta için özelleştirilmiş bir terapi sunmaktadır.

Otolog ürünlerin üretimi genellikle 2-3 hafta sürmektedir. Ancak, bazı hastalar ilk uygun oldukları andan itibaren tedavi görmek için birkaç ay beklemleri gerekebilir çünkü üretim alanlarındaki eksiklikler ve karmaşık lojistiği yönetmede bazı zorluklar bulunmaktadır (Ghassemi vd., 2022). Daha fazla standardizasyon ve büyük ölçekli üretim için sağlıklı donörlerden alınan allojeneik CAR-T hücreleri alternatif bir hücre kaynağı sağlamaktadır. Bu hücreler, acil tedaviye ihtiyaç duyan hastalar için "off-the-shelf" dediğimiz rafta hazır olan ürünler olarak bilinmektedir (Bailey vd., 2023).

Katı tümörler ve hematolojik tümörler için CAR-T hücresi tedavisinde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir, ancak hastalarda tedavi sonrası nüks yaşanabilmektedir. CAR-T hücrelerinin *in vivo* olarak zayıf kalıcılığı, nüksetmenin önemli bir nedenidir (Huang vd., 2020). CAR-T hücrelerinin *in vivo* olarak neden kalıcı olduğunu sınırlayan üç faktör CAR'ların yapısı, CAR-T hücrelerinin Hafıza (memory) hücre oranı ve tümör mikroçevresi (TME) olarak bilinmektedir. Çalışmalar, hafıza T hücrelerinin yüzdesi arttıkça T hücrelerinin *in vivo* olarak daha dayanıklı olduğunu göstermiştir. (McLellan & Ali Hosseini Rad, 2019). Bu nedenle, T hücresi farklılaşmasını önlemek (Fraietta vd., 2018; Kim-Schulze vd., 2009; Nolz & Richer, 2020); terminal olarak farklılaşmış T hücrelerinin yeniden programlanması (Eminli vd., 2009; Loh vd., 2010); CAR-T hücrelerinin kültür süresinin kısaltılması (Ghassemi vd., 2018) ve CAR-T hücrelerinin yaşlanmasının geciktirilmesi (Bai vd., 2015) gibi dört farklı şekilde hafıza CAR-T hücrelerinin oranını arttırmak önemlidir. TME'deki bazı sitokinler ve bağışıklık kontrol noktası molekülleri, T hücrelerinin ömrünü ve fonksiyonlarını azaltabilir (Ansell vd., 2015; Deng vd., 2020; Jacobson vd., 2019).

Hematolojik malignitelerde CAR-T hücre tedavisi ile iyi sonuçlar elde edilmiş olsa da, solid tümörlerde antijen kaybı, benzersiz antijenlerin eksikliği ve solid tümörlerin immünsupresif tümör mikroçevresi nedeniyle hala zorlu bir durumdur (Kato vd., 2017; Yu vd., 2017). Dolayısıyla, CAR-T hücre tedavisinin etkisini arttırmak için, CAR'ları PD1 anahtar reseptörleri, antioksidan enzimler, matris bozunma enzimleri ve benzeri başka efektör moleküllerle birleştirerek birçok ilerleme kaydedilmiştir (Morsut vd., 2016; Newick vd., 2016; Roybal vd., 2016).

CAR-T hücre tedavisinin en yaygın yan etkisi şiddetli sitokin salım sendromudur (CRS). CAR-T hücre tedavisi sonrası olumsuz olayların çoğu mevcut müdahalelerle önlenabilir, ancak tedavinin etkinliğini sürdürürken olumsuz etkileri azaltmak çok

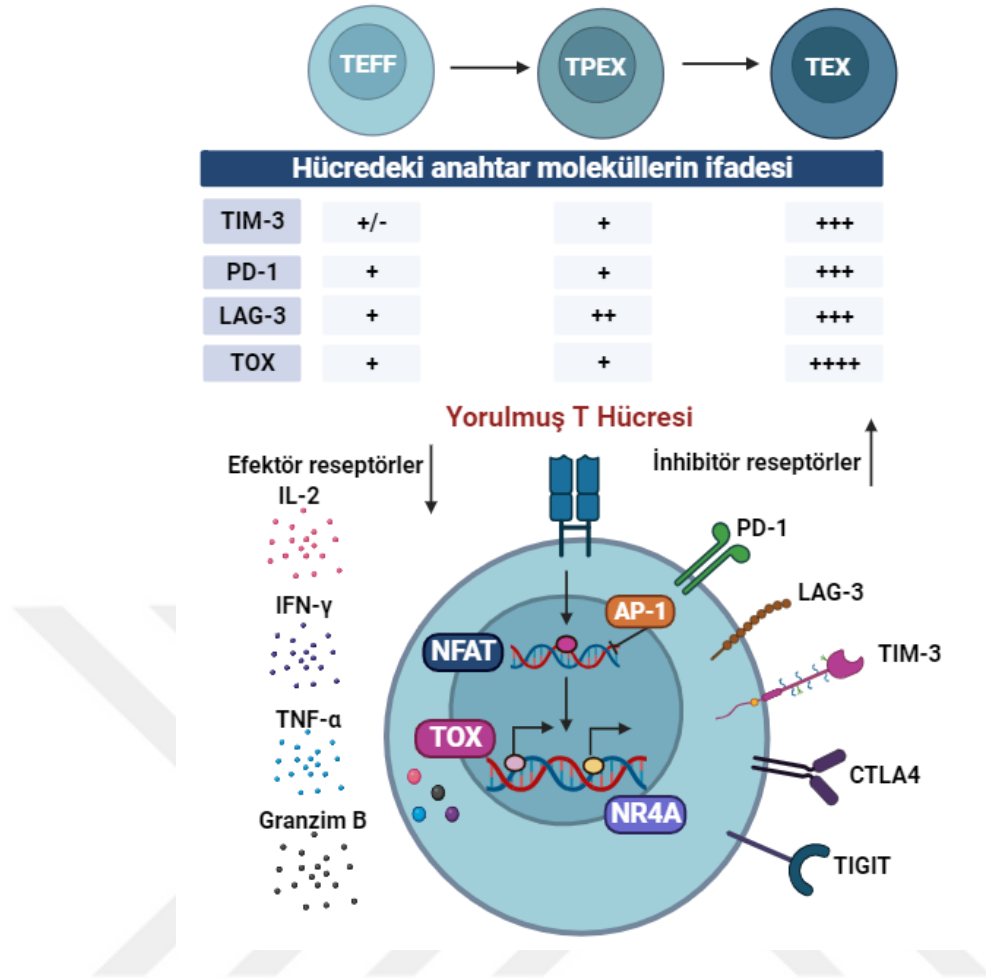
önemlidir (Lee vd., 2014). Benzer şekilde, modifiye edilmiş T hücrelerinin özgüllüğünü ve CAR-T hücre tedavisinin güvenliğini artırmak da önemlidir.

2.12. CAR-T Hücrelerinin Yorulması

In vivo uygulamanın başarısı CAR-T hücrelerinin işlevsel durumuna bağlıdır. Azalmış proliferatif kapasite, bozulmuş anti-tümör aktivitesi ve zayıflamış kalıcılık tükenmiş/yorulmuş CAR-T hücrelerinin özelliklerindendir. CAR-T hücresi tedavisinden sonra yanıt vermeme ve nüksetme durumu CAR-T hücresi tükenmesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, CAR-T hücresi tükenmesine neden olan tetikleyiciler ve mekanizmalar hala oldukça karmaşıktır. Bu nedenle, CAR-T hücresi tükenmesine yönelik güçlü çözümleri keşfetmek önemlidir (X. Zhu vd., 2022).

2.13. T hücrelerinin Yorulması

T hücrelerinin normal dokulara zarar vermemek için fonksiyonlarını düşürmeleri ve yorgunluk olarak adlandırılan bir fenotip geliştirmeleri gerekmektedir (D. G. Tantalos vd., 2021). Tükenmiş T hücreleri (Tex hücreleri), genellikle heterojen hücrelerden oluşan özgün bir hücre hattına ait olup, benzersiz fenotipik, epigenetik ve transkripsiyonel profillere sahip bir popülasyonu temsil etmektedir (McLane vd., 2019; D. G. Tantalos vd., 2021). Tex hücrelerinin oluşumu henüz tam olarak anlaşılamamıştır, ancak herhangi bir farklılaşma aşamasında T hücrelerinde tükenmişlik durumu meydana gelebilir ve bu Tex hücreleri tükenmiş nesiller üretmeye devam edebilir. Sonuç olarak, yorgunluk, T hücre farklılaşmasıyla eşzamanlı olduğu düşünülmektedir (Blank vd., 2019). Tex hücrelerinin gelişimi aşamalıdır, IL-2 üretiminin kaybı, daha düşük proliferatif kapasite ve azalmış sitotoksik yeteneklerle başlamaktadır. Fonksiyonel bozulmaların progresif birikimiyle uyumlu olarak, T hücrelerinin IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinleri üretme yeteneklerinde bozulma görülmektedir (McLane vd., 2019). Bu ilerleyen işlev bozukluklarıyla ilişkili olan, PD1, LAG3, TIM3, CTLA4 ve TIGIT gibi iyi tanımlanmış bağışıklık kontrol noktası işaretçilerinin ifadesidir (**Şekil 10**).



Şekil 10. T hücresi tükenmesinin belirteçleri. Kanser durumunda olduğu gibi, T hücresi fonksiyon bozukluğu, antijene uzun süre maruz kaldığında ortaya çıkar. T hücresi tükenmesi olarak bilinen bu fonksiyon kaybı, T hücresi tükenmesi, IL-2 üretiminin azalmasını, proliferatif kapasitenin azalmasını ve granzim B, IFN-γ ve TNF-α üretiminin azalmasını içerir. T hücreleri, işlevsellik kaybının yanı sıra PD1, LAG3, Tim3, CTLA4 ve TIGIT gibi inhibitör reseptörlerin ekspresyonunu artırır. T hücresi tükenmesinin temel düzenleyicilerinden bazıları, transkripsiyon faktörleri TOX ve NR4A'yı (NR4A1, NR4A2 ve NR4A3) içerir. +, ++, +++ ve ++++ ifadenin düzeyini; "+/-" heterojen ifadeyi belirtir; "-" ifade eksikliğini belirtir. **Kısaltmalar:** TIM-3, T8 hücre immünoglobulin ve müsin alanı içeren protein 3; PD-1, programlanmış hücre ölümü 1; LAG-3, lenfosit aktivasyon geni 3 proteini; TCF-1, transkripsiyonel düzenleyici T hücresi faktörü 1; TOX, timosit seçimiyle ilişkili yüksek mobilite grup kutu proteini; IFN-γ, interferon-γ; IL-2, interlökin 6; TNF-α, tümör nekroz faktörü-α.

TEX hücreleri, kronik enfeksiyonlara veya tümörlere karşı bağışıklık sisteminin yanı sıra, programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) gibi çeşitli inhibitör reseptörlerin (IR) sürekli yukarı regülasyonu ve ekspresyonundadır ("Defining an exhaustion-like program that restrains autoreactive CD8+ T cells", 2022).

IR'ler aynı anda CD8+T hücrelerinde yüksek seviyelerde mevcuttur ve T hücresi aktivasyonuna zarar vererek T hücresinin sitotoksik öldürme kapasitesini etkilemektedir (Martinovic vd., 2016). Genel olarak CD8+T hücreleri üzerindeki inhibitör reseptör ekspresyonunun seviyesinin, CD8+T hücresi tükenmesinin derecesini büyük ölçüde etkilediği kabul edilmektedir. İnhibitör reseptör ekspresyonu olmadan CD8+T hücreleri tümörleri öldürebilir ve anti-viral işlevler yapabilir. Son araştırmalar, inhibitör reseptörlerin işlevlerini esas olarak iki farklı mekanizma aracılığıyla gerçekleştirdiğini göstermiştir. Bunlardan biri aşağı yöndeki sinyal yollarıyla TCR aktivasyonuna müdahale edilmesi ve diğeri ise CD8+T hücresi tükenmesiyle ilgili gen işaretleyicilerinin yukarı regüle edilmesidir (Dermani vd., 2019; Wherry & Kurachi, 2015). Nükleer faktör **TOX**, Tex hücrelerinin gelişimini önemli ölçüde düzenler. TOX'in ektopik ekspresyonu TEFF hücrelerinde yorulmaya neden olurken, TOX'in Tex hücrelerinde silinmesi bu yorulmayı tersine çevirir (Scott vd., 2019). CD8+T hücrelerinde, NFAT1'in AP-1 ile etkileşimini inhibe etmek T hücresindeki yorgunluk transkripsiyon programını arttırdığı ve murin modellerinde enfeksiyon ve tümör büyümesini kontrol etme yeteneğini azalttığı gözlemlenmiştir (Martinez vd., 2015). Buna ek olarak, NR4A ve TOX de T hücrelerinin yorulma programında yer almaktadır (Blank vd., 2019). (**Şekil 10**).

2.13.1. PD-1 Yorgunluk Belirteci

Önceki çalışmalar, CD28 transmembran protein reseptörlerinin ailesi olan programlanmış hücre ölümü reseptörü-1 (PD-1)'in ilk inhibitör reseptörlerinin olduğunu göstermiştir. PD-1, insan kanserlerinde anti-kanser T hücresi bağışıklığını baskılamak için PD-L1 ile etkileşime girmektedir (Dolina vd., 2021; Morad vd., 2021). Çok sayıda araştırma, PD-1 ve PD-L1'in işlevlerinin ek mekanizmalarını göstermiştir. Örneğin, PD-L1, TCR'lerin sitozolik bölgesinde tirozin fosforilasyonu yoluyla T hücresi proliferasyonunu inhibe eder. T hücresi aktivasyonu, karşılıklı etkileşim nedeniyle azalmaktadır (Freeman vd., 2000). Yapılan çalışmalarda, kronik enfeksiyon sırasında virüse özgü CD8+T hücrelerindeki diferansiyel gen ekspresyonunu analiz edilmiş olup (Barber vd., 2006), PD-1'in, fonksiyonel TEX hücrelerinde aşırı ekspresyonu büyük ölçüde yukarı doğru düzenlediği bulunmuştur (Day vd., 2006; Iwai vd., 2005; Wherry, 2011). PD-1, tipik olarak viral enfeksiyonun hemen ardından aktive edilmiş CD8+ T hücrelerinde kısa süreli bir ekspresyon gösterir ve kısa bir viral antijen aktivasyonu döneminden sonra seviyeleri genellikle normal kalır. Bununla birlikte, PD-1 TEX

hücrelerinde yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir (Day vd., 2006; Wherry, 2011; Zarour, 2016). Son çalışmalar, PD-1 blokajının T hücrelerinin tükenmesini değiştirebildiğini ve bağışıklık hücrelerinin kanser hücrelerini güçlü bir şekilde öldürmesini tetikleyebildiğini göstermiştir (J. Liu vd., 2016).

2.13.2. LAG-3 Yorgunluk Belirteci

Hücre içi immünreseptör tirozin bazlı inhibitör motifler (ITIM) olmayan inhibitör reseptör ailesi olan tükenmiş T hücrelerinde, lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3)'ün ekspresyonu yüksektir. LAG-3 temel olarak KLEELE motifi yoluyla T hücre döngüsünün negatif düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Puhr & Ilhan-Mutlu, 2019; Woo vd., 2012). LAG-3, TEFF aktivitesini büyük ölçüde baskılayacak ve tümör mikro ortamına (TME) karşı bağışıklık toleransını teşvik edecek olan ligandına bağlanmaktadır. LAG-3'e karşı antikorlar, pankreas ve metastatik meme kanserlerinde incelenmiştir. LAG-3'ün tek başına bloke edilmesi, kronik LCMV enfeksiyonu sırasında TEX fonksiyonu üzerinde çok az etkiye sahiptir, ancak PD-1 ile birlikte bloke edilmesi, T hücresi sitotoksitesini etkili bir şekilde yeniden kazanabilir. Klinik olarak son yıllarda LAG-3'ü hedef alan tedavilerde örneğin, melanom tedavisi için yeni onaylanmış LAG-3 immün kontrol noktası inhibitörü Relatlimab ile beraber PD-1 inhibitörü Nivolumab, tek başına nivolumaba kıyasla hayatta kalma oranını iki kattan fazla artırabilir ve tedavinin yan etkilerini azaltabilmektedir (Tawbi vd., 2022).

2.13.3. TIM-3 Yorgunluk Biyobelirteci

T hücresi immünoglobulin ve müsin alanı içeren molekül 3 (TIM-3), immünoglobulin süper ailesine aittir ve bir tür tip 1 transmembran glikoproteinidir. Dentridik hücreler, CD4+T hücreleri ve CD8+T hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilen negatif düzenleyici bağışıklık molekülleridir (Anderson vd., 2016; F. Liu vd., 2018). Son araştırmalar, TIM3'ün, kanser, kronik viral enfeksiyonlar ve işlevsiz veya "tükenmiş" T hücreleri üzerinde birden fazla ortak inhibitör reseptör (kontrol noktası reseptörleri) içeren bir modül olduğunu göstermiştir (Wolf vd., 2020).

Genel olarak, PD-1, LAG3 ve benzerlerini içeren birçok hücre yüzeyi inhibitör reseptörü, T hücresi tükenmesinin ortak düzenlenmesinde meydana gelmektedir (Chihara vd., 2018). Araştırmacılar, çoklu inhibitör reseptörlerin bir arada ekspresyonunun tümöre özgü sitotoksik T hücrelerine zarar verebileceğini göstermiştir.

T hücrelerindeki fonksiyonel bozulmanın derecesi, inhibitör reseptörlerin sayısı ve türü ile ilişkilidir (Tonnerre vd., 2021; Wherry, 2011; Yi vd., 2022). Sonuç olarak, IR inhibitörleriyle kombine tedavi, klinik kanser tedavisinde daha uygun seçeneklerdir (Chen vd., 2019).

CAR-T hücresi tedavisinin etkinliği, T hücresi tükenme seviyesine bağlıdır. Hücre kültüründe T hücresi tükenmesinin, CAR-T hücrelerinin anti-tümör etkinliğini sınırladığı gösterilmiştir (D. G. Tantalos vd., 2021). CAR-T hücresi tükenmesi, PD1, CTLA4 ve LAG3 gibi çoklu inhibitör reseptörlerin yukarı regülasyonunu içermektedir. Bunların tümör hücreleri üzerindeki karşılık gelen ligandlara bağlanması, tükenmiş T hücrelerinin işlev bozukluğuna ve tümör immün kaçışına yol açmaktadır. 2016 yılında yapılan bir çalışmada, PD1 aracılı hücre tükenmesinin CAR-T hücresi fonksiyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini kanıtlanmıştır. *In vitro* ve klinik öncesi hayvan modellerinde PD1-PDL1 yolunun PD1 inhibitörleri tarafından bloke edilmesi veya PD1 ekspresyonunun kendiliğinden bloke edilmesi, tükenmeye direnmeye yardımcı olabilir (Cherkassky vd., 2016). Bu nedenle, PD1 ve CTLA4 inhibitörleri, inhibitör reseptör yolunu bozmayı amaçlayarak tümör bağışıklığını geliştirmek için klinik uygulamalarda kademeli olarak kullanılmıştır. Dirençli/nükseden B hücreli Hodgkin dışı lenfoma hastalarında CD19 CAR-T hücrelerinin anti-PD1 antikor (Nivolumab) ile kombinasyonunda ise hastaların %45,45'inde tam yanıtın elde edilebildiğini gözlemlenmiştir (Cao vd., 2019).

2.14. Kanser Araştırmalarında Kemirgen Modelleri

Geçtiğimiz birkaç on yılda anti-kanser ilaçların keşfedilmesi ve kanserin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, bu teknolojilerin klinik uygulamaları çok sınırlıdır (Landgraf vd., 2018; Zitvogel vd., 2016). Bunun temel nedenlerinden biri, bu çalışmaların çoğunun kemirgen modellerine dayanmasıdır, çünkü kemirgenlerin insanlardan önemli fizyolojik farklılıkları vardır. Bu nedenle kemirgen kanser modelleri, kanser hastalarının fizyolojisini doğru bir şekilde simüle edememektedir. Bu durum, kanser modellerini daha kapsamlı ve doğru biçimde göstermek ve üzerinde çalışmalar yapmak için daha uygun yeni hayvan modellerinin geliştirilmesini gerektirmektedir (Perrin, 2014).

İnsan kökenli tümörler taşıyan hayvanlar ilk olarak insan kanser hücre dizileri aşılanmış T hücresi eksikliği olan Nude fareler kullanılarak geliştirilmiş olup bu kemirgen modelleri, insan onkogenezi incelemek için popüler bir *in vivo* platform haline gelmiştir

(Fogh vd., 1977). Adaptif (T ve B hücreleri) ve doğuştan gelen (NK hücreleri ve makrofajlar) bağışıklık tepkilerinin aracılık ettiği insan kanser hücrelerinin reddedilmesinin üstesinden gelmek için bağışıklık yetersizliği olan fareler geliştirilmiştir (Shultz vd., 2012). NOD/SCID ve NOD/SCID IL2rg^{-/-} fareleri gibi daha ciddi immün yetmezliklere sahip farelerin geliştirilmesi, primer insan kanser hücrelerinin yeniden çoğaltılması için kemirgenlerin kullanılmasını kolaylaştırmıştır (Hidalgo vd., 2014). Bu fare modellerinin kanser araştırmalarında uygulanması, insan kanser biyolojisi araştırmalarını, anti-kanser ilaç araştırmalarını büyük ölçüde kolaylaştırmakta ve yeni immünoterapilerin geliştirilmesinin önünü açmaktadır (S. Aparicio vd., 2015). Özellikle NSG fareler kullanılarak Akut miyeloid lösemi (AML), Akut lenfositik lösemi (ALL), Kronik lenfositik lösemi (KLL), Kronik miyelojen lösemi (KML), Non-Hodgkin lenfoma (NHL) gibi çeşitli insan hematolojik maligniteleri yetiştirilebilmektedir (Alves vd., 2012; Bagnara vd., 2011; Chao vd., 2010; Goardon vd., 2011; B. Zhang vd., 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırmada moleküler biyoloji analiz ve inceleme yöntemleriyle *in vitro* hücresel ve *in vivo* hayvan çalışmaları yapılmıştır.

3.2. Araştırmanın Modeli

Bu çalışmada kantitatif bir araştırma modeli tercih edilmiştir.

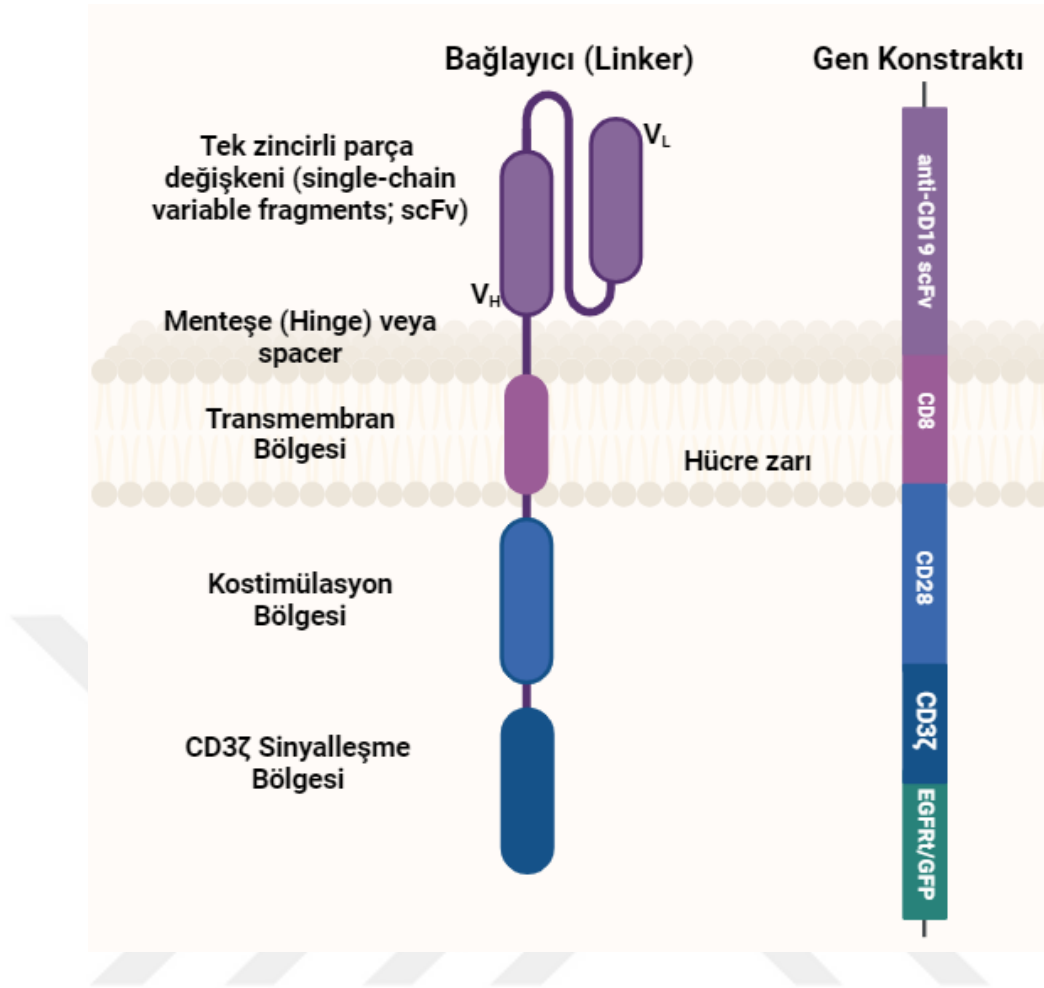
3.3. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmaların tümü T.C. ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ TRANSGENİK HÜCRE TEKNOLOJİLERİ VE EPİGENETİK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ (TRGENMER)'nde 2021-2023 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.4. Araştırmanın Evren ve Örneklemi

3.4.1. Lentiviral Vektörlerin ve CD19'a Özel CAR Gen Dizisinin (CD19-CD8-CD28-CD3z) Sentezi ve Transformasyonu

CAR gen tasarımı (anti-CD19 scFv-CD8-CD28-CD3z-EGFRt/GFP), FMC63 klon anti-CD19 monoklonal antikorun scFv bölgesi, CD8 menteşe bölgesi, CD28 transmembran ve ortak uyarıcı sinyal alanı dizileri ve CD3z hücre içi sinyal dizilerini içermektedir (Şekil 11).



Şekil 11. CAR gene dizaynı ve bileşenleri.

CD19-CD28z'ye spesifik CAR'ı (**CD19-CD8-CD28-CD3z**) kodlayan lentiviral vektör, GenScript'ten tasarlanıp sentezlenmiştir. Lentivirüs üretimi için gerekli olan zarf ve paketlenme plazmidleri **pCMV-VSV-G** plazmiti (from Bob Weinberg (Addgene #8454; <http://n2t.net/addgene:8454>; RRID: Addgene_8454)) ve **psPAX2** plazmiti (from Didier Trono (Addgene # 12260); <http://n2t.net/addgene:12260>; RRID: Addgene_12260)) olup, her iki plazmid de Addgene'den elde edilmiştir. CAR kodlayan plazmit ile lentiviral üretim için gerekli VSVG ve psPAX2 plazmitleri ısı şoku metoduyla birlikte *E. coli* DH5a suşuna (NEB C2987H) aktarılmıştır. Plazmid DNA'nın kompetent *E.coli*'ye aktarımından sonra, transforme bakteriler Ampisilin içeren LB Agar besiyerleri üzerinde gece boyunca (overnight) 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra bu bakteriler, izolasyon öncesinde LB Broth besiyerlerinde 37°C'de büyütülmüştür.

3.4.2. Plazmid DNA Üretimi ve Agaroz Jel Elektrofözezi

3 farklı Plazmid DNA, CompactPrep Plazmid Maxi Kit (QIAGEN, Cat No: 12863) ve Zymopure Plazmid Maxiprep Kit (Zymopure, Cat: D4202) kullanılarak üretilmiştir. Üretilen plazmid DNA'nın ng/μL cinsinden konsantrasyonu Mikroplak Okuyucu (FLUOstar OMEGA) ile belirlenerek kalite kontrol testleri yapılmıştır. Plazmid DNA saflık değeri 1,8 < A₂₆₀/A₂₈₀ < 2,0 arasında olup olmadığı değerlendirilmiştir. Plazmid DNA kalite kontrolü kabul kriterleri **Tablo 2**'te listelenmiştir (Taştan vd., 2020). İzole edilen plazmidlerin kontrolü için agaroz jel elektrofözezi yapılmıştır. İzole edilen DNA örnekleri BIO-RAD jel elektroföze sistemi kullanılarak 1X TAE tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan %1 agaroz jele yüklenerek, örnekler 90 V'de ve 60 dakikada yürütülmüştür. Lentivirüs üretimi için <%1 bakteriyel DNA kontaminasyonuna sahip plazmit DNA örnekleri kullanılmıştır. Bakteriyel Kromozomal DNA Kontaminasyonu ve Süper Sarmal Plazmid DNA Jel Elektrofözezi *Biorad Molecular Imager Gel Doc Imaging System* ile analiz edilmiştir.

Tablo 2. Plazmid DNA Kalite Kontrol Kriterleri (Taştan vd., 2020)

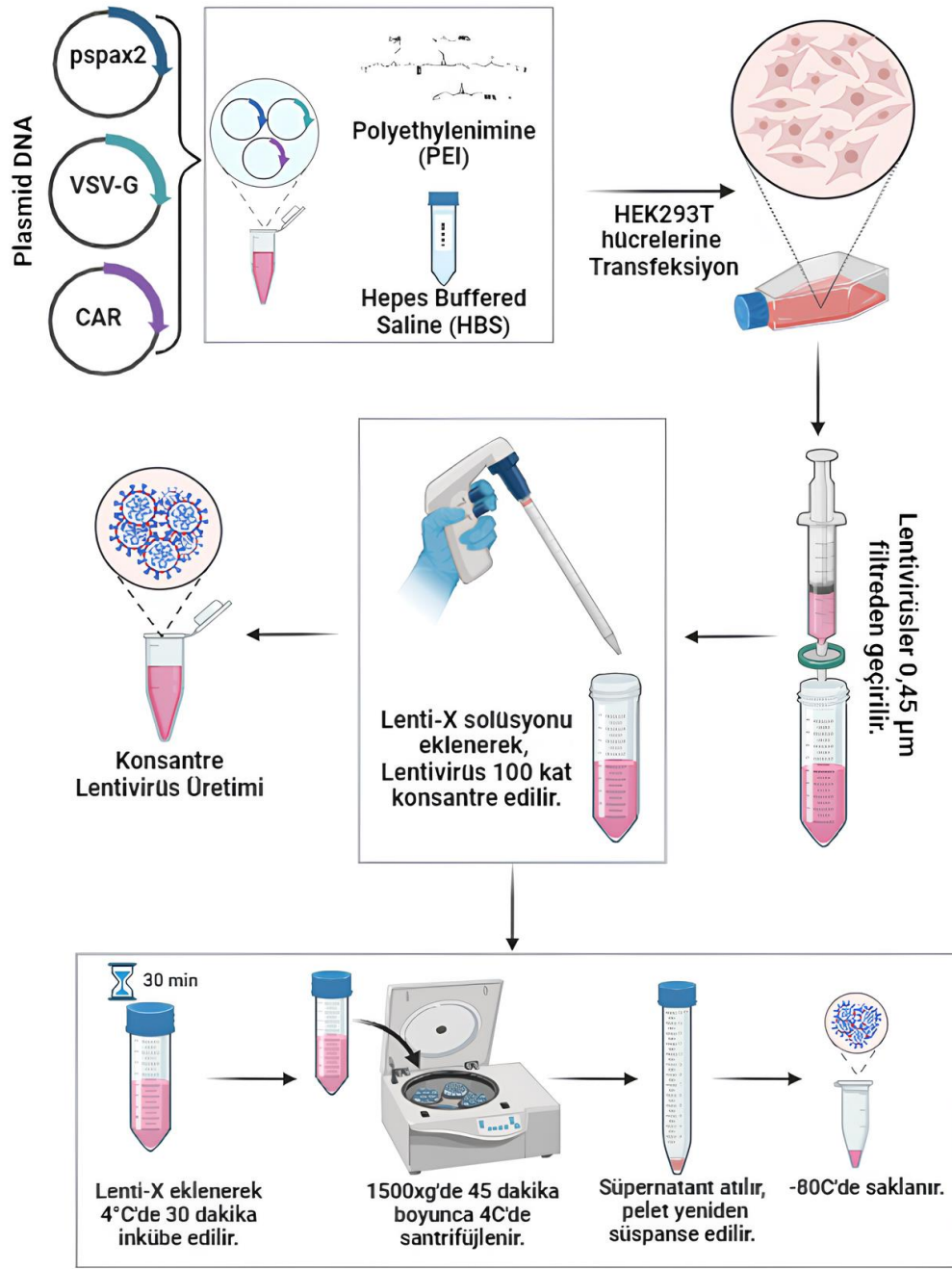
Plazmid Kalite Kontrol Testleri	Method	Kabul Aralığı
DNA Konsantrasyonu	Microplate Reader (FLUOSTAR OMEGA)	>0.1 μg/μl
DNA Saflık	Microplate Reader (FLUOSTAR OMEGA)	1.8 < A ₂₆₀ /A ₂₈₀ < 2.0
Bakteriyel Kromozomal DNA Kontaminasyonu	Jel Elektroföze ve Görüntüleme Sistemi	<%1 (w/w)
Supercoiled Plazmid DNA	Jel Elektroföze ve Görüntüleme Sistemi	>%80
Endotoksin	Gel Clot	<0.25 EU/mL
Mikrobiyolojik Kalite Kontrol	TSA Plate Culture	Negatif
Mikoplazma	PCR	Negatif
Mantar Kültürü	Kültür	Negatif

3.4.3. Transfeksiyon ve Lentivirüs Üretimi

İzole edilmiş zarf, paketlenme ve CAR plazmitleri, lentivirüs üretmek için Polietilenimin (PEI) (PolyScience 23966-100) veya FuGENE (Promega, Madison, WI, ABD, E2311) transfeksiyon reaktifi kullanılarak HEK293T (Human Embryonic Kidney Cells; İnsan

Embriyonik Böbrek Hücreleri) konakçı hücrelerine (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren yüksek Glikoz içeren Gibco/Capricorn DMEM ortamı içerisinde) transfekte edilmiştir. pDNA/PEI oranının 0,4-1 mg/ml olmasını sağlayacak şekilde PEI reaktifi içeren plazmitler ve lentivirüs üretimi, konakçı hücre olarak HEK293T kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ming Hsu & Uluda Ğ, 2012) (**Şekil 12**). Transfeksiyon medyası olarak %1 Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum; FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren Gibco/Capricorn DMEM (High-Glucose) medyası tercih edilmiştir.

Transfeksiyonun gerçekleştirilmesinin ardından 6 saat boyunca hücreler inkübe edilmiş ve sonrasında kültür medyaları %3 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren Gibco/Capricorn DMEM (High-Glucose) medyası ile değiştirilmiştir. Transfeksiyondan 72 saat sonra, paketlenmiş rekombinant lentivirüsler HEK293T hücre kültürlerinin süpernatantından toplanıp elde edilmiştir. Üretilen CAR lentivirüsleri, virüs konsantrasyonunu (100X) artırmak için Lenti-X Concentrator (Takara Bio, Shiga, Japonya, 631232) kullanılarak konsantre edilmiştir. Lenti-X solüsyonu eklenip örnek 4°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra, 45 dakika boyunca 1500xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjlemeden sonra süpernatant uzaklaştırılarak pelet, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-glutamin, 1X MEM vitamin çözeltisi ve 1X Esansiyel Olmayan Amino Asit (Non-Essential Amino Acid; NEAA) içeren RPMI 1640 ortamında çözülmetedir. Konakçı hücre proteini (Host Cell Protein; HCP) kalıntılarını filtrelemek için üretilen lentivirüsler, bir Amicon filtresi (100 kDa) kullanılarak diafiltrelenmiştir. Uzun süreli saklama için, HCP oranı <200 ng/ml olan ve *Mycoplasma hominis/genitalium* için negatif olan virüs örnekleri -80 °C'de saklanmaktadır.



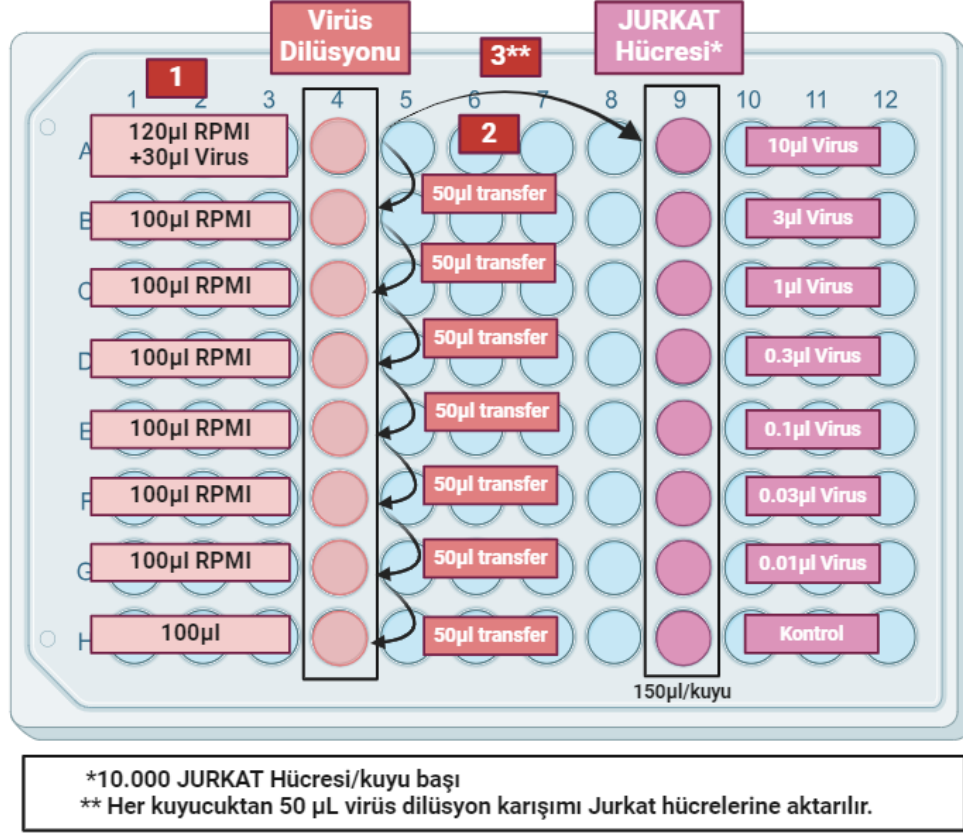
Şekil 12. Transfeksiyon deney basamakları.

Tablo 3. Lentivirüs Kalite Kontrol Kabul Kriterleri (Taştan vd., 2020)

<i>Lentivirüs için Testler</i>	<i>Method</i>	<i>Kabul Aralığı</i>
Replikatif Kompetent Lentivirüs	Hücre Kültürü	<%1
Lentivirüs Miktar Tayini	Hücre Kültürü	>1x10 ⁶ IFU
Lentivirüs Kantifikasyonu p24 ELISA kiti	ELISA	>1x10 ⁶ IFU
Host Cell Protein Kalıntısı	HCP Kit	<200 ng/mL
Mikrobiyolojik Kalite Kontrol	Kültür	Negatif
Mikoplazma	PCR	Negatif
Mantar Kültürü	Kültür	Negatif

3.4.4. Lentivirüs Titrasyonu (Enfeksiyon Birimi; IFU/ml)

Lentivirüslerin titrasyonu için daha önce Taştan ve arkadaşları tarafından yayınlanmış bir çalışmadaki titrasyon adımları gerçekleştirilmiştir (Taştan vd., 2020) (**Şekil 13**). Jurkat (%10 FBS, 200 U/ml Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-glutamin, 1X MEM vitamin çözeltisi ve 1X NEAA içeren RPMI 1640 ortamında) hücreleri, 96 oyuklu plaka içerisine oyuk başına 100 µL medya içerisine 10.000 hücre olarak ekilmiştir. Kuyular, 10µL, 3µL, 1µL, 0,3µL, 0,1µL, 0,03µL ve 0,01µL’de 100X konsantrasyonda CAR1928 lentivirüs içerecek şekilde kurulmuştur (**Şekil 13**). Her konsantrasyondan 50 µL CAR1928 lentivirus dilüsyonu sırasıyla Jurkat hücrelerinin bulunduğu kuyucuklara (10.000 hücre/kuyu) aktarılmış ve toplam hacim 150 µL’ye ayarlanarak hücreler 72 saat inkübe edilmiştir. EGFRt ekspresyonu, bir anti-EGFR-FITC antikoru (R&D Systems, Minneapolis, MN, ABD, FAB10951G) veya Cytoflex Akış Sitometresi (Beckman Coulter, Brea, CA, ABD, B5-R3-V0) ile analiz edilen GFP ekspresyonu kullanılarak belirlenmiştir. Lentivirüs konsantrasyonu, mililitre başına Enfeksiyon Birimi (IFU/ml) cinsinden QuickTiter™ Lentivirüs Titre Testi (p24 ELISA Testi) ile doğrulanmıştır.



Şekil 13. Virüs titrasyon deney seti.

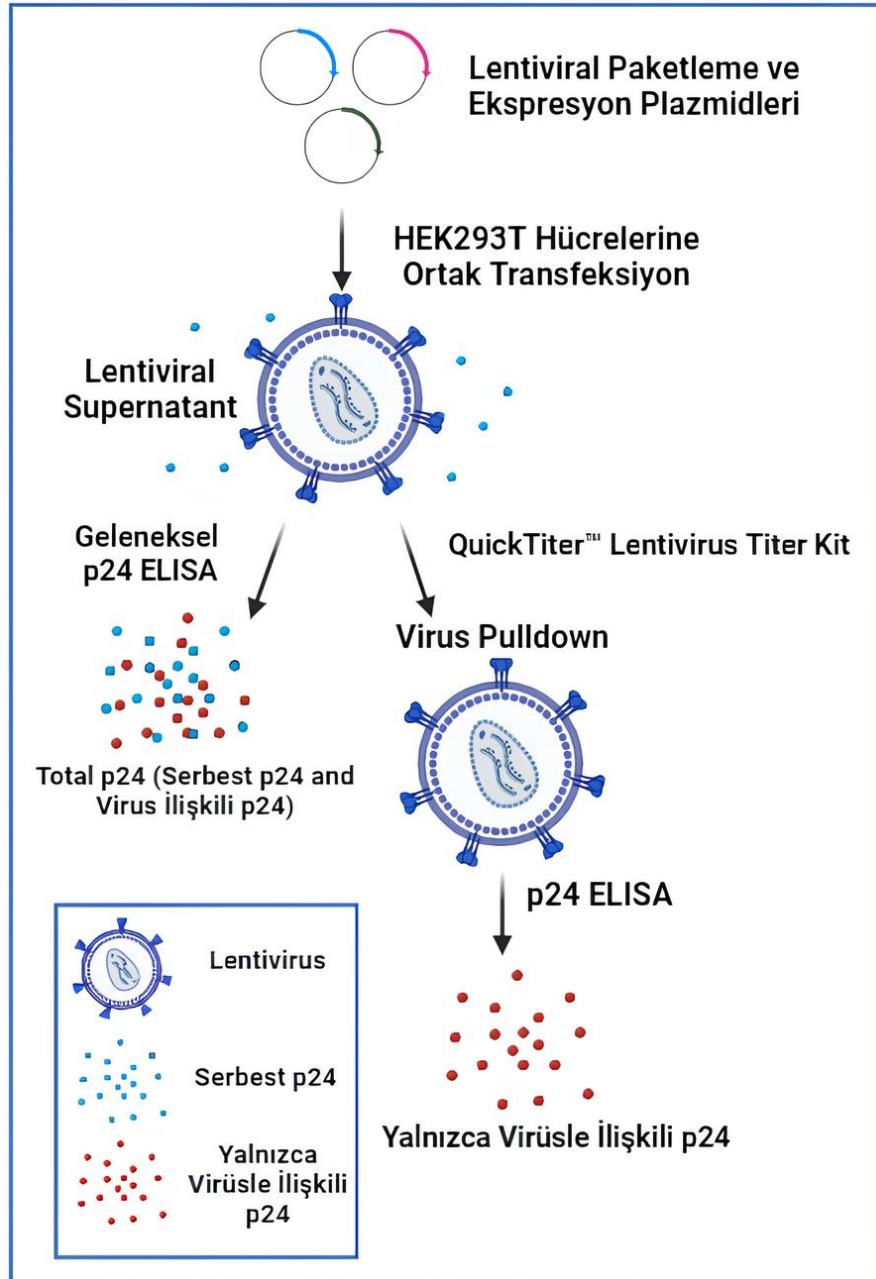
3.4.5. QuickTiter™ Lentivirüs Titre Testi p24 ELISA Testi

Lentivirüs partikülleri, virionun bileşenlerini kodlayan 3 veya 4 plazmidin HEK293T hücrelerine geçici transfeksiyonu yoluyla üretilmektedir. 48-72 saat içinde paketlenme hücreleri (packaging cells) tarafından üretilen viral partikülleri içeren viral media toplanmaktadır. Transdüksiyon deneylerine devam etmeden önce, psödo viral ortamın canlı olmasını sağlamak ve hedef hücreye entegre viral yapılardaki kopya sayısını kontrol etmek için **virüs titresi** (viral titre) belirlenmelidir. HIV p24 ELISA testi, lentivirüs numunelerini tespit etmek için de kullanılmaktadır. Bununla birlikte, geçici transfeksiyon sırasında HEK293T hücreleri tarafından üretilen hem lentivirüsle ilişkili p24'ü hem de serbest p24'ü tanır. Bu nedenle, toplam p24 seviyeleri olarak ifade edilen lentivirüs p24 ve serbest p24 seviyeleri, lentivirüs süpernatant numunelerindeki virüs partiküllerini doğru bir şekilde tanımlamak için kullanılamamaktadır. QuickTiter™ Lentivirus Titer Kit (Lentivirus Associated HIV p24, Cell Biolabs), sadece lentivirus ile ilişkili HIV-1 p24 çekirdek proteininin tespiti ve miktarının belirlenmesi için özel olarak tasarlanmış enzim bağlantılı bir immünosorbent testidir.

ViraBind™ lentivirus reaktifleri ile kompleks oluşturdudan sonra, serbest p24 süpernatantta kalırken, lentivirus ile ilişkilendirilmiş p24 miktarı bir HIV p24 ELISA ile ölçülür. Kiti'nin HIV p24'nin algılama hassasiyet sınırı 1 ng/mL, yani yaklaşık olarak 10,000 ila 100,000 TU/mL VSVG-pseudotipli lentivirus örnekleri içindir. Hem viral süpernatant hem de saflaştırılmış virüs için hızlı bir şekilde lentivirus titre tayini yapmak için QuickTiter™ Lentivirus Titer Kiti (Lentivirus Associated HIV p24) kullanılmaktadır (**Şekil 14**). **1X Yıkama Tamponu için** 10X Yıkama Tamponu deiyonize suyla 1X'e seyreltilmiştir. **FITC-Konjuge Anti-HIV1 p24 Monoklonal Antikor ve HRP-Konjuge Anti-FITC Monoklonal Antikoru** kullanımdan hemen önce FITC-konjuge antikor 1:1000 ve HRP-konjuge antikor 1:1000'i Assay Diluent ile seyreltilmiştir. **Standart Eğrinin Hazırlanması için** Sample Diluent içinde p24 stok solüsyonunu seyrelterek 100 ng/ml-1 ng/ml konsantrasyon aralığında bir rekombinant HIV-1 p24 antijeni seyreltme serisi hazırlanmıştır. Her bir standart tüpü iyice vortekslenir ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.

Lentiviral Numunelerin Hazırlanması ve İnaktivasyonu için kullanılacak olan Lentiviral örnekler ilk olarak 3 µl virüs + 197 µl Soğuk RPMI medyası şeklinde seyreltilmiştir. Total hacim her örnek için 200 µl olarak hazırlanmıştır. 10 µL **ViraBind™ Lentivirus Reagent A (100X)** (Part No. 310701) hazırlanan örneklerle eklenip iyice karıştırılmıştır. Sonra 10 µL **ViraBind™ Lentivirus Reagent B (100X)** (Part No. 310702) eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılıp pelletler 250 µL **Sample Diluent** (Part No. 310703) içinde çözülmüştür. Vortexlendikten sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Anti-p24 Antikoru ile kaplı (Part No. 310801) plakaya, 100 µL inaktive edilmiş **lentiviral numune** eklenmiştir. Plaka Örtüsü ile örtülerek gece boyunca 4°C'de inkübe edilir. Kullanılan her kuyu için 3 kere 250 µL 1X Wash Buffer olacak şekilde yıkandı. Son yıkamadan sonra hafifçe 96 oyuklu plaka havlu kağıda vurulur. Her bir kuyucuğa, 100 µL seyreltilmiş **FITC-Konjuge Anti-p24 Monoklonal Antikor** (Part No. 310810) eklendi. Plakanın üstü kapatılarak orbital çalkalayıcıda, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra tekrardan her kuyu için 3 kere 250 µL 1X Wash Buffer olacak şekilde yıkanır. Son yıkamadan sonra plaka hafifçe havlu kağıda vurulur. Sonra tüm kuyucuklara 100 µL **HRP- Konjuge Anti-FITC Monoklonal Antikor** (Part No. 310811) eklenir. Plakanın üstü kapatılarak orbital çalkalayıcıda, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.

Tekrardan her kuyu için 3 kere 250 µL 1X Wash Buffer olacak şekilde yıkandı ve plaka hafifçe havlu kağıda vurulur. Her kuyucuğa 100 µL **Substrate Solution** (Part No. 310807) eklenir ve orbital çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 10-15 dk inkübe edilir (inkübasyon süresi 2-30 dakika arasında değişebilir.). Son olarak her kuyucuğa 100 µL **Stop Solution** (Part. No. 310808) eklenip ELİSA Plate Okuyucuda 450nm’de absorbans okutulur.



Şekil 14. QuickTiter™ Lentivirüs Titre Testi p24 ELISA Testi.

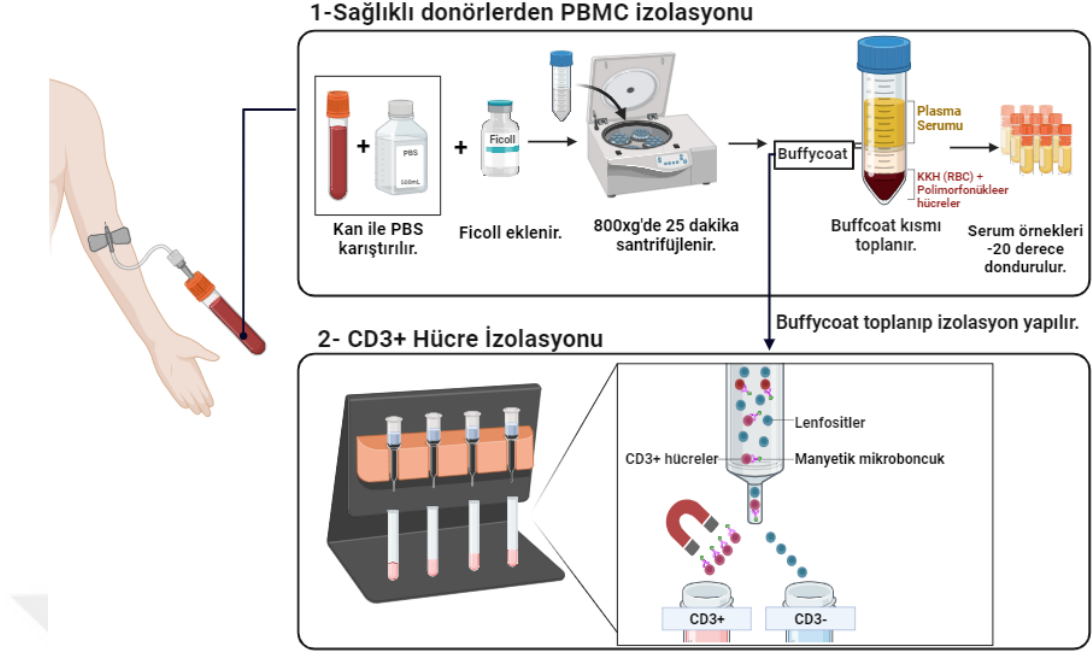
3.4.6. HEK 293 Host Cell Proteins (HCP) Assay

HCP ELISA Kiti (Cygnus Technologies, Catalog #F650S), HEK konakçı hücrelerinde transgenik ekspresyon kullanılarak oluşturulan ürünlerde HEK konakçı hücre proteini (HCP) safsızlıklarının varlığının belirlenmesinde kullanılmak üzere tasarlanan bir kittir. HCP safsızlığı, terapötik maddelerin etkisini azaltabilir ve toksik veya immünolojik reaksiyonlara neden olabilir. Bu nedenle, HCP safsızlıklarının pratikte en düşük seviyelere indirilmesi istenmektedir. HEK testi iki bölge bir immünoenzimometrik testtir. HEK293 hücre proteinlerini içeren lentivirüs numuneleri, antikor ile kaplanmış mikrotitre şeritlerinde reaksiyona girmektedir. HEK 293 hücrelerinde viral vektörlerin ifadesi, istenen bir virüsün yeterli miktarlarını elde etmek için yaygın olarak kullanılan bir prosedürdür. Bu ürünlerin üretim ve saflaştırma işlemi, HEK 293 hücrelerinden konakçı hücre proteinleri (HCP; Host Cell Protein) tarafından üretilen transgenik proteinlerin saflığını ölçmek için kullanılmaktadır. 96'lık plate üzerine her kuyucuğa 100µL **anti-HEK:HRP** (#F651S) eklenmiştir. Ardından, Kuyucuklara 50µL, standartları, kontrol örnekleri ve numuneler ayrı kuyulara olmak üzere eklenir. (örn. Standart (200ng), Negative Kontrol, lentivirüs örnekleri). Örnekler 96'lık plate'e eklendikten sonra kapağı kapatılır ve oda sıcaklığında 1,5 saat orbital çalkalayıcıda 400-600rpm'de inkübe edilir. İnkübasyondan sonra kuyular boşaltılıp, sıvının çoğunu çıkarmak için emici kâğıdın üzerine sıkıca vurulmuştur. 350 µl **Wash Concentrate (yıkama solüsyonu) (F004)** kullanarak yıkanır ve tekrar emici kâğıt üzerine vurulur. Kuyuların kurummasına izin vermeden yıkama işlemi 4 defa tekrar edilir. Kuyuların üzerine 100µL **TMB substratı** (#F005) eklenip, plaka orbital çalkalayıcı kullanmadan oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir. 100µL **Stop Solution** (#F006) eklendikten sonra Elisa Plate Okuyucuda 450/650nm'de absorbansta okutulur.

3.4.7. T Cell Transdüksiyonu and CAR-T Kültür Koşulları

Bu tez çalışması için alınacak kan örnekleri, Acıbadem Üniversitesi ve Acıbadem Sağlık Kuruluşları Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (**ATADEK-2019-17/31**). Üsküdar Üniversitesi'nin Transgenik Hücre Teknolojileri ve Epigenetik Uygulama ve Araştırma Merkezi (TRGENMER) tarafından yapılan periferik kan mononükleer hücre (PBMC) izolasyonu için sağlıklı yetişkin donörlerden kan alınmıştır. Üç sağlıklı donörden alınan kan örnekleri PBS ile 1:1 oranında karıştırılmıştır.

Daha sonra, kan ve PBS 1:1 oranında yavaşça Ficoll'e (Paque PREMIUM 1.073, 17-5446-52) eklenmiştir. Ficoll ile muamele edildikten sonra örnekler 800xg'de 25 dakika santrifüj edilmiştir (Acc:9, Brak:0) (**Şekil 15**). Santrifüj sonrası oluşan Buffycoat fraksiyonu toplanmıştır. PBMC'ler yoğunluk gradyanlı santrifüj yöntemiyle izole edilmiştir. Daha sonra toplanan hücrelerin üzerine PBS eklenerek 400xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve bu işlem süpernatant berraklaşana kadar tekrarlanmıştır. Son adımda, süpernatant atılır ve peletler çözülerek izolasyon için hazır hale getirilmektedir. CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin PBMC'den izolasyonu için anti-CD4 ve anti-CD8 mikroküreler yerine anti-CD3 mikroküreler (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Almanya, 130-050-101) kullanılarak CD3+ T hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total CD3+ T hücreleri anti-CD3 mikroküreler (Miltenyi Biotech, 130-050-101) kullanılarak izole edilmiştir. İlk T hücresi aktivasyonu anti-CD3/anti-CD28 mikrobuncuklar (T Cell TransAct, Miltenyi Biotech, 130-111-160) ve 10µg/mL Phytohemagglutinin-M (PHA-M) (Roche 11082132001, 20 mg) ile gerçekleştirilmiştir. Lentivirüs transdüksiyon prosedürü, Vectofusin-1 (10 µg/mL) (Miltenyi Biotech, 130-111-163) ve BX-795 hidroklorür (6 µM) (Millipore Sigma, Burlington, MA, ABD, SML0694- 5MG) 2-3 MOI lentivirüs ile kültüre edilmiştir. Hücreler 14 gün boyunca T hücre ortamında (50 IU/mL IL-2, 10 ng/mL IL-7, 5 ng/mL IL-15, %10 FBS ve %1 Pen/Strep) kültüre edilmiştir. CAR ekspresyon seviyeleri, anti-EGFR-FITC antikoru kullanılarak Cytoflex Akış Sitometresi analiziyle veya Cytoflex Akış Sitometresi (Beckman Coulter, Brea, CA, ABD, B5-R3-V0) ile analiz edilen GFP ekspresyonuyla belirlenmiştir. İkinci aktivasyon ve genişleme (yeniden stimülasyon) çalışması 14. günde PHA ve anti-CD3/anti-CD28 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yeniden transdüksiyon deneyi, ikinci aktivasyondan 24 saat sonra 5-10 MOI lentivirüslerle Vectofusin-1 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 15. Kandan PBMC izolasyonu ve CD3+T Hücre İzolasyonu

3.4.8. T Hücre Alt-Popülasyonlarının Analizi ve Yorulma Profili

3.4.8.1. Antikor Boyama

T hücre alt-popülasyon, yorulma biyobelirteçleri ve kanser etkinlik deneyi sonrası analizleri yapmak için CAR-T ve PBMC hücrelerinin 14. ve 21. günlerde örnekler alınmıştır. Kuyular pipetaj yapılarak 100µl örnek alınıp ependorfa konulmuştur. Daha sonra 3.4.8.2, 3.4.8.3. ve 3.4.8.4 başlıklarındaki panellere göre karanlık ortamda antikor eklenmiştir. Daha sonra ependorflar vortekslenip +4 derecede 30 dakika boyunca inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonrası karanlıkta örnekler 1 ml Staining Buffer eklenmektedir. Staining Buffer, 1:20-BSA:Rinsing Solution içermektedir. Staining Buffer eklendikten 400xg hızda 5 dakika santrifüj edilmektedir. Süpernatant vakum yardımıyla çekilmektedir. Ardından 100 µl staining buffer içinde pelletler çözündürülerek Flow Sitometri cihazında analiz edilmektedir.

3.4.8.2. T Hücre Alt-Popülasyon Analizi

CAR-T ve PBMC hücrelerinin 14. ve 21. günlerdeki T hücresi alt popülasyon profili çalışmaları CD3-PC7 (Beckman Coulter, 6607100), CD4-APC-A700 (Beckman Coulter, B10824), CD8-PC5.5 (Beckman Coulter, B21205), EGFR-A488 (R&D Systems, FAB10951G), CD45RA-ECD (Beckman Coulter, IM2711U), CD45RO-PE (Miltenyi Biotech, 130-113-559), CD27-APC-A750 (Beckman Coulter, B12701) ve CD62L-APC (Miltenyi Biotech, 130-113-617) antikorları Cytoflex Flow Sitometri cihazı ile **3.4.8.1. Antikor Boyama** ile analiz edilmiştir (**Şekil 16**).

3.4.8.3. T Hücrelerinin Yorulma Profili Analizi

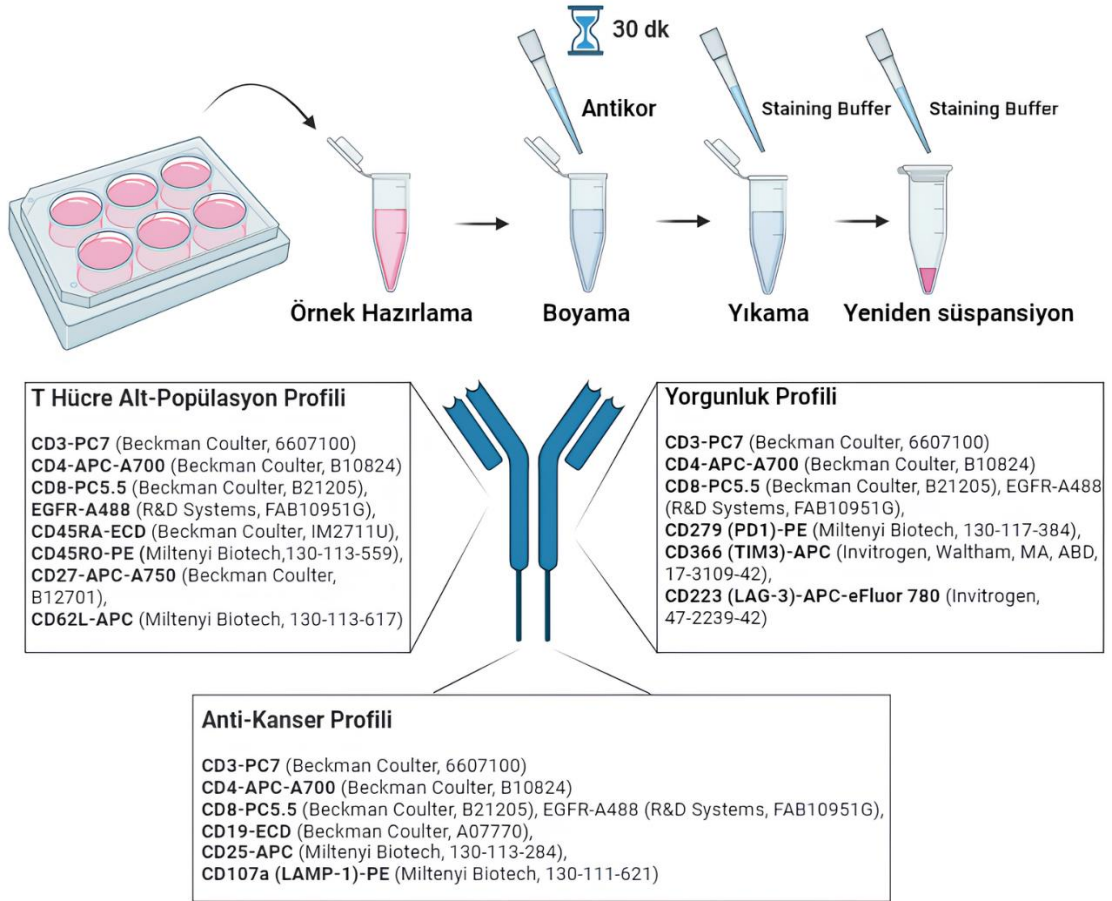
CAR-T ve PBMC hücrelerinin 14. ve 21. günlerdeki tükenme profili çalışmaları CD3-PC7 (Beckman Coulter, 6607100), CD4-APC-A700 (Beckman Coulter, B10824), CD8-PC5.5 (Beckman Coulter, B21205), EGFR-A488 (R&D Systems, FAB10951G), CD279 (PD1)-PE (Miltenyi Biotech, 130-117-384), CD366 (TIM3)-APC (Invitrogen, Waltham, MA, ABD, 17-3109-42) ve CD223 (LAG-3)-APC-eFluor 780 (Invitrogen, 47-2239-42) antikorları kullanılarak Cytoflex Flow Sitometri analizi ile **3.4.8.1. Antikor Boyama** analiz edilmiştir (**Şekil 16**).

3.4.9. İn Vitro Anti-Tümör Sitotoksiste ve Etkinlik Deneyi

Etkinlik ve sitotoksik kapasitenin değerlendirilmesi için CAR-T hücreleri (CD19-CD28z ve CD19-BBz) ile in vitro çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, anti-CD19 eksprese eden CAR-T hücreleri ve CD19 eksprese eden RAJI hücreleri 24 saat, 7 gün ve 14 gün boyunca farklı oranlarda (CAR-T: RAJI; 1:1, 5:1, 10:1) kültüre edilmiştir. Anti-kanser profillemeye çalışmaları 14. ve 21. günlerde CD3-PC7 (Beckman Coulter, 6607100), CD4-APC-A700 (Beckman Coulter, B10824), CD8-PC5.5 (Beckman Coulter, B21205), EGFR-A488 (R&D Systems, FAB10951G), CD19-ECD (Beckman Coulter, A07770), CD25-APC (Miltenyi Biotech, 130-113-284) ve CD107a (LAMP-1)-PE (Miltenyi Biotech, 130-111-621) antikorları ile **3.4.8.1.**'de belirtilen boyama yöntemiyle boyanıp Cytoflex Akış Sitometresi ile analiz edilmiştir (**Şekil 16**).

Ko-kültür deneylerinde, 48 saat sonra CD19+ RAJI hücrelerinin ölümü ve CD3+T hücrelerinde CAR-T hücrelerinin ve kontrol T hücrelerinin CD25 aktivasyonu (IL2RA, IL-2 reseptör alfa zinciri) ve CD107a (Lenfositlerin degranülasyonu için işaretleyici) sitotoksik degranülasyon biyobelirteçleri akış sitometrisi ile analiz edilmiştir.

RAJI hücrelerinin ve CAR-T hücrelerinin hücre canlılığını kontrol etmek için CAR-T hücrelerinin sağkalım analizi yapılmıştır. Hayatta kalan hücreleri tanımlamak ve saymak için tripan mavisi (Biological Industries, #03-102-1B) uygulanmıştır. Hücre sayımı ve canlılık analizi BIO-RAD TC20 Otomatik Hücre Sayacı ile gerçekleştirilmiştir.



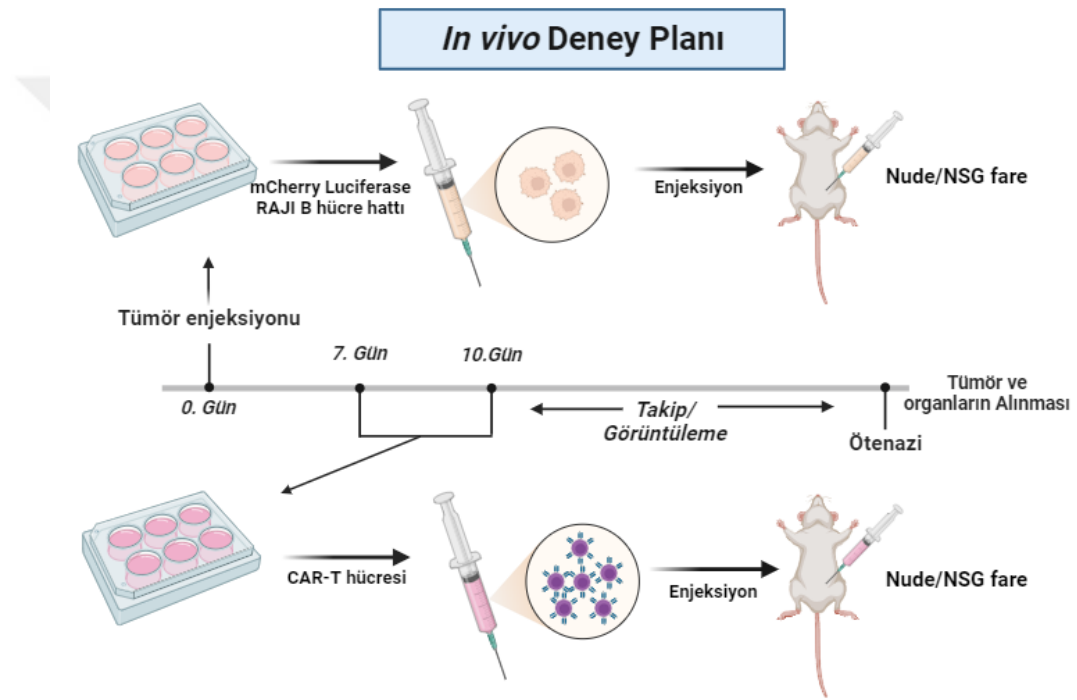
Şekil 16. T hücre alt-popülasyon, yorulma biyobelirteçleri ile Antikor boyama ve anti-kanser etkinlik sonrası kullanılan kanser paneli biyobelirteçleri.

3.4.10. *In Vivo* Metotlar

3.4.10.1. ALL *In Vivo* Fare Modelinde Anti-Tümör Oluşumu

Deney hayvanları çalışmaları 13.11.2019 tarihli Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ACU-HADYEK) kararı ile onaylanmıştır. *In vivo* anti-tümör etkinlik deneyleri, mCherry ve firefly luciferase ateş böceği lusiferaz (fLuciferase) ifade eden lentivirüslerle transdüklenmiş RAJI hücreleri (Burkitt lenfoma) kullanılarak Nude/NSG farelerinde gerçekleştirilmiştir. RAJI hücrelerinin mCherry ifadesi akış sitometrisi ile >%97 mCherry pozitif olduğu doğrulanmıştır.

In vivo kanser hayvan modeli, 4 gruptan oluşmaktadır (Şekil 33). Bir tümör modeli oluşturmak için 500.000 fLuciferase-mCherry pozitif RAJI hücresi, Nude/NSG farelere enjekte edilmiştir. Tümör büyümesi ve gelişimi, D-Luciferin, Potassium Salt (Proven and Published™) 100 mg (Goldbio, LUCK-100, 1mg/mL) enjeksiyonu ile biyoluminesans görüntüleme kullanılarak izlenmiştir. Yayılan tümörlerin biyoluminesans sinyali 2 ay boyunca 7 gün aralıklarla IVIS *in vivo* görüntüleme sistemi (IVIS Spectrum *In Vivo* Imaging System, PerkinElmer) ile ölçülmüştür (Şekil 17). Her ölçüm öncesinde farelere ağırlık tartımı yapılarak kaydedilmiştir.



Şekil 17. *In vivo* enjeksiyon uygulama planı.

3.4.10.2. ALL Fare Modelinde CAR-T Hücre Uygulaması

Tümör varlığı yedinci gün mCherry ifadesi ile gözlemlenmiş olup CAR-T hücre tedavi uygulamasına 7. gün başlanmıştır. Birinci grupta sadece tümör modeli oluşturulup 7. ve 10. günde intraperitoneal Enjeksiyon (IP) olarak serum fizyolojik enjekte edilmiştir. Tedavi gruplarında 2 farklı CAR-T hücre grubu bulunmaktadır. İkinci grupta tümör uygulamasının ardından 7. gün ve 10. gün olarak 2 doz anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilmiş CAR19BB CAR-T enjeksiyonu (fare başına 1×10^6 IP) yapılmıştır.

Üçüncü grupta tümör uygulamasının ardından 7. gün PHA aktive edilmiş CAR19BB CAR-T (fare başına 1×10^6 IP) ve 10. gün CAR19BB PHA (fare başına 1×10^6 IP) enjeksiyonu yapılmıştır. Dördüncü grupta herhangi bir tümör uygulaması yapılmamıştır. Çalışma planı **Şekil 17**'de yer almaktadır. Tümör büyümesi ve gelişimi, D-Luciferin enjeksiyonu ile biyoluminesans ışımaya ile izlenmiştir.

3.4.12. ALL Modeli Farelerde Biyokimyasal Analizler

Bütün fare gruplarından sakrifikasyon sırasında pre-klinik çalışma kapsamında 1 cc kan örneği intraventriküler yolla alınmış olup; tam kan sayımı (hemogram), ALT, AST, BUN, kreatinin, kalsiyum ve albümin değerlerine bakılmıştır. Kan analizleri NP Üsküdar Beyin Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarından hizmet alımı yapılarak analiz edilmiştir. Ayrıca 0,05 cc kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılmış olup aşağıdaki protokol ile gerçekleştirilmiş olup HIV-1 PCR testi ile CAR-T hücre varlığı değerlendirilmiştir.

3.4.13. Genomik DNA İzolasyonu

Ek olarak, innuPREP Blood DNA Mini Kit (Analytik JENA) kullanılarak 0,05 cc kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Adımlar boyunca, gerekli miktarda elüsyon tamponu 60°C 'de inkübe edilmiştir. Her 0,05 cc tam kan örneğine 400 µl Lysis Solution SLS ve 30 µl Proteinaz K eklenmiştir. Örnekler 10 saniye boyunca vortekslenmiş ve 60°C 'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler 700 µl Bağlama Solüsyonu BL eklenmiştir. Örnekler Receiver ve Spin kolonları kullanılarak 11.000 g'de (~ 12.000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından Spin Filtresi üzerine 400 µl Washing Solution C eklenmiştir. Örnekler 11.000 g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından 600 µl Washing Solution BS eklenmiştir. Örnekler 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından, 200 µl Elution Buffer eklenmiş ve numuneler oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. İzole edilen DNA -20°C 'de saklanmıştır. Ek olarak, PureLink® Genomik DNA Kitleri (Invitrogen, K1820-01, K1820-02, K1821-04) kullanılarak hücrelerden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.4.14. HIV-1 Real-Time PCR Testi

CAR-T hücrelerinin varlığı HIV-1 PCR testi kullanılarak değerlendirilmiştir. DIAGNOTECH HIV-1 Real-Time PCR, HIV-1'in kantitatif tespiti için kullanılan bir *in vitro* nükleik asit amplifikasyon testidir. Test kiti, HIV-1 genomunun korunmuş bölgelerini hedefleyen, lentivirüslerde bulunan LTR dizisi de dahil olmak üzere spesifik primerler ve floresan probler içermektedir. Bu probler, gerçek zamanlı floresan PCR tekniği kullanılarak klinik örneklerin genomundaki entegre LTR dizisinin hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlar. *In vivo* hayvan modellerinde terapötik amaçlarla enjekte edilen CAR-T hücrelerinin hayatta kalma kapasitesini değerlendirmek amacıyla, CAR-T hücreleri ile tedavi edilen farelerden kurban sırasında kan örnekleri toplanmış ve genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, floresan boyalar kullanılarak yapılan tek aşamalı bir prosedür olan gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) testi, izole edilen DNA ile yapılmıştır. RT-PCR sırasında floresan yoğunluklarının izlenmesi, biriken ürünün tespit edilmesini ve miktarının belirlenmesini sağlar. Bu izleme, çoğaltılmış ürüne özgü oligonükleotid problara spesifik floresan boyaların bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Bu test, bu çalışmada CAR-T hücrelerinin genomuna entegre olan LTR dizilerini tespit etmek için kullanılmıştır. DIAGNOTECH HIV-1 Real-Time PCR Kiti (Katalog No: DB0107100) üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Kite bulunan 20 µl Multiplex PCR Master Mix, 20 µl Genomik DNA ile karıştırılmış ve striplere dağıtılmıştır. Ardından **Tablo-4**'te belirtilen döngü ve sıcaklıklar kullanılarak Lightcycler 96, ROCHE RT-PCR cihazı ile analiz yapılmıştır.

Tablo 4. HIV-1 Real-Time PCR döngü ve sıcaklık bilgileri.

Adım	Döngüler	Sıcaklık	Süre
Ters Transkripsiyon	1	50°C	30 dakika
İlk Denatürasyon	1	95°C	10 dakika
Amplifikasyon	45	95°C	30 saniye
		55°C*	60 saniye

3.4.15. İstatistiksel Analiz

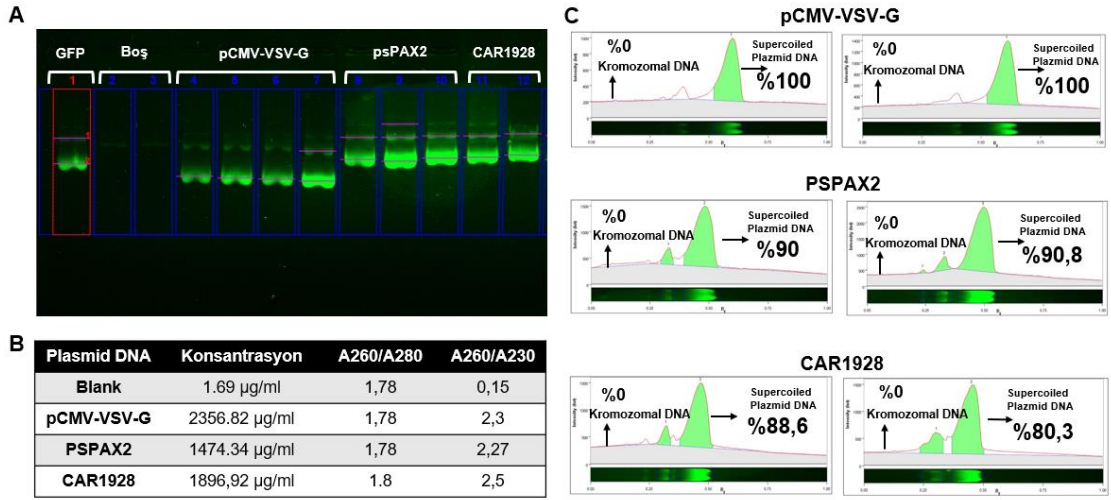
İki kuyruklu Homoscedastic t-testleri SPSS yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel testlerin hiçbirinde aykırı değerler hariç tutulmamıştır ve her bir veri noktası bağımsız bir ölçümü temsil etmektedir. Çubuk grafikler ortalama ve standart sapmayı veya ortalamanın standart sapmasını rapor etmektedir. Tüm testler için anlamlılık eşiği * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ olarak belirlenmiştir. ns: anlamlı değil.



4. BULGULAR

4.1. Virüs Üretimi İçin Gerekli Olan CAR, VSV-G, psPAX2 Plazmidlerinin Transformasyon ve Plazmid DNA İzolasyonu ve Kalite Kontrolleri

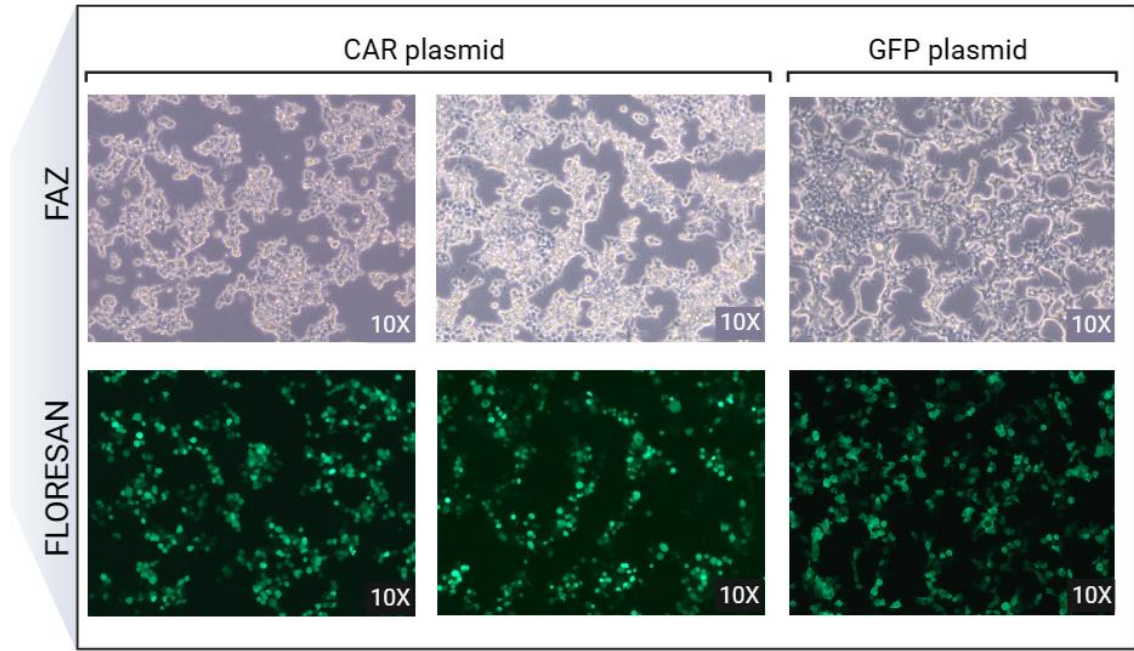
CAR lentivirüsünün üretilmesi için öncelikle CAR kodlayan plazmid DNA, lentiviral partiküllerin üretilmesi için gerekli zarf proteinini sağlayan VSV-G ve 2. nesil lentiviral paketleme plazmid olan psPAX2 plazmid DNA'larının sentezi, üretimi ve kalite kontrol aşamalarının test edilmesi amaçlanmıştır. Genscript'ten sentezletilen ve Addgene'den alınan plazmid DNA vektörleri *E. coli* DH5a bakterilerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriler amfisilinli LB besiyerinde büyütülerek transformasyon işleminin başarılı olduğu kontrol edildikten sonra, bakteri hücrelerinden plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası kalite kontrol analizleri amacıyla agaroz jel elektroforezinde yürütülerek pürifikasyon analizi yapılmıştır (**Şekil 18A**). Plazmid DNA'ların konsantrasyon değerlerinin yanı sıra protein ve RNA kontaminasyon varlığının tespiti için ise Microplate ELISA Reader cihazı ile ölçüm gerçekleştirilerek A260/280 ve A260/230 oranları elde edilmiştir (**Şekil 18B**). Kromozomal DNA kontaminasyonunun yanı sıra transfeksiyon için gerekli olan uygun süpercoiled yapı yüzdesinin de tespiti için Image Lab yazılımı üzerinden analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda ise pCMV-VSV-G, psPAX2 ve CAR1928 kodlayan plazmidlerin %80-100 arasında süpercoiled yapıda olduğu sonucuna varılıp transfeksiyon ve viral üretim için hazır olduğu teyit edilmiştir (**Şekil 18C**).



Şekil 18. CMV-VSV-G, psPAX2 ve CAR1928 plazmidlerinin plazmid DNA izolasyonu işleminden sonra kalite kontrollerinin gerçekleştirilmesi. A) İzole edilen plazmid DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü. B) İzole edilen plazmid DNA'ların konsantrasyon, A260/280 ve A260/230 değerlerini gösteren tablo. C) İzole edilen plazmid DNA'ların süpercoiled ve kromozomal DNA yüzdelерinin analizi.

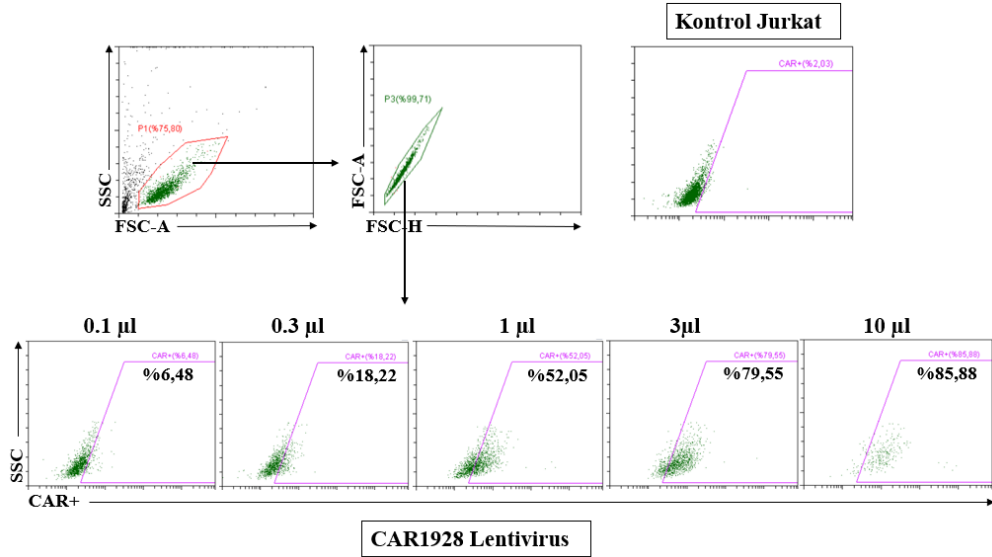
4.2. CAR1928 Lentivirüslerinin Üretilmesi, Titrasyon ve Kalite Kontrol Testleri

CAR-T üretiminde kullanılacak olan GFP floresan etiketli CAR1928 virüsleri, HEK293T hücrelerine transfekte edilerek floresan mikroskop altında incelenmiştir. Kontrol olarak GFP plazmid DNA'sı ile de transfeksiyon yapılarak transfeksiyon protokolünün ve floresan kanalların kontrolü sağlanmıştır. VSV-G ve psPAX2 vektörleri ile ayrı ayrı CAR ve GFP plazmitleri kullanılarak yapılan transfeksiyon sonrası ışımaya **Şekil 19'**de gösterilmiştir. Hücrelerin sağlık ve morfoloji durumunun birbirine benzer olduğu ve GFP'ye benzer şekilde ışımaya olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 19. CAR ve GFP plazmidlerinin HEK293T hücreleriyle yapılan transfeksiyon sonucu 10X faz ve floresan görüntüleri.

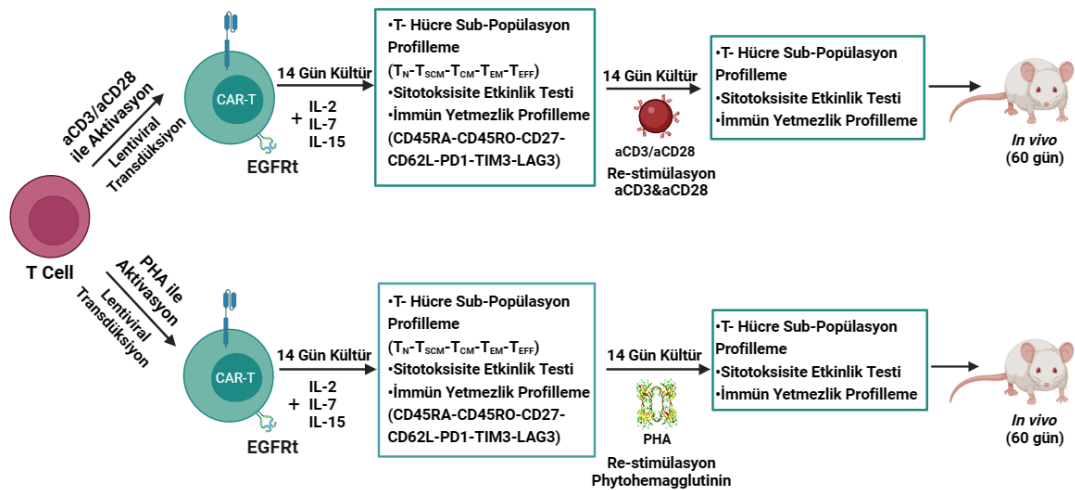
Transfeksiyon sonrası 72. Saatte virüsler toplandıktan sonra Jurkat hücrelerine virüs eklenerek virüs titresinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Virüs eklendikten 72 saat sonra hücrelerden örnek alınıp flow sitometride GFP ekspresyonuna bakılmıştır. 0-10 μ L aralığında azalan konsantrasyonlarda (10 μ L-3 μ L-1 μ L-0.3 μ L-0.1 μ L) virüs miktarları Jurkat hücreleri üzerine transdükte edilerek, CAR ekspresyonu flow sitometri ile değerlendirilmiştir. CAR1928 virüsünün uygulandığı Jurkat hücrelerinde GFP ekspresyonuna bakıldığında, hücrelerin 10 μ L virüs varlığında, virüs transdükte edilmeyen hücelere kıyasla (kontrol grubu) %85 oranında GFP eksprese ettiği saptanmıştır (**Şekil 20**). Dolayısıyla bu sonuçlarla CAR1928 kodlayan virüslerin hücreler üzerinde etkin bir transdüksiyon kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiş ve ileri deneyler için bu virüslerin kullanımı planlanmıştır.



Şekil 20. CAR1928 CAR konstraktyla yapılan titrasyon sonuçları.

4.3. CAR-T Hücre Üretimi, Proliferasyonu, Farklılaşma ve Anti-kanser Kapasitesinin *In Vitro* Değerlendirmesi

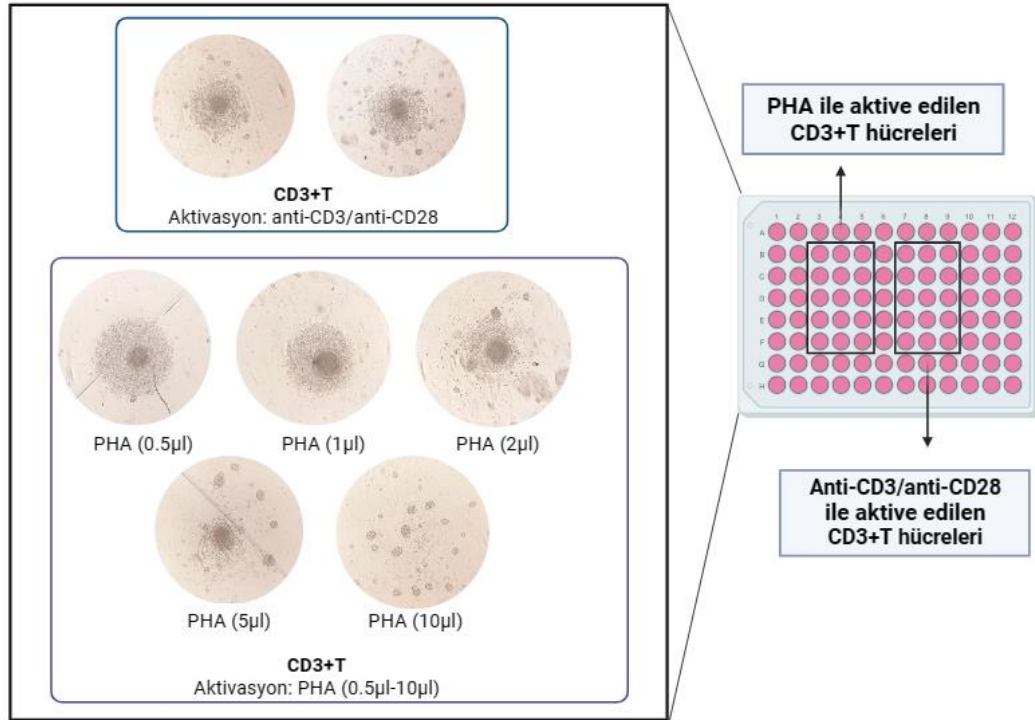
PHA'nın anti-CD3/anti-CD28 mikrobuncuklarına kıyasla TCM ve TSCM popülasyonunu artırıp artırmadığı araştırılmıştır. T hücre aktivasyonu sonrasında PHA ile elde edilen CAR-T hücre üretimi, anti-kanser aktivite ve alt-popülasyon profili belirlenmiştir (Şekil 21). Gözlemlenen TCM-TSCM oranlarına dayanılarak, CD3 izolasyonu ile CAR-T hücre üretim protokolü geliştirmek hedeflenmiştir.



Şekil 21. CAR-T hücreleri içerisinde TCM ve TSCM alt popülasyonunu arttırmak amacıyla, hücreleri aktifleştirme yönteminde (PHA/ anti-CD3&anti-CD28) yapılacak değişikliklerle uzun süreli stabil ve sitotoksik etkin CAR-T hücre üretim planı.

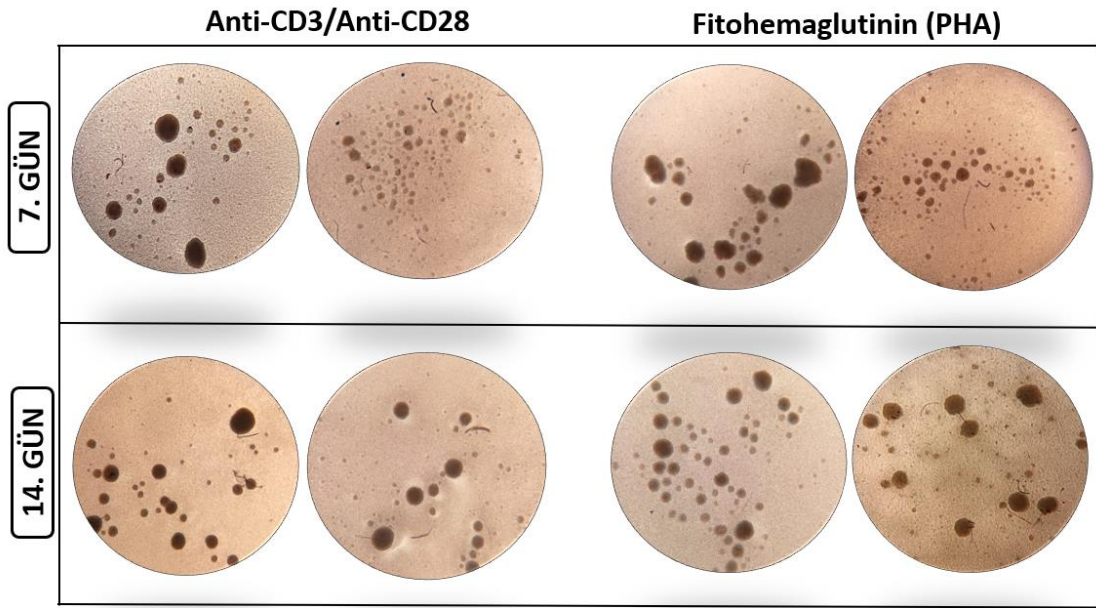
4.3.1. T hücre Aktivasyonu ve CAR-T Hücre Üretimi

In vitro CAR-T Hücre deneylerini gerçekleştirmek için öncelikle T hücrelerinin aktive edilmesi amaçlanmıştır. T hücrelerini aktive etmek için Phytohemagglutinin-M- (PHA-M) (Roche 11082132001, 20 mg) (10µg/mL) veya anti-CD3/anti-CD28 (T hücre Transact™ human) (Miltenyi Biotech, 130-111-160) kullanılmıştır. PHA miktarı değiştirilerek T hücrelerinin aktivasyon oranları anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen T hücreleriyle kıyaslanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda PHA kullanılmış olup, anti-CD3&anti-CD28'e kıyasla inverted mikroskop altında benzer aktivasyon görüldüğü **Şekil 22**'de görülmüştür. Anti-CD3/anti-CD28 veya PHA ile aktive edilmiş CD3+T hücrelerinin 24-48 saat sonra mikroskop altındaki görüntülerinde topaklaşma ve bir araya gelme oranlarından yola çıkarak T hücrelerinin etkin bir şekilde aktifleştigi değerlendirilmiş olup lentivirüsler ile transdüksiyon deneyine geçilmesine karar verilmiştir.



Şekil 22. PHA ve anti-D3/anti-CD28 ile aktive edilen CD3+T hücrelerinin, aktivasyon sonrası 2.günde inverted mikroskop altında çekilen 10X görüntüleri.

Sağlıklı donörden alınan kandan CD3+T izolasyonu yapılmış olup, >99% CD3+ T hücre popülasyonu elde edilmiştir (**Şekil 24A**). Ardından, Anti-CD3/anti-CD28 veya PHA ile aktifleştirilen T hücrelerinin CAR1928 ekspresyonu ile lentiviral transdüksiyon yeteneği test edilmiştir. CAR1928 lentivirüsü ile Vectofusin-1 (10µg/ml) (Miltenyi Biotech, 130-111-163), Protamine Sulfate (40µg/ml) (Sigma Aldrich P3369/10G) ve BX-795 hydrochloride (6µM) (Millipore Sigma, SML0694-5MG) ile T hücre besiyeri ortamında kültüre edilmiştir. CD3+T hücrelerinin aktivasyon ve transdüksiyon deneyinden 7. ve 14.gün sonraki hücre fotoğrafları **Şekil 23**'te yer almaktadır.



Şekil 23. Anti- CD3&Anti-CD28 veya PHA ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin 7. ve 14. gün inverted Mikroskop altındaki 10X hücre Görüntüleri.

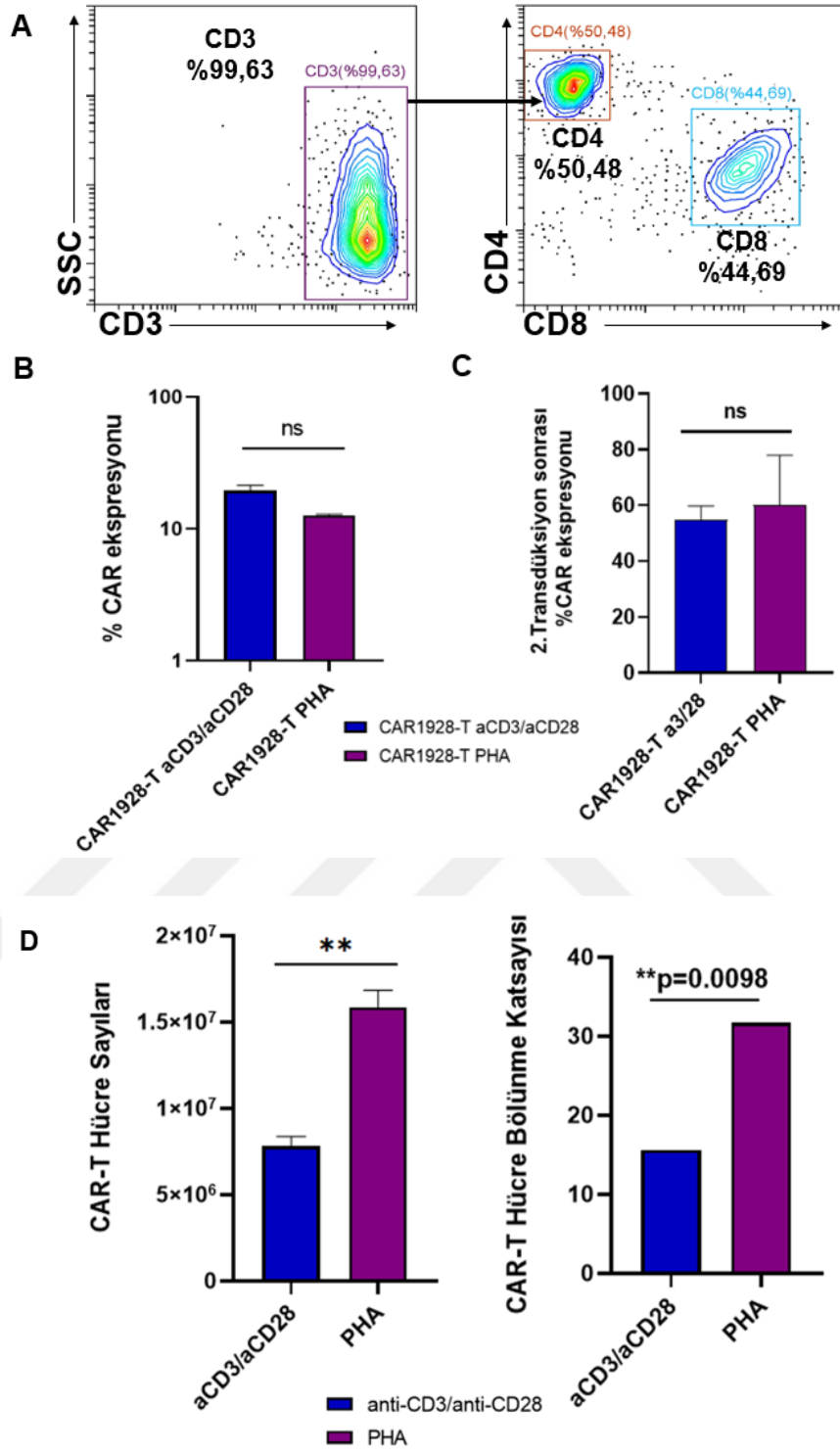
CAR1928 lentivirüsleri ile transdüksiyona uğramış CD3+T hücreleri, Anti-EGFR-A488 (R&D Systems, Minneapolis, MN, ABD, FAB10951G) antikoru ve GFP floresan kullanılarak CAR ekspresyonları analiz edilmiştir. Anti-CD3/anti-CD28 ve PHA ile aktive edilmiş CAR-T hücreleri sırasıyla **%19.53 ±2.0** ve **%12.70 ±0.23** CAR ekspresyon oranlarına sahiptir (**Şekil 24B**). PHA ile indüklenen T hücrelerinin, anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen T hücrelerine kıyasla CAR kodlayan lentivirüsler ile transdüksiyonu çift kuyruklu t-test sonucunda istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir (**Şekil 24B**). Transdüksiyonun ardından 14 gün boyunca IL-2, IL-7, IL-15 içeren ortamda kültüre edilen CAR-T hücreleri aynı aktivasyon reaktifleriyle yeniden aktive edilmiştir. Bunu takiben ikinci lentiviral transdüksiyon sonrası CAR ekspresyonunun artırılıp artırılamayacağı sorulmuştur.

Belirli bir enfeksiyon ortamındaki virüs parçacıklarının sayısının konakçı hücrelerin sayısına oranını temsil eden enfeksiyonun çokluğu (The multiplicity of infection) veya kısa ismiyle MOI oranları birinci transdüksiyonda 2-3 MOI olarak kullanılmıştır.

İkinci transdüksiyon sürecinde ise hücrelerde %20'den fazla CAR ekspresyonu sağlamak amacıyla MOI oranı 2-3MOI'den 5-10 MOI'ye kadar çıkarılmıştır. PHA ve anti-CD3/anti-CD28 reaktifleri kullanılarak ikinci aktivasyon ve hücreleri çoğaltma deneyleri 14. günde gerçekleştirilmiştir. PHA ve anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen CD3+T hücreleri, PHA ve anti-D3/anti-CD28 ile yeniden aktive edilip ikinci transdüksiyon, reaktivasyon sonraki (15.gün) 24 saat içinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışma ile, 5-10 MOI'lik CAR lentivirüsü kullanımının ikinci transdüksiyon ile CAR ekspresyonunun artırılıp artırılamayacağı test edilmiştir.

T hücrelerindeki CAR ekspresyonları değerlendirildiğinde, PHA ile aktive edilen T hücrelerinin 60 ± 17.7 , anti-CD3/anti-C28 ile aktive edilen T hücrelerinin ise 54.78 ± 5.03 CAR ekspresyonuna sahip olduğu görülmüştür (**Şekil 24C**). Her iki T hücre restimülasyon yaklaşımının da 2. transdüksiyon ile CAR ekspresyonunu yükseltebildiği gösterilmiştir. Bu durum, ikinci aktivasyon sonrasında lentiviral transdüksiyon ile CAR-T hücre üretiminde fark olmadığını düşündürmektedir. Dolayısıyla, PHA ile yeniden aktive edildiğinde, CAR-T hücre ekspresyonunun anti-CD3/anti-C28 ile aktive edilen T hücrelere kıyasla önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir (**Şekil 24C**).

Ardından, PHA ve anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen ve başlangıç hücre popülasyonu eşit olan CAR-T hücre popülasyonlarının kültür ortamında sayıca miktarlarına bakılarak proliferasyon kapasiteleri hesaplanmıştır. **Şekil 24D**'de gösterildiği gibi, hücrelerin PHA ile uyarılması durumunda CAR-T hücre proliferasyon kapasitesinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (*p = 0.0098). Bu durum, PHA ile reaktive edildiğinde CAR-T hücre ekspresyonunun anti-CD3/anti-C28 ile aktive edilen T hücrelere kıyasla anlamlı bir şekilde arttığını göstermektedir (* p = 0.0098, **Şekil 24D**).

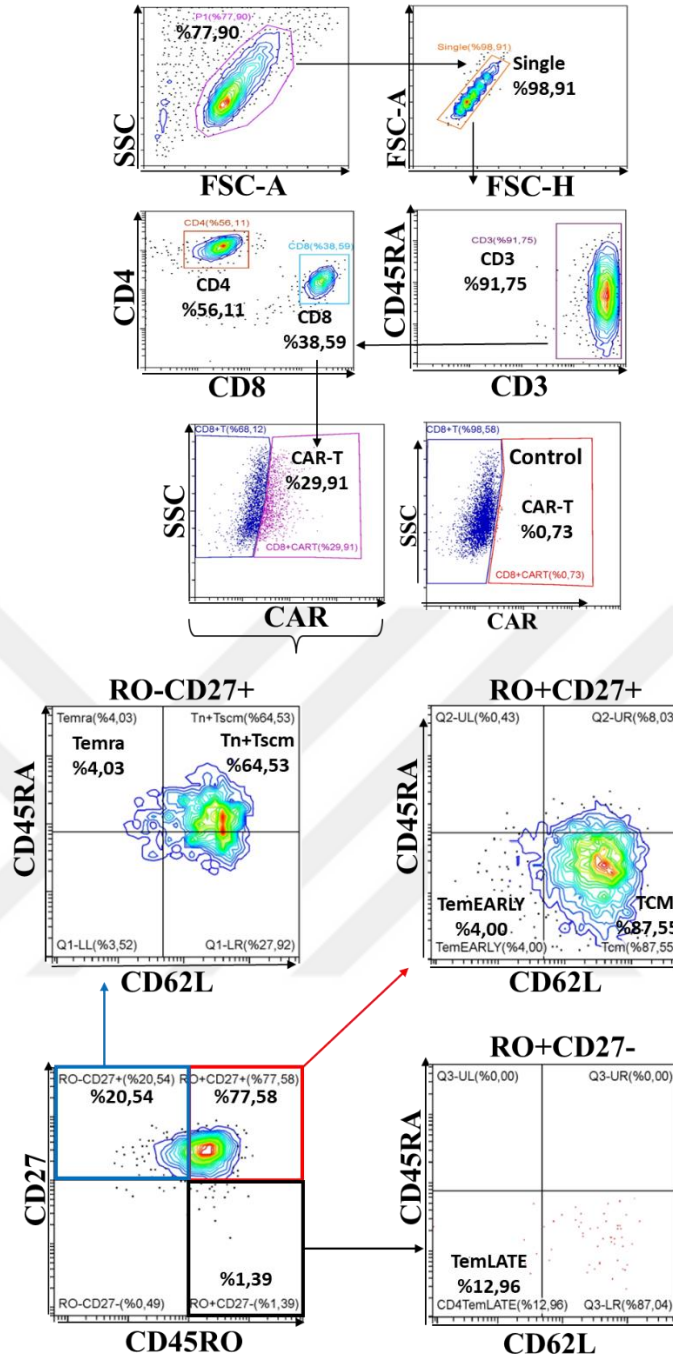


Şekil 24. CD28 tabanlı CAR yapısına sahip CAR1928-T hücrelerinin aktivasyon sonrasındaki analizleri. A) Sağlıklı donörden elde edilen CD3⁺T hücre izolasyonunun akış sitometri grafiği. B) EGFRt/GFP ekspresyonuyla birlikte PHA veya anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edildikten sonra CAR1928 yapısına sahip CAR⁺T hücre ekspresyonunu gösteren çubuk grafik. C) PHA veya anti-CD3/anti-CD28 ile ikinci kez aktive edilip 2. transdüksiyon sonrasında CAR1928 yapısına sahip CAR⁺T hücre ekspresyonunu gösteren çubuk grafik. D) PHA veya anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilip, 14 gün boyunca çoğalma

sürecindeki CAR ifade eden toplam T hücrelerinin sayısını ve bölünme sayılarını gösteren çubuk grafik. İki yönlü t-test istatistiksel anlamlılık, * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak temsil edilmiş olup ns: non-significant/anlamli fark yoktur. Grafikteki çubuklar grupların ortalama değeri ve standart sapmasını temsil etmektedir.

4.3.2. Aktive Edilmiş T Hücresinin İmmün Profil Oluşturan Alt Popülasyonları (TN-TCM-TEM-TEF)

Aktive edilen T hücreleri, TSCM, TCM, TEM, TEFF gibi efektör ve/veya bellek T hücrelerinin alt tiplerini geliştirmek üzere farklılaşmaktadır. PHA veya anti-CD3/anti-CD28 gibi farklı uyarı reaktifleri ile aktivasyon sonrasında T hücre alt popülasyon oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Aktive edilen T hücrelerini immün profillendirmek için, TCM-TSCM alt popülasyonlarının immün belirteçleri, **Tn + Tscm** (CD3+, CD45RA+, CD62L+), **Tcm** (CD3+, CD45RA-, CD62L+), **TemEarly** (CD3+, CD45RO+, CD27+, CD45RA-, CD62L-) T hücreleri, **TemLate** (CD3+, CD45RO+, CD27-, CD45RA-, CD62L-) ve **Temra** (CD3+, CD45RA+, CD62L-) kullanılarak belirlenmiştir (Alvarez-Fernández vd., 2016; Ammirati vd., 2012; Larbi & Fulop, 2014; Tuluc vd., 2017) (**Şekil 25**).



Şekil 25. Flow sitometri grafikleri, TN + TSCM (CD3+, CD45RA+, CD62L+), TCM (CD3+, CD45RA-, CD62L+), TemEarly (CD3+) dahil olmak üzere CD4+ ve CD8+'daki sağlıklı yetişkin bir donörden alınan T hücre alt popülasyonlarını (TN + TSCM, TCM, TEMEarly, TEMLate, TEMRA) göstermektedir. İki kuyruklu t testi istatistiksel analizi yapılmıştır. **Kısaltmalar:** TemEarly: Erken Efektör Bellek T Hücreleri; TCM: merkezi bellek T hücreleri; Tn + TSCM: Naif T Hücreler Ve Kök Hücre Benzeri Bellek T Hücreleri; Temra: Terminal Olarak Farklılaşmış Efektör Bellek T Hücreleri; TemLATE: Geç Efektör Bellek T Hücreleri.

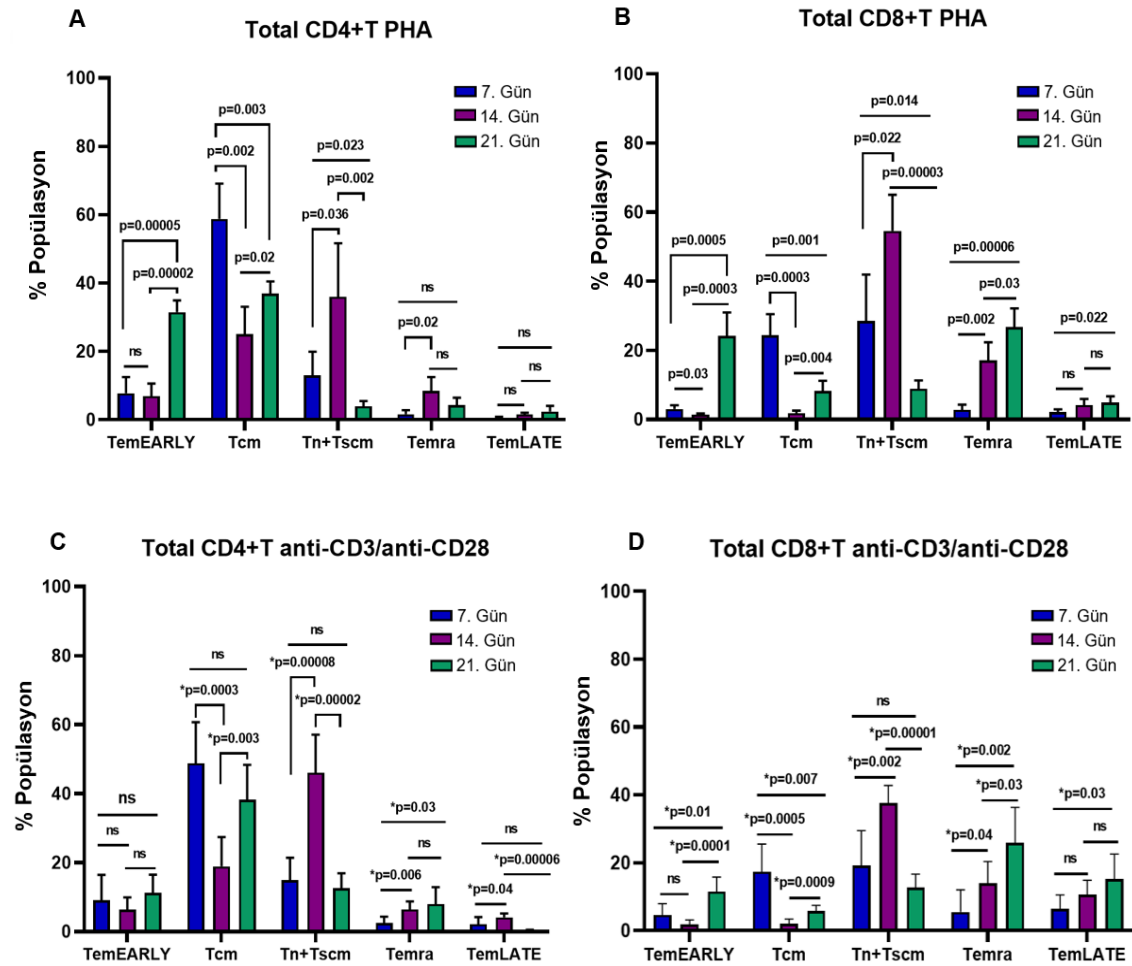
PHA ile aktifleştirilen CD3+T hücreleri içerisindeki toplam **CD4+T** hücrelerinin içinde TN+TSCM, TCM, TemEARLY, TemLATE ve TEMRA alt popülasyonları arasında, **TN+TSCM** oranı 14. güne kadar artış göstermektedir ($p = 0,036$, **Şekil 26A**). Ancak 14. günde **TN + TSCM** oranı istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmakla beraber, ikinci aktivasyondan sonra, 21. günde **TN + TSCM** oranı önemli ölçüde azalmıştır ($p = 0,002$, **Şekil 26A**). **TCM** popülasyon oranı 7. Günden 14. güne doğru anlamlı oranda azalırken, ikinci aktivasyondan sonra, 21. günde istatistiksel olarak artış göstermiştir. 7. gün ve 14. gün ile karşılaştırıldığında **TemEARLY** oranında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Özellikle yeniden aktivasyon ile birlikte 21.günde anlamlı ölçüde artış göstermektedir. ($p = 0,0005$ ve $p = 0,0002$, **Şekil 26A**). **TEMRA** oranı 14. güne kadar hafif artarken ($p = 0,02$), 21. günde düşmektedir (ns, **Şekil 26A**). **TEMLate** hücre popülasyonlarında ise 7.,14. ve 21.günler arasında anlamlı fark gözlemlenmemiştir (ns, **Şekil 26A**).

PHA ile aktive edilen CD3+T hücreleri arasındaki **CD8+T** hücrelerinde, **TN+TSCM** oranı aktivasyondan sonraki ilk 14 günde artış göstermiştir ($p = 0,022$). 21.günde ise **TN+TSCM** oranı anlamlı ölçüde düşüş göstermiştir. **TCM** oranı ise 7. güne kıyasla 14. günde anlamlı derecede azalış göstermiştir ($p = 0,0003$, **Şekil 26B**).**TemEARLY** hücre popülasyonu yeniden etkinleştirmeden sonra, 21.günde anlamlı ölçüde artış göstermiştir ($p = 0,0005$ ve $p = 0,0003$, **Şekil 26B**). **TemLATE** hücre popülasyonu ayrıca 7. güne kıyasla 21. günde artış göstermiştir ($p = 0,022$, **Şekil 26B**). 14. güne kadar **Temra** hücre popülasyonunda artış gözlemlenmiştir ($p = 0,002$, **Şekil 26B**). **Temra**'nın yeniden aktivasyon (reaktivasyon) oranında da istatistiksel olarak bir artış gözlemlenmiştir ($p = 0,03$, **Şekil 26B**). Sonuç olarak, yeniden aktivasyondan sonra PHA ile aktive edilmiş tükenmiş/yorulmuş toplam CD3+T hücrelerinin arttığı görülmektedir.

Anti-CD3/anti-CD28 ile aktifleştirilmiş CD3+ T hücrelerindeki toplam **CD4+T** hücresi popülasyonunu belirlemek için **TN + TSCM** oranı, ilk aktivasyondan sonraki 14. günde 7. güne kıyasla artmasına rağmen ($p = 0,00008$), yeniden aktivasyondan sonra, 21. günde azalmıştır ($p = 0,00002$, **Şekil 26C**). **TCM** oranı, 7. güne kıyasla 14. günde azalmıştır ($p = 0,0003$, **Şekil 26C**), 21. Günde ise 14. güne göre artış gözlemlenmiştir ($p = 0,003$, **Şekil 26C**).

TemLATE oranı 7. günden 14. güne artarken ($p = 0,04$), yeniden aktivasyondan sonra 21. günde azalmıştır ($p = 0,00006$, **Şekil 26C**). **Temra** oranı da 7. güne kıyasla 14. ve 21. günde artış göstermiştir ($p = 0,006$ ve $p = 0,03$, **Şekil 26C**).

Anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen CD3+T hücrelerindeki toplam **CD8+T** hücrelerinin alt popülasyonlarının oranını değerlendirmek için **TN + TSCM** oranı, 7. güne kıyasla 14. günde artış gözlemlenmekle birlikte ($p = 0,002$, **Şekil 26D**), 21. günde bu oranın azaldığı görülmüştür ($p = 0,00001$, **Şekil 26D**). **TCM** oranı 7. güne kıyasla 14. ve 21. günde azalış göstermiştir (**Şekil 26D**). **TemLATE** ve **Temra** oranları ise 7. güne kıyasla 14. ve 21. günde artış göstermiştir ($p = 0,0005$ ve $p = 0,0009$, **Şekil 26D**).



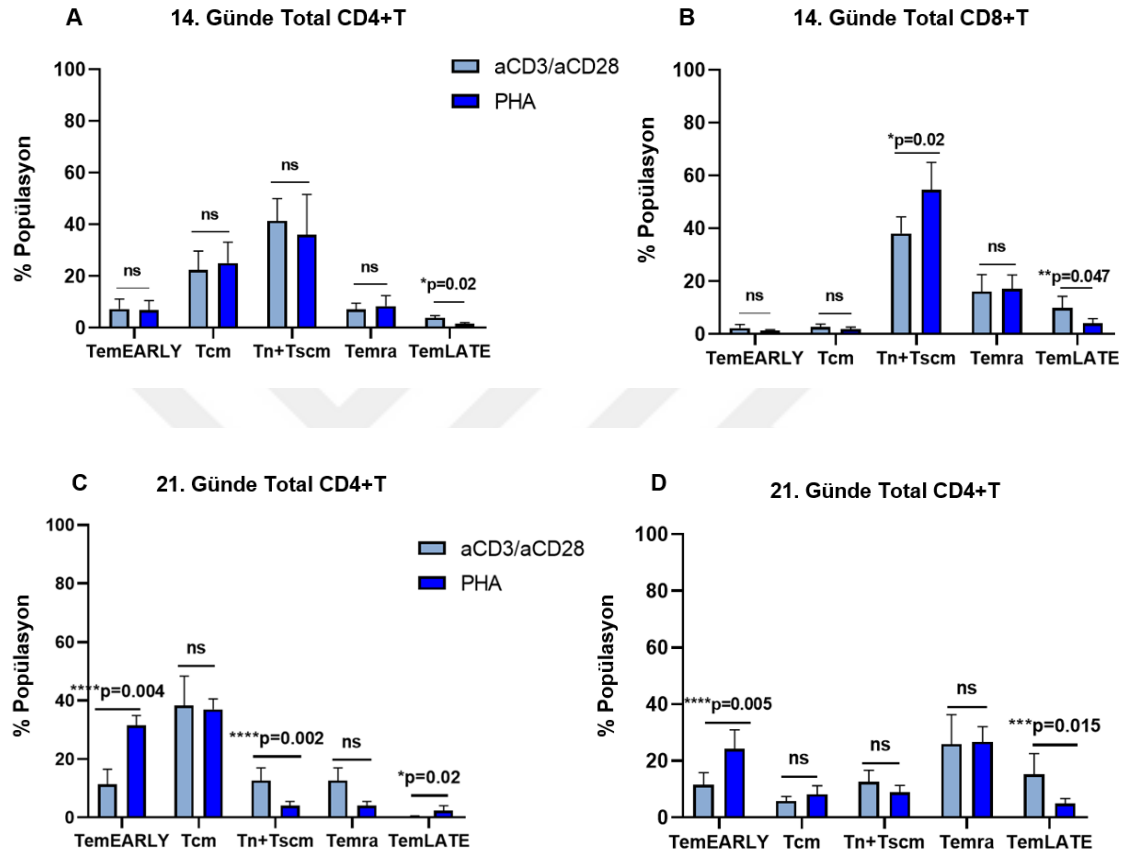
Şekil 26. PHA veya anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CD3+ T hücrelerindeki alt popülasyon dağılımı. Toplam CD4+ veya CD8+ T hücrelerinin Tn + TSCM, TCM, TemEARLY, TemLATE ve Temra alt-popülasyonlarının 7. gün, 14. gün ve 21. gündeki kantitatif dağılımını göstermektedir. (A) PHA ile aktive edilen CD3+ T hücrelerindeki toplam CD4+ T hücrelerinin dağılımı, (B) PHA ile aktive edilen CD3+ T hücrelerindeki toplam CD8+ T hücrelerinin dağılımı,

(C) anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CD3+ T hücrelerindeki toplam CD4+ T hücrelerinin dağılımı ve (D) anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CD3+ T hücrelerindeki toplam CD8+ T hücrelerinin dağılımı. İki yönlü t-test istatistiksel anlamlılık * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ ve ns: anlamlı değil olarak temsil edilmiştir ve grafikteki çubuklar ilgili grupların ortalama değeri $\pm$ standart sapmasıdır. **Kısaltmalar:** TemEarly: Erken Efektör Bellek T Hücreleri; TCM: merkezi bellek T hücreleri; Tn + TSCM: Naif T Hücreler Ve Kök Hücre Benzeri Bellek T Hücreleri; Temra: Terminal Olarak Farklılaşmış Efektör Bellek T Hücreleri; TemLATE: Geç Efektör Bellek T Hücreleri

PHA ve Anti-CD3/anti-CD28 ile aktifleştirilen CD4+ ve CD8+ hücrelerin 7., 14, ve 21.gün analizlerinden sonra üç sağlıklı donörden izole edilen CD3+ T hücre popülasyonundaki PHA ve anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilmiş toplam CD4+ T hücreleri ve CD8+ T hücreleri karşılaştırılmıştır. Toplam CD4+T hücrelerinde TemLATE dışında, **TN+TSCM**, **TCM**, **TemEARLY** ve **Temra**'da istatistiksel bir fark gözlemlenmemiştir (**Şekil 27A**). Tek fark, TemLATE hücre popülasyonunda PHA ile aktivasyon sonrasında azalma olarak belirlenmiştir ($p = 0.002$, **Şekil 27A**). Toplam CD8+T hücrelerinde PHA ve anti-CD3/anti-CD28 aktivasyonunun etkisi karşılaştırıldığında, **TN + TSCM** oranı önemli ölçüde artarken ($p = 0.02$, **Şekil 27B**), **TemLATE** hücre popülasyonunda PHA ile aktive edilen toplam CD8+ T hücrelerinde azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgular, PHA ile aktive edilen hücrelerin anti-CD3/anti-CD28 aktivasyonuna kıyasla erken bellek hücrelerine daha çok farklılaştığını göstermektedir.

Bir sonraki amaç, 21. günde PHA ve anti-CD3/anti-CD28 ile yeniden aktive edilen CD4+T ve CD8+T hücresi alt tiplerinin dağılımındaki değişikliği incelemektir. Hücreler aktive edildiğinde, toplam CD4+T hücrelerinde, **TN+TSCM** popülasyonunun önemli ölçüde azaldığı görülmüştür ($p = 0,002$, **Şekil 27C**). PHA ile aktifleştirilen **TemEARLY** ve **TemLATE popülasyonları**, **TCM** popülasyonunda herhangi bir değişiklik olmamasına rağmen daha yüksektir (**Şekil 27C**). **Temra**'da tükenme/yorulma belirteçlerinin düzeyi belirlendiğinde, PHA'nın indüklediği hücrelerde anti-CD3/anti-CD28 hücrelerine kıyasla istatistiksel bir fark gözlemlenmemiştir (**Şekil 27C**). PHA ile aktifleştirilen toplam CD8+T hücrelerindeki **TN + TSCM** ve **TCM** hücrelerinin oranı da anti-CD3/anti-CD28 ile aktive hücrelerden önemli ölçüde farklı olmadığı görülmüştür (**Şekil 27D**). Ancak PHA ile aktifleştirilen popülasyonda **TemEARLY** düzeyinin arttığı tespit edilmiştir ($p = 0,005$, **Şekil 27D**).

Ayrıca, **Şekil 27D'**de gösterildiği gibi, anti-CD3/anti-CD28 ile aktive olan gruplarda TemLATE oranı anlamlı derecede daha yüksekti ($p = 0,015$). Bu veriler, yeniden aktiveleştirilen T hücrelerinde PHA reaktifinin, erken bellek fenotiplerini desteklediğini göstermektedir.

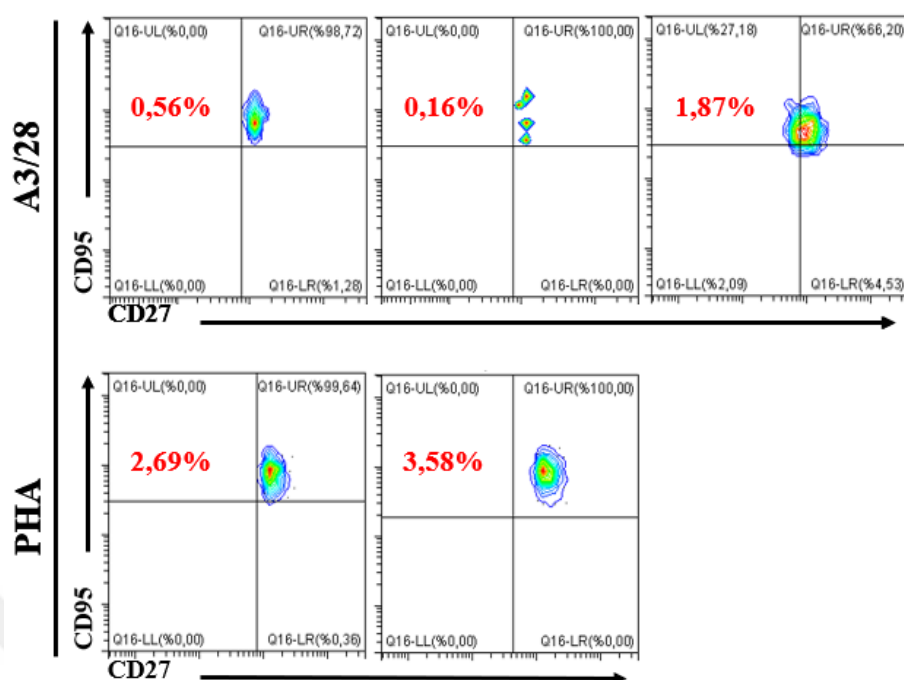


Şekil 27. Anti-CD3&anti-CD28 veya PHA ile aktive edilen toplam CD4 + T ve CD8 + T hücrelerinin alt popülasyon çubuk grafiği. 14-21. günde Tn + TSCM, TCM, TemEARLY, TemLATE ve Temra alt popülasyonlarının karşılaştırılmasını göstermektedir. **(A)** Toplam CD4+ T hücrelerinin Tn + TSCM, TCM, TemEARLY, TemLATE ve Temra alt-popülasyonlarının karşılaştırmasını gösteren bar grafikleri ve **(B)** Toplam CD8+ T hücrelerinin Tn + TSCM, TCM, TemEARLY, TemLATE ve Temra alt-popülasyonlarının karşılaştırmasını gösteren bar grafikleri, anti-CD3&anti-CD28 veya PHA ile aktive edilmiştir ve 14.günde değerlendirilmiştir. **(C)** Toplam CD4+ T hücrelerinin Tn + TSCM, TCM, TemEARLY, TemLATE ve Temra alt-popülasyonlarının dağılımını gösteren bar grafikleri ve **(D)** Toplam CD8+ T hücrelerinin Tn + TSCM, TCM, TemEARLY, TemLATE ve Temra alt-popülasyonlarının dağılımını gösteren bar grafikleri, anti-CD3&anti-CD28 veya PHA ile aktive edilmiştir ve 21.günde değerlendirilmiştir. İki yönlü t-test istatistiksel anlamlılık * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ ve ns: anlamlı değil olarak temsil edilmiştir ve grafikteki çubuklar ilgili grupların ortalama değeri $\pm$ standart sapmasıdır.

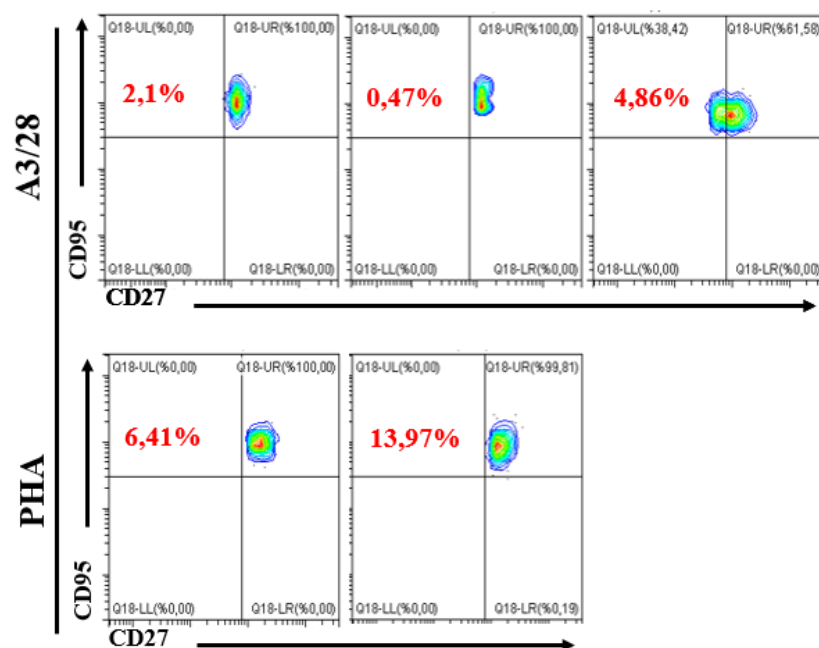
PHA veya anti-CD3& anti-CD28 ile aktiveştirilen CAR-T hücrelerdeki TN+TSCM popülasyonundan CD95 yüzey belirteci pozitif olan TSCM hücreleri tespit edilmiştir. CD95 (Fas) Antikoru (Biolegend, 305622, PE/Cyanine7 anti-human CD95 (Fas) Antibody) ile PHA veya anti-CD3& anti-CD28 ile aktiveştirilen CAR1928-T hücreleri boyanarak TSCM sub-popülasyon miktarları belirlenmiştir. PHA ile aktiveştirilen CAR-T hücrelerinin 14 günlük kültürü sonucu TSCM sub-popülasyon oranının total sitotoksik CD8+T hücrelerinde anti-CD3&anti-CD28 ile aktiveştirilerek büyütülen CAR-T hücrelerine kıyasla anlamlı bir oranda arttığı g r lm ştir (**şekil 28A ve 28B**). CAR1928-T hücrelerindeki CD4+CAR+TSCM ve CD8+CRCA+TSCM oranlarına bakıldığında CD8+CAR+TSCM popülasyonun biraz daha fazla olduğu g r lm ştir. Sonuçlar, PHA ile aktiveştirilmenin CAR-T kültürü sırasında CAR yapısından bağımsız bir şekilde CD8+T hücrelerindeki TSCM oranlarını arttırdığını göstermektedir.

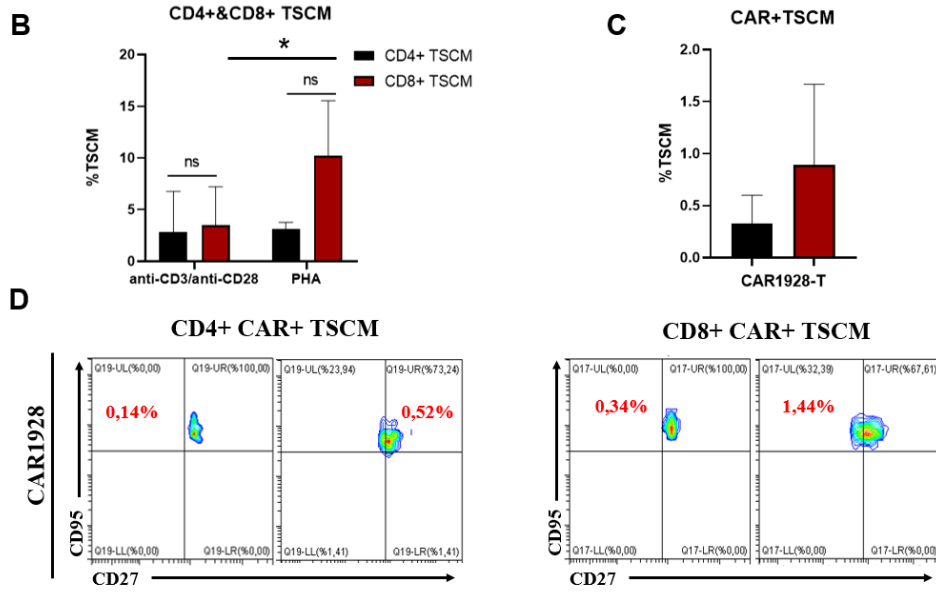
A

CD4 + TSCM



CD8 + TSCM

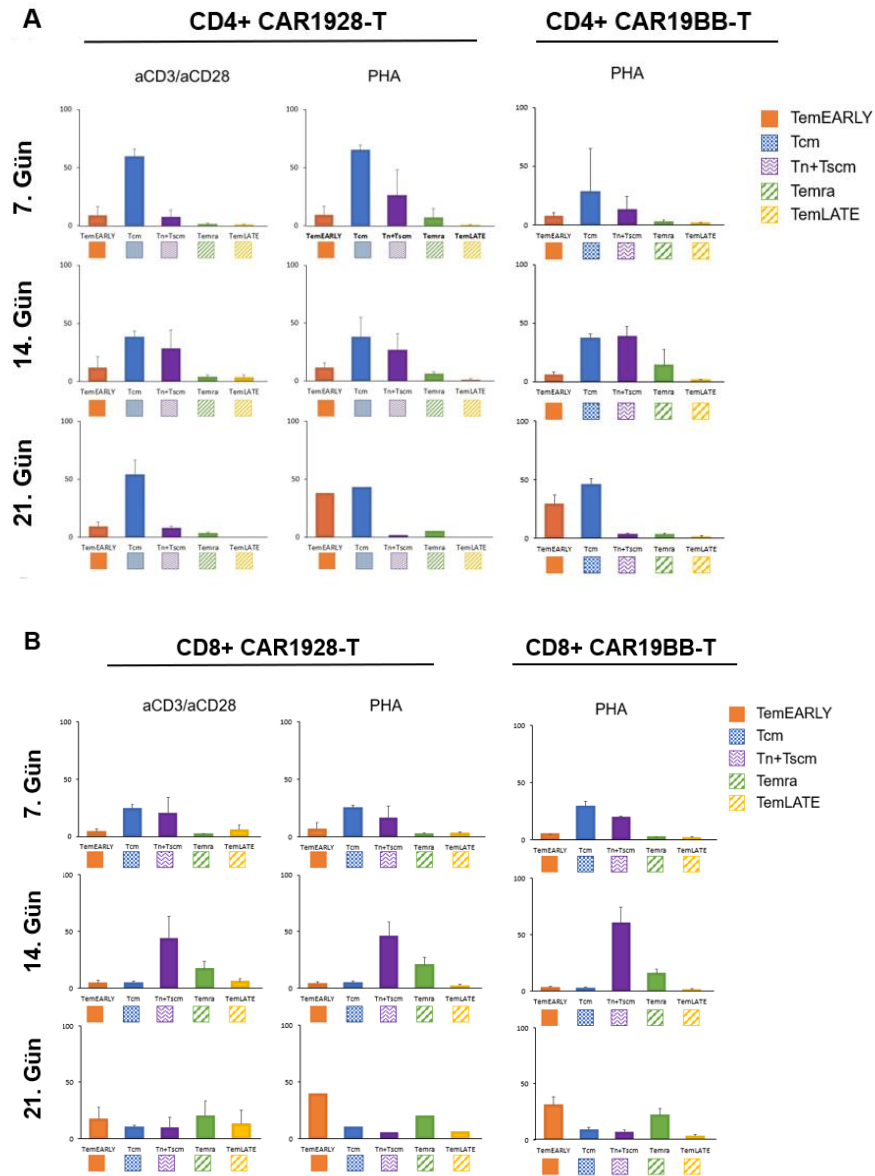




Şekil 28. PHA veya anti-CD3& anti-CD28 ile aktifleştirilen CAR-T hücrelerde TSCM dağılımı. (A) Akış sitometri görüntüleri PHA veya anti-CD3& anti-CD28 ile aktifleştirilerek 14 gün boyunca kültüre edilen CAR-T hücre popülasyonu içerisinde bulunan total CD4+ ve CD8+ T hücreleri içerisindeki TSCM sub-popülasyonlarını göstermektedir. TSCM popülasyonlarını belirlemek için CD3+ CD4/8+ CAR-CD45RA+ CD62L+ CD45RO- CD27+ CD95+ biyobelirteçleri analiz edilmiştir. (B-D) Çubuk grafiği PHA veya anti-CD3& anti-CD28 ile kültüre edilen T hücre popülasyonları içerisindeki TSCM dağılımını ve CAR1928-T hücreleri içerisindeki CD4+CAR+ ve CD8+CAR+ TSCM hücrelerini vermektedir. Çubuk grafiği anti-CD3& anti-CD28 ile kültüre edilen CAR1928-T hücre popülasyonları içerisindeki TSCM dağılımını verir. Tek taraflı t-test istatistiksel önem, * $p < 0.05$ ile temsil edilmiştir. ns= ns: anlamlı değil olarak belirlenmiştir.

Sonraki adımda, PHA ile aktive CAR-T hücrelerindeki T hücre diferansiyasyonu ve alt tipleri değerlendirmesi amaçlanmıştır. Bunun için PHA ve anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen CAR1928-T gen konstraktı ile birlikte hafıza fenotipi gösteren 41BB kostimülatör domaini kullanılmıştır. CD28 ve 41BB kostimülasyon alanı içeren CAR yapısını ifade eden CD4+ ve CD8+ T hücreleri alt tip frekanslarını belirlenmiştir. PHA'in etkisinin kostimülasyon alanından bağımsız bir farklılaşma ajanı olduğunu kanıtlamak için başka bir gen konstraktında daha deneyerek sonuçlar incelenmiştir. 7. ve 14. günde, PHA ve anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin alt tip popülasyonlarında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (**Şekil 29A**). 41BB gen konstraktına sahip CAR19BB-T hücreleri PHA ile aktive edilerek hücrelerin alt-popülasyonları incelenmiştir. PHA ile aktive edilen CAR19BB-T hücrelerinde TemEARLY frekansının anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir ($p = 0.003$, **Şekil 29A**).

Ancak, Tn + Tscm populasyon seviyesi PHA ile aktive edilen CAR19BB T hücrelerinde anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen hücrelere kıyasla azalmıştı ($p = 0.04$, **Şekil 29A**). Bu bulgular, ilk aktivasyon ve genişleme sürecinde CAR konstrakt ekspresyonunun T hücre diferansiyasyonu üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ek olarak, CD8+CAR-T hücreleri için benzer sonuçlar bulunmuştur ($p = 0.01$, **Şekil 29B**). Bu bulgular, PHA uyarımının, öncü diferansiyasyon ajanı olduğunu göstermektedir.



Şekil 29. CAR(CD28) veya CAR(4-1BB) ifade eden T hücresi alt popülasyonları. (A) CD4+ veya (B) CD8+ T hücre popülasyonunda ilk ve ikinci aktivasyonlardan sonra CAR(CD28) veya CAR(4-1BB) ifade eden T hücre alt-popülasyonlarının yüzdelik dağılımını gösteren bar grafikleri, gün 7, 14 ve 21'de değerlendirilmiştir.

İki yönlü t-test istatistiksel anlamlılık, grafikteki çubuklar ilgili grupların ortalama değeri $\pm$ standart sapmasıdır. Kısaltmalar: TemEarly (Turuncu): Erken Efektör Bellek T Hücreleri; TCM (mavi): Merkezi bellek T hücreleri; Tn + TSCM (Mor): Naif T Hücreler Ve Kök Hücre Benzeri Bellek T Hücreleri; Temra (Yeşil): Terminal Olarak Farklılaşmış Efektör Bellek T Hücreleri; TemLATE (Sarı): Geç Efektör Bellek T Hücreleri.

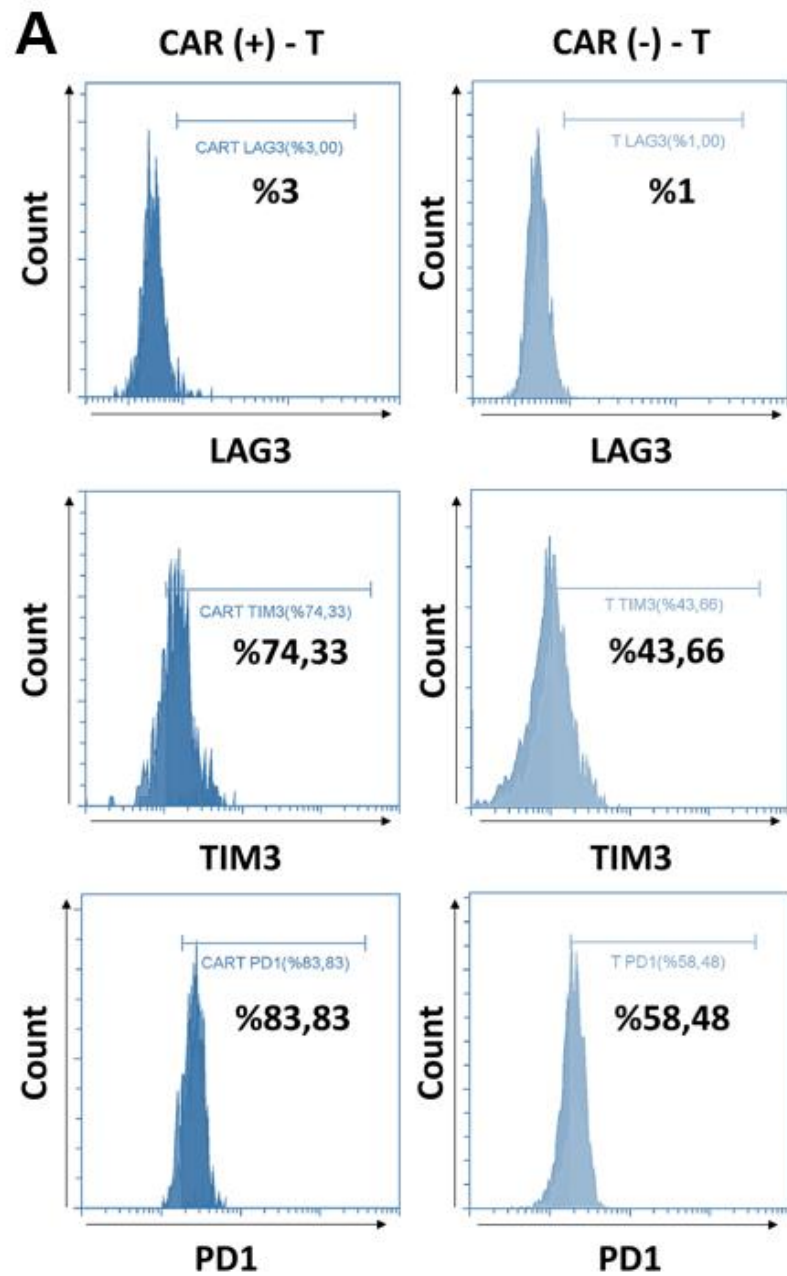
T hücresi alt popülasyonlarının PHA ve anti-CD3/anti-CD28 üzerine karakterizasyonundan sonra, hücre popülasyonları üzerindeki tükenme/yorulma (exhaustion) biyobelirteç ifadesi değerlendirilmiştir. CAR1928-T hücreleri için CD3+ CD4+ veya CD3+ CD8+ EGFRt+ hücreleri seçildikten sonra TIM3, PD1 ve LAG3 biyobelirteçlerinin yukarı regülasyonları analiz edilmiştir. 14. gün ve 21. günde, akış sitometri analizi yapılarak, aynı örnek hücre popülasyonlarında CAR-T hücrelerinde ve transdükte edilmemiş T hücresi kontrolünde TIM3, PD1 ve LAG3 ekspresyonu değerlendirilmiştir (**Şekil 30A**). 14. günde, anti-CD3/anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+T hücreleri arasında CD4+ CAR1928-T hücreleri için LAG3, TIM3 ve PD1 MFI değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (**Şekil 30B**). 14. günde, anti-CD3/anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+ T hücreleri arasında CD8+ CAR1928-T hücrelerinin LAG3, TIM3 ve PD1 MFI değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (**Şekil 30C**).

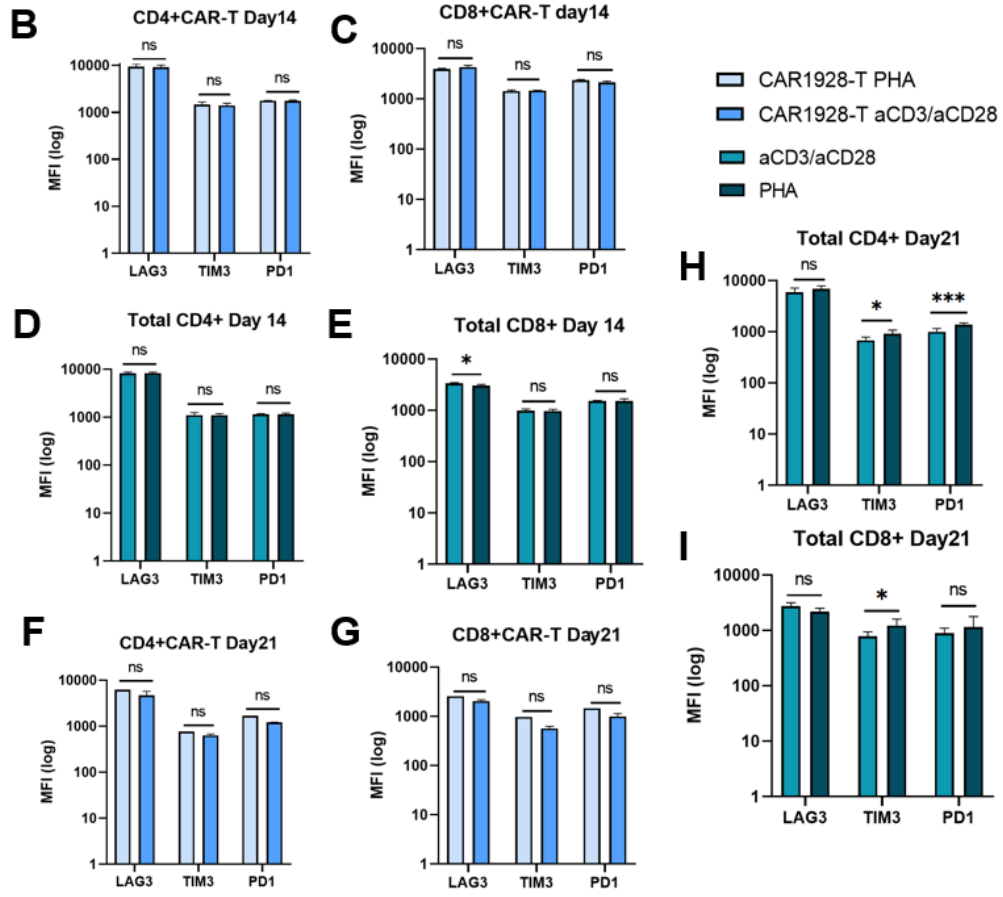
LAG3, TIM3 ve PD1 MFI değerleri, anti-CD3/anti-CD28 veya PHA ile aktive edilen CD3+T hücreleri arasında toplam CD4+T hücrelerinin karşılaştırılmasında benzer bir artış gözlenmiştir. Bu nedenle PHA ile anti-CD3/anti-CD28 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (**Şekil 30D**). Anti-CD3/anti-CD28 veya PHA ile aktive edilen CD3+T hücreleri arasında toplam CD8+T hücrelerinin karşılaştırılmasında LAG3, TIM3 ve PD1 MFI değerleri, anti-CD3/anti-CD28'e kıyasla PHA ile aktivasyonda LAG3 değerinin azaldığı gözlenmiştir ancak iki aktivasyon arasında büyük bir fark yoktur (*p = 0,02, **Şekil 30E**). Anti-CD3/anti-CD28 veya PHA ile aktive edilmiş CD4+ veya CD8+ CAR-T hücrelerinde ikinci aktivasyon ve kültür sonrası 7.gün, ilk aktivasyondan sonra 21.günde, CAR1928-T hücrelerinde tükenme biyobelirteçleri LAG3, TIM3 ve PD1 arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz bir farkla sonuçlandı (**Şekil 30F, G**).

Toplam CD4+T hücrelerinde anti-CD3/anti-CD28 veya PHA reaktivasyonları değerlendirildiğinde, PHA reaktivitesinden sonra TIM3 (*p = 0,04) ve PD1 (*p = 0,012) oranlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi (**Şekil 30H**).

Toplam CD8+T hücrelerinde anti-CD3/anti-CD28 ve PHA reaktivasyonları değerlendirildiğinde, PHA reaktifleri kullandıktan sonra TIM3 seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiştir (p= 0,04, **Şekil 30I**). Bu sonuçlar, yorulma (tükenme) biyobelirteçlerinin özellikle PHA ile yeniden aktivasyondan sonra biraz daha arttığını göstermektedir. Bu sonuçlarla, CAR1928 yapılarını ifade eden PHA veya anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen T hücrelerinde yorgunluk belirteci seviyelerinin istatistiksel olarak önemli bir fark göstermediği gösterilmiştir.







Şekil 30. PHA veya anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin yorgunluk profili. (A) CD3+, CD4+, CD8+ ve EGFRt+ üzerinde ayırıştırma yapıldıktan sonra aynı örnekte PHA ile aktive edilen 7. gün CAR-T hücreleri ve transdüksiyon yapılmamış T hücre kontrolünde LAG3, TIM3 ve PD1 ifadelerini gösteren temsilci grafiklerin histogramları. (B) Anti-CD3&anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+ T hücreleri içindeki CD4+ CAR1928-T hücrelerinin yorgunluk biyobelirteçlerinin (LAG3, TIM3, PD1) MFI değerlerinin 14. gün karşılaştırması. (C) Anti-CD3&anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+ T hücreleri içindeki CD8+ CAR1928-T hücrelerinin LAG3, TIM3, PD1 14. günde MFI değerlerinin karşılaştırması. (D) Anti-CD3&anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+ T hücreleri içindeki toplam CD4+ T hücrelerinin LAG3, TIM3, PD1 14. günde MFI değerlerinin karşılaştırması. (E) Anti-CD3&anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+ T hücreleri içindeki toplam CD8+ T hücrelerinin LAG3, TIM3, PD1 14. günde MFI değerlerinin karşılaştırması. (F) Anti-CD3&anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+ T hücreleri içindeki toplam CD4+ CAR-T hücrelerinin LAG3, TIM3, PD1 21. gün MFI değerlerinin karşılaştırması. (G) Anti-CD3&anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+ T hücreleri içindeki toplam CD8+ CAR-T hücrelerinin LAG3, TIM3, PD1 21. gün MFI değerlerinin karşılaştırması. (H) Anti-CD3&anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+ T hücreleri içindeki toplam CD4+ T hücrelerinin LAG3, TIM3, PD1 MFI değerlerinin 21. gün karşılaştırması. (I) Anti-CD3&anti-CD28 ve PHA ile aktive edilen CD3+ T hücreleri içindeki toplam CD8+ T hücrelerinin LAG3, TIM3, PD1 21. gün karşılaştırması. İki yönlü t-testi istatistiksel anlamlılık * $p < 0.05$ ve ns: anlamlı olmayan şeklinde gösterilmiştir ve grafikteki çubuklar ilgili grupların ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir.

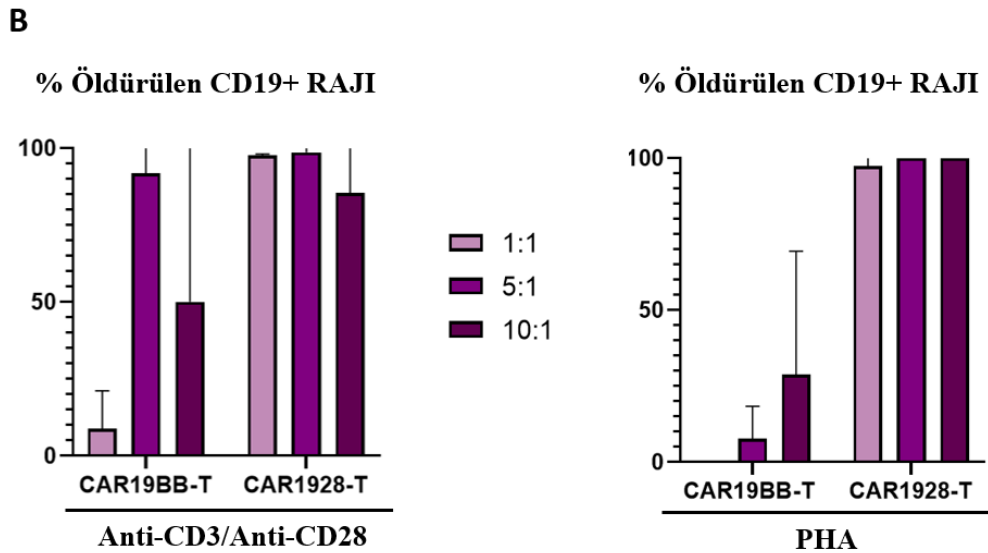
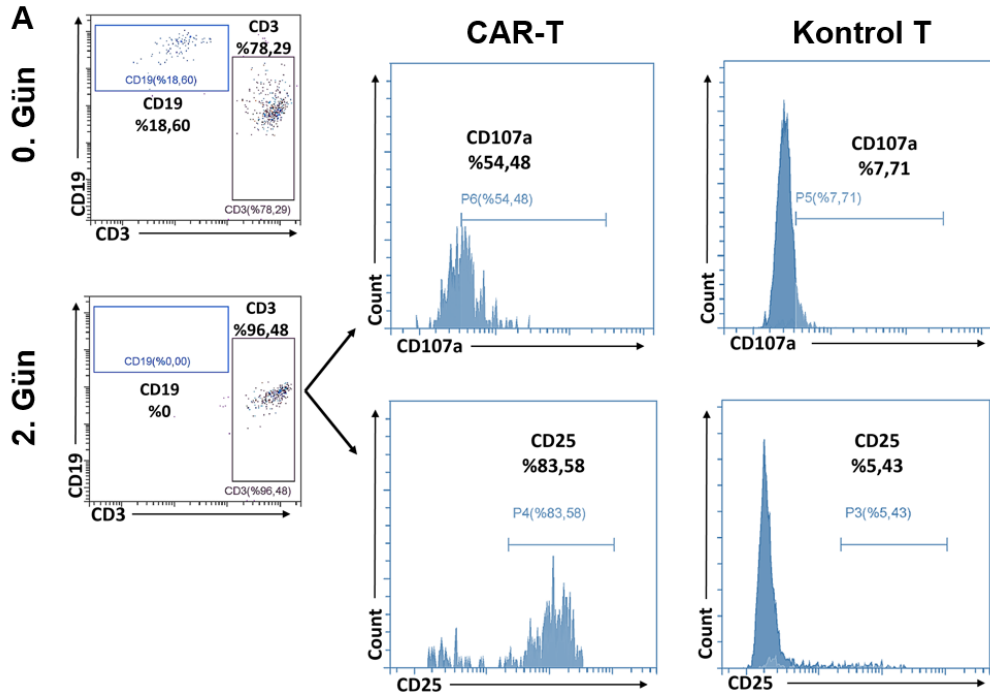
Açıklama: MFI: ortalama floresan yoğunluğu; LAG3: lenfosit-aktivasyon geni 3; TIM3: T hücresi immünglobulin ve mukin alan içeren 3; PD1: Programlanmış hücre ölümü protein 1.

4.3.3. PHA veya aCD3/aCD28 ile Aktive Edilmiş CAR-T Hücrelerinin Sitotoksik Aktivitesi

Daha sonra, CAR-T hücrelerinin PHA veya anti-CD3/anti-CD28 ile 14 gün boyunca aktivasyonu ve genişletilmesinin ardından anti-kanser aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan önceki çalışmalar, kullandığımız CD28 tabanlı CAR-T hücrelerinin genellikle güçlü bir çoğalma tepkisi başlattığını ve efektör bellek T hücreleri üretebildiğini, buna karşılık 4-1BB ko-stimülasyonunun progresif bir yanıtı tetiklediğini ve CAR-T hücrelerine gelişmiş kalıcılık ve merkezi bellek diferansiyasyonu sağlayabileceğini ortaya koymuştur (Ying, He, vd., 2019). Literatürdeki bu bilgiyle beraber, kanseri öldürmenin yanı sıra CAR-T hücrelerinin ortamdaki stabilitesi ve kalıcılığı test edilmek istenmiştir. Dolayısıyla PHA aktivasyon reaktifi ile 41BB kombinasyonunun kanseri öldürme kapasitesi ve kalıcılığı merak edilen bir diğer soru olmuştur.

CAR1928 veya CAR19BB'yi kodlayan CAR-T hücrelerinin PHA veya anti-CD3/anti-CD28 ile 14 gün boyunca aktivasyonu ve genişletilmesinin ardından anti-kanser aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. RAJI B hücreli lenfoma hücre hattı anti-CD19 antikoru ile boyanıp belirlenirken, CD3+T hücrelerindeki CAR-T hücreleri anti-EGFR antikoru ile belirlenmiştir. Hücrelerin aktivasyonunu değerlendirmek için CD25 ve CD107a aktivasyonunun yukarı regülasyonu ve degranülasyon belirteçleri belirlenmiştir (**Şekil 31A**). CAR19BB a3/28'in 2. günde özellikle 5:1 ve 10:1'de yüksek öldürme verimliliğine sahip olduğu gözlemlendi. Ancak 7. günde öldürme oranı neredeyse 0'a düştü ($p = 0,004$, **Şekil 7B**). 7. günden sonra sitotoksosite oranının %100'e yükseldiği görüldü ($p=0,0001$). CAR1928 anti-CD3/ anti-CD28 için 2. günde neredeyse %100'e yakın anti-kanser etkisi gözlenirken, 7. günde %100'ü öldürdüğü gözlemlendi ($p = 0,0001$, **Şekil 31B**). CAR19BB PHA'da 10:1 (ns) oranında bile çok düşük bir sitotoksosite oranı gözlemlendi. Ancak CAR1928 CAR-T, PHA ile aktive edilerek üretildiğinde bile 2. günde %100'e yakın, 7. günde ise %100'e yakın öldürdüğü gözlemlendi ($p = 0,00001$, **Şekil 31B**).

Sonuçlarımız, PHA veya anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen CAR1928-T hücrelerinin etkili bir şekilde anti-tümör aktivite gösterebildiği ve aktivasyona bağlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, PHA ile aktive edilen CAR19BB-T hücrelerinin ise anti-tümör aktivitesinin CAR1928-T hücrelerine ve aynı zamanda anti-CD3/anti-CD28 ile aktivasyona kıyasla daha az olduğu gözlenmiş olup, bu sonucun da kalıcılığın fazla olmasından kaynaklı olduğunu düşündürmektedir.

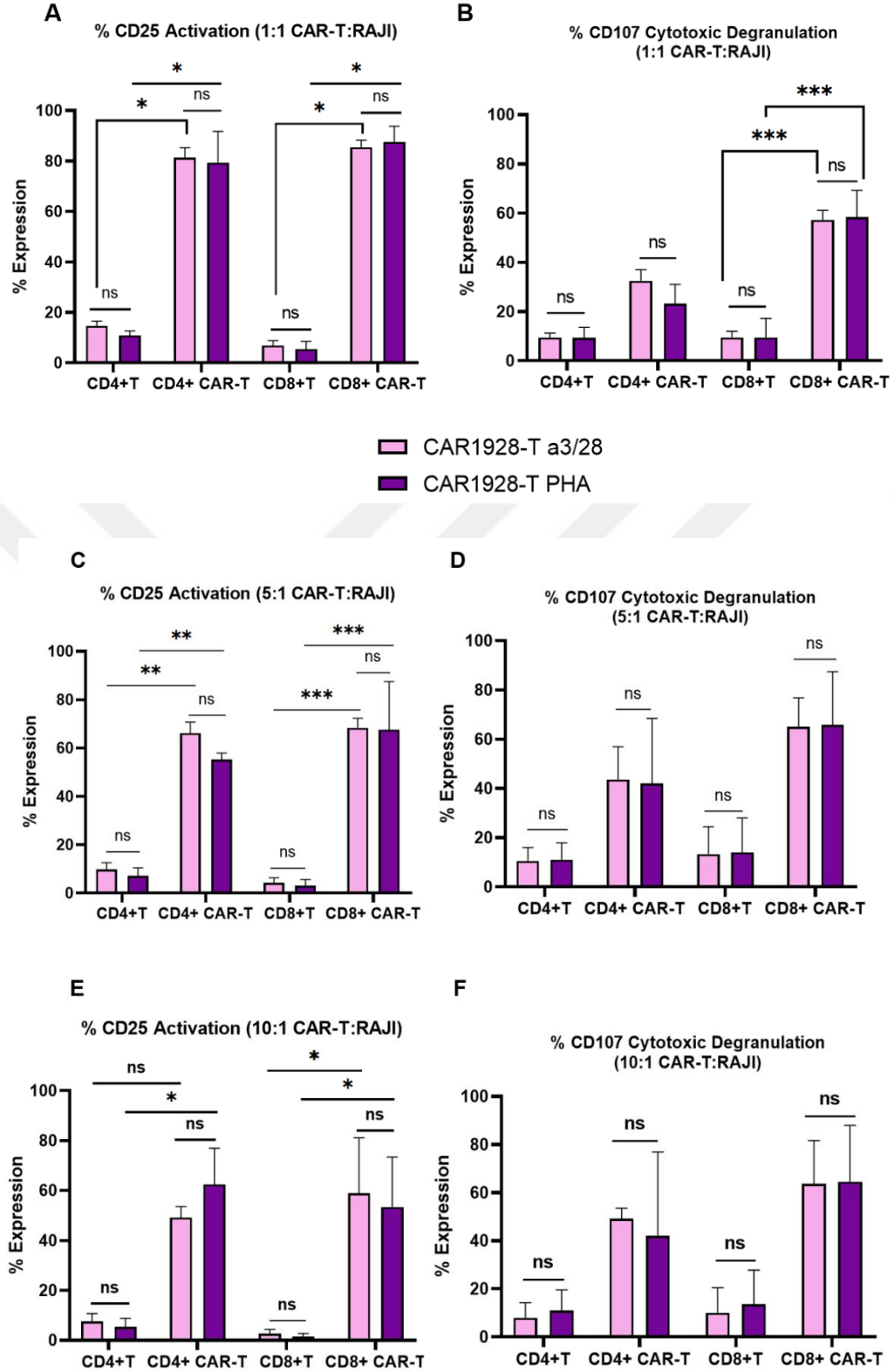


Şekil 31. CAR-T hücrelerinin sitotoksikite kapasitesi. (A) Akış sitometrisiyle CD3⁺ T hücrelerindeki CAR-T hücreleri ve kontrol grubundaki transdükte edilmemiş T hücrelerinin CD25 aktivasyonu ve CD107a sitotoksik degranülasyon belirteçlerinin analizi, CAR-T RAJI birlikteliği deneyindeki CD19⁺ RAJI

hücrelerinin 48 saat sonrasındaki ölümü. (B) PHA ve anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilerek üretilen CAR19BB ve CAR1928 CAR-T hücrelerinin 2. günde CD19+ RAJI Öldürme Deneyi Ölüm Oranları. İki yönlü t-test istatistiksel anlamlılık * $p < 0.05$ ile gösterilir ve grafikteki çubuklar ilgili grupların ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil eder. Açıklama: 1:1, 5:1 veya 10:1; Efektör CAR-T: Bir hafta boyunca birlikte inkübe edilen hedef RAJI hücresi.

CAR1928-T hücrelerinin anti-CD3/anti-CD28 veya PHA (1:1 CAR-T:RAJI) ile aktivasyonundan sonra, hem CD4+ CAR-T hem de CD8+ CAR-T için CD25 ekspresyonu gözlenmiştir. CAR19BB'nin, kontrol CD4+ T ve kontrol CD8+ T ile karşılaştırıldığında hem anti-CD3/anti-CD28 hem de PHA aktivasyonunda önemli bir artış sergilediği gözlemlendi. Anti-CD3/anti-CD28'e benzer şekilde, CD25 ve CD107a biyobelirteçleri de aynı şekilde artış göstermiştir. CAR19BB ($p = 0,003$, **Şekil 32A** ve $p = 0,00001$, **Şekil 32B**). CAR1928'in hem anti-CD3/anti-CD28 hem de PHA (5:1 CAR-T:RAJI) ile aktivasyonunda, hem CD4+CAR-T hem de CD8+CAR-T için CD25 ekspresyonu gözlemlendi. CAR1928 ile karşılaştırıldığında CAR19BB'nin hem anti-CD3/anti-CD28 hem de PHA tarafından etkili CD25 aktivasyonu göstermediği gözlemlendi. CD107a ekspresyon seviyeleri CD28 ile karşılaştırıldığında, CAR19BB'de benzer şekilde arttı. CD8+ CAR-T CAR1928 PHA oranı, CD8+ T PHA oranından daha yüksekti ($p = 0,022$, **Şekil 32C** ve $p = 0,045$, **Şekil 32D**).

CAR1928'in hem anti-CD3/anti-CD28 hem de PHA (10:1 CAR-T:RAJI) ile aktivasyonunda, CD4+ CAR-T ve CD8+ CAR-T için CD25 ekspresyonunun başarıyla gerçekleştiği gözlemlendi. CAR1928 ile karşılaştırıldığında CAR19BB'nin hem anti-CD3/anti-CD28 hem de PHA tarafından etkili CD25 aktivasyonu göstermediği gözlemlendi. CD107a'nın aktivasyonu, CD4+ CAR-T'lere kıyasla CD8+ CAR-T'lerde daha yüksekti. CAR19BB CAR-T hücrelerinde etkili CD25 aktivasyonu gözlenmemesine rağmen, anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilmiş CAR1928 CAR-T hücreleri ile CD107a sitotoksik degranülasyonunda benzer aktivasyon gözlemlendi ($p = 0,01$, **Şekil 32E** ve $p = 0,03$, **Şekil 32F**).



Şekil 32. CD25 ve CD107a yukarı regülasyonu ile CAR-T hücrelerinin aktivasyonu. CAR-T hücrelerinin CD25 aktivasyonu ve CD107a sitotoksik degranülasyon biyobelirteçlerinin çubuk grafiği ve CAR-T: RAJI ortak kültür deneyleri.

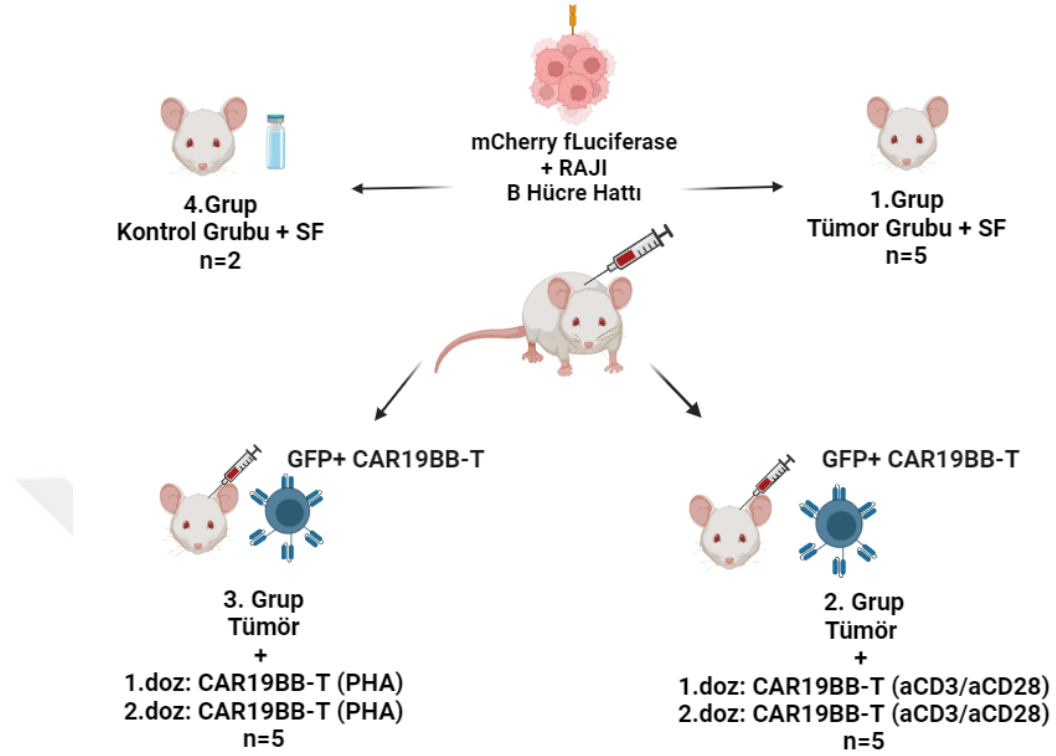
CD3+ T hücrelerinde 48 saat boyunca 1:1 CAR-T: RAJI ortak kültür deneylerinde CAR-T hücrelerinin ve kontrol T hücrelerinin (A) CD25 aktivasyonu ve (B) CD107a sitotoksik degranülasyon biyobelirteçlerinin çubuk grafiği. CD3+ T hücrelerinde 48 saat boyunca 5:1 CAR-T: RAJI ortak kültür deneylerinde CAR-T hücrelerinin ve kontrol T hücrelerinin (C) CD25 aktivasyonu ve (D) CD107a sitotoksik degranülasyon biyobelirteçlerinin çubuk grafiği. CD3+ T hücrelerinde 48 saat boyunca 10:1 CAR-T: RAJI ortak kültür deneylerinde CAR-T hücrelerinin ve kontrol T hücrelerinin (E) CD25 aktivasyonu ve (F) CD107a sitotoksik degranülasyon biyobelirteçlerinin çubuk grafiği. İki taraflı t-test istatistiksel önem, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ ile temsil edilmiştir ve grafikteki çubuklar, CAR1928 anti-CD3&anti-CD28 (pembe) ve CAR1928 PHA (mor) gruplarının ortalama $\pm$ standart sapmasını göstermektedir.

4.4. ALL Modeli Farelerde *In Vivo* Yaklaşımlar

Bu tez kapsamında yapılan *in vitro* çalışmalarda, PHA'nın CAR-T hücrelerini, T hücre popülasyon içerisinde TCM ve TSCM hücrelerine yönelttiği gösterilmiştir. Bununla birlikte iki farklı CAR kontraktı ile yapılan anti-kanser çalışmalarında ise PHA veya anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilen CAR1928-T hücrelerinin etkili bir şekilde anti-tümör aktivite gösterebildiği ve aktivasyona bağlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. PHA ile aktive edilen CAR19BB-T hücrelerinin ise anti-kanser özellik gösterdiğini fakat anti-CD3/anti-CD28 ile aktivasyona kıyasla daha az anti-kanser etkinliği gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç bize CAR19BB-T hücrelerinin anti-kanser/sitotoksik özelliğinin vücut içerisinde kalıcılığın fazla olmasından kaynaklı olup olmadığını düşündürmektedir. Bu hipoteze dayanarak PHA veya anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CAR19BB-T hücrelerinin *in vivo* stabilite ve etkinlik kapasitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, PHA veya anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CAR19BB-T hücreleri, CD19+B hücreli kanser hayvan modelinde kullanılarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Tümör grubu, CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28), CAR19BB-T (PHA) ve Kontrol Grubu olmak üzere 4 farklı grup ile çalışma gerçekleştirilmiştir. CD19+ ALL kanser modelini simüle etmek için *in vivo* fare gruplarında >99% fLuciferase+ mCherry+ RAJI hücre hattı *in vitro* laboratuvar ortamında lentiviral transdüksiyon yoluyla oluşturulmuştur. fLuciferase+ mCherry+ RAJI enjekte edilen fare gruplarında (Şekil 33) ALL kanser modelinin gelişimi, dokuz hafta boyunca biyoluminesans (Şekil 34A) ve mCherry floresan (Şekil 34B) kanalları IVIS Spectrum *In Vivo* Görüntüleme Sistemi (PerkinElmer) kullanılarak izlenmiştir. Floresan kanalında mCherry RAJI oluşumu yedinci günde tespit edilmiştir.

PHA veya anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CAR19BB-T hücreleri, 7. ve 10. günlerde CAR grubu farelere enjekte edilmiştir (Şekil 34B).



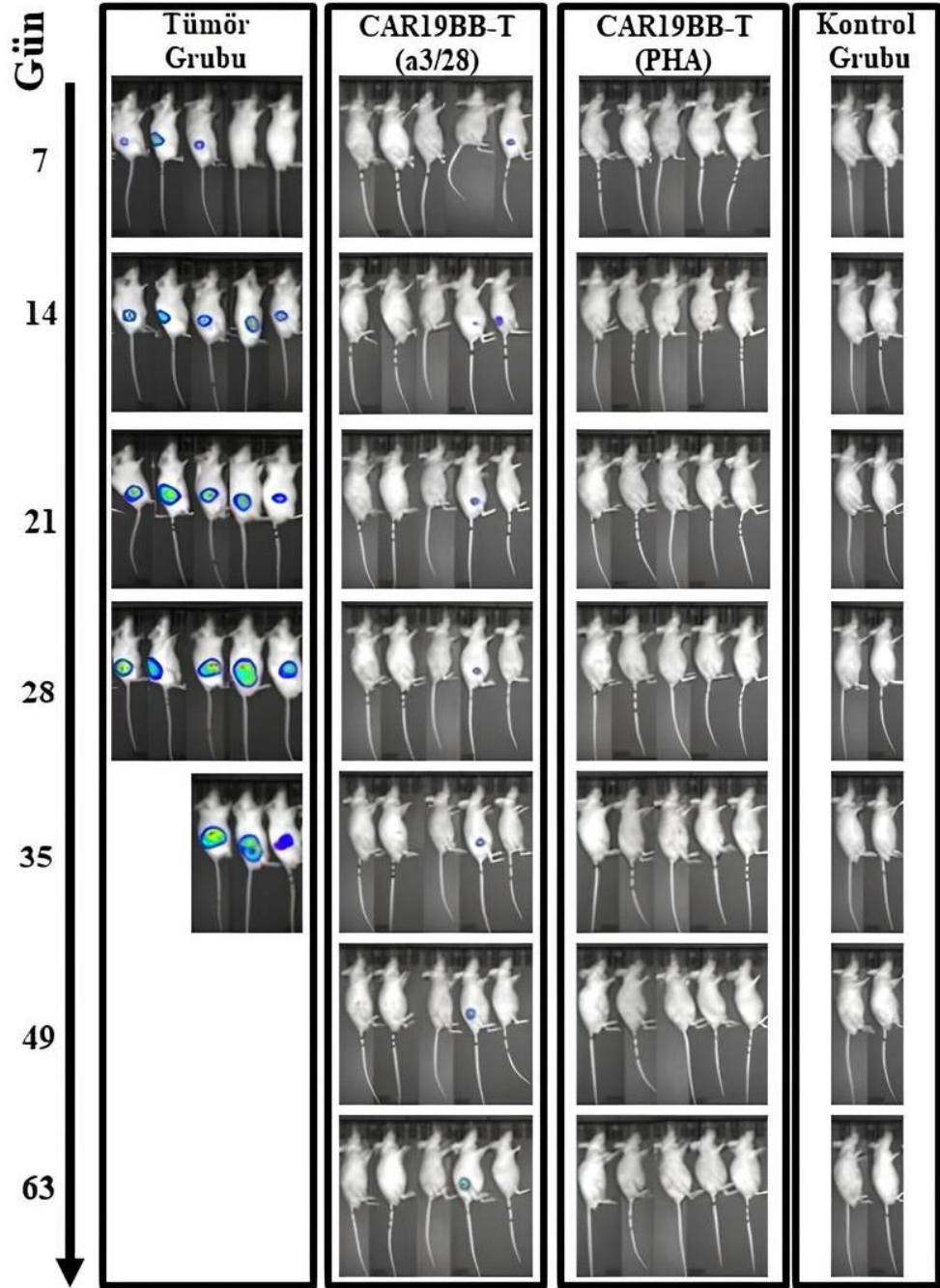
Şekil 33. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) Nude/NSG fare modellerinde yürütülen *in vivo* CAR-T hücre etkinlik çalışmalarını gösteren plan. Yalnızca Tümör: İlk grup tümör modelini oluşturulmuştur ve farelere Serum Fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapıldı. **CAR19BB anti-CD3/anti-CD28 CAR-T** grubu olan İkinci gruba iki doz CAR19BB anti-CD3&anti-CD28 CAR-T enjeksiyonu yapılmıştır. **CAR19BB PHA CAR-T** grubu olan üçüncü gruba iki doz CAR19BB PHA CAR-T enjeksiyonu yapılmıştır. **Kontrol Grubu olan** Dördüncü grup, tümörsüz fareleri temsil etmektedir (n = her gruptaki fare sayısını temsil etmektedir).

Biyolüminesans ve mCherry kanallarında "Tümör grubu, CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28), CAR19BB-T (PHA)" gruplarındaki kanser gelişimi değerlendirildiğinde, yalnızca tümör grubunda kanser gelişimi 35. güne kadar devam etmiştir. CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) (n=5) enjekte edilen grupta ise bir farede iki ay boyunca tümör varlığı devam ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 33A ve 33B). CAR19BB-T (PHA) grubu farelerde, fLuciferase+ mCherry+ RAJI kanser gelişimi biyolüminesans kanalında gözlemlenmemiş olup, mCherry kanalında ise CAR-T hücre enjeksiyonları sonrasında yedinci günde kaybolmuştur (Şekil 33A ve 33B).

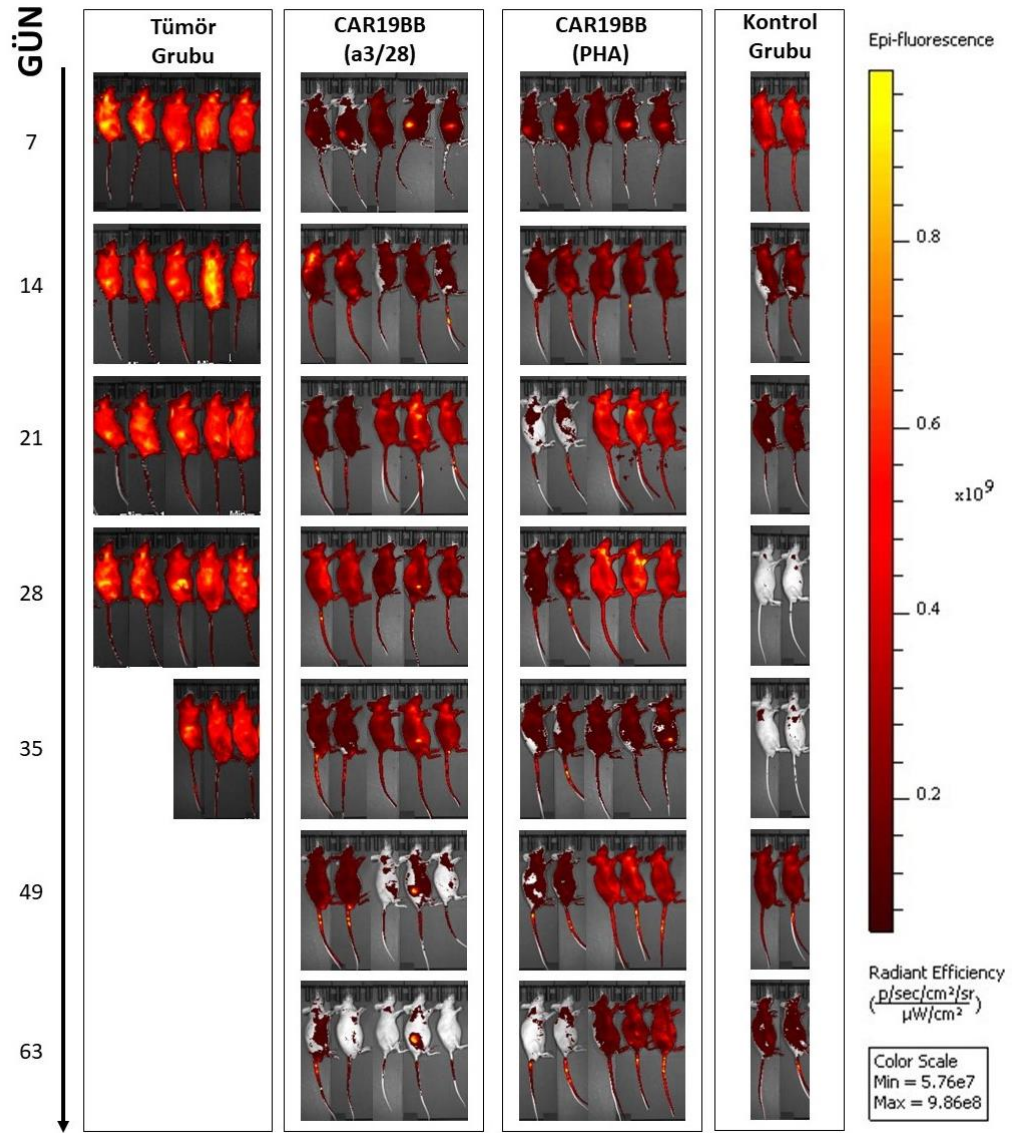
Bunun aksine yalnızca tümör grubundaki tüm fareler, özellikle 28. günden itibaren, ilerlemiş kanser gelişimi göstermeleri nedeniyle 35. günden sonra kurban edilmektedir

(**Şekil 33A**). Bu sonuçlar, CAR-T hücre enjeksiyonlarının, *in vivo* testlerde tümör grubu dışındaki diğer tüm gruplarda 60 gün boyunca CD19+ kanser gelişimini bastırdığını göstermektedir. Ayrıca, GFP kodlayan CAR-T hücreleri, *in vivo* enjeksiyon gruplarında 60 gün boyunca CAR-T hücrelerinin varlığını değerlendirmek amacıyla GFP floresan kanalında takip edilmiştir (**Şekil 33C**). Enjeksiyon gününü (7. ve 10.gün) takip eden günlerde, CAR-T hücre varlığı tüm gruplarda benzer şekilde tespit edilmiş olup özellikle CAR19BB-T (PHA) enjekte edilen grupta, CAR-T varlığının iki ay boyunca vücut içerisinde azalmadan devam ettiği gözlenmiştir (**Şekil 33C**). CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) enjekte edilen gruplarda, CAR-T hücrelerinde bir artış 49. günden sonra gözlenmiştir. Bunun sebebinin ise mCherry+ RAJI biyoluminesansındaki artıştan kaynaklı olduğu düşünülmektedir (**Şekil 33C**). Bu sonuçlar, CAR19BB-T' nin PHA ile aktive edilmesinin, diğer gruplara kıyasla daha yüksek bir kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

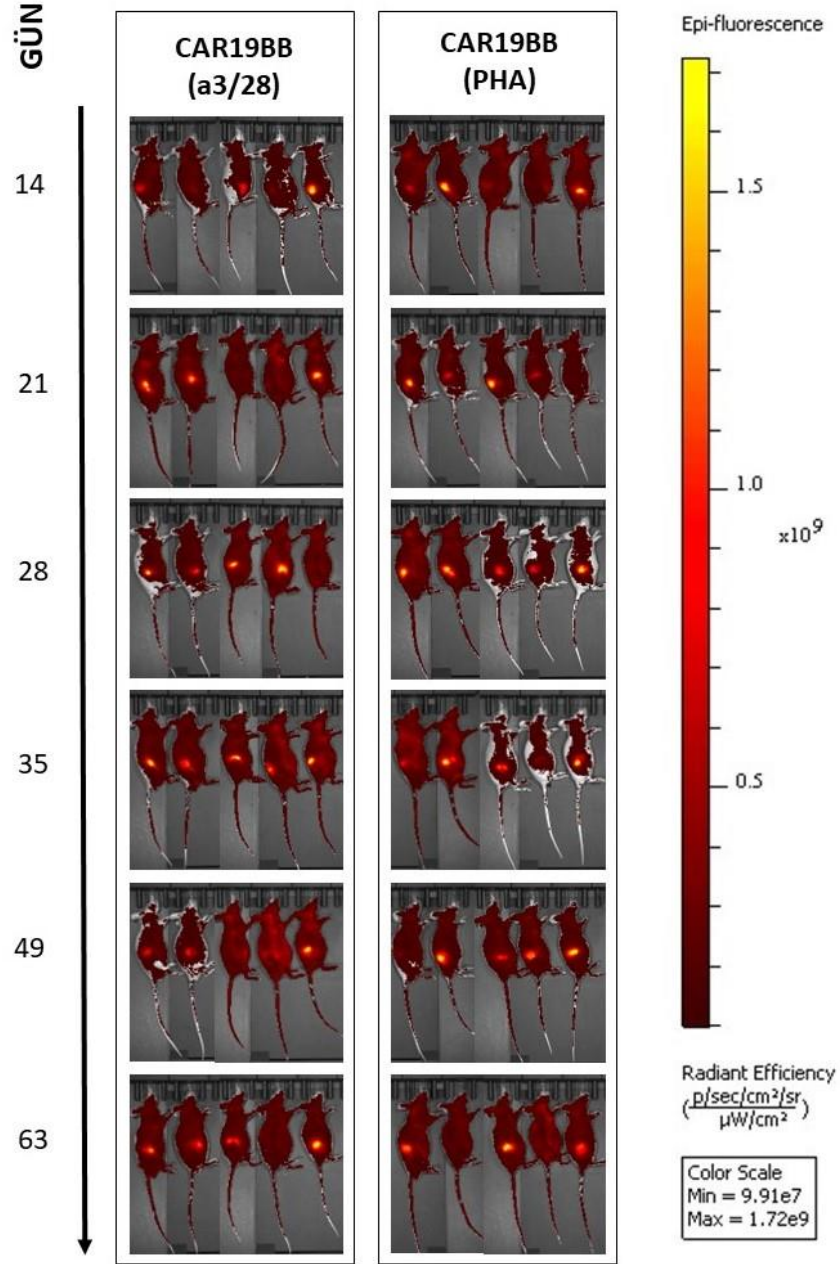
A



B



C



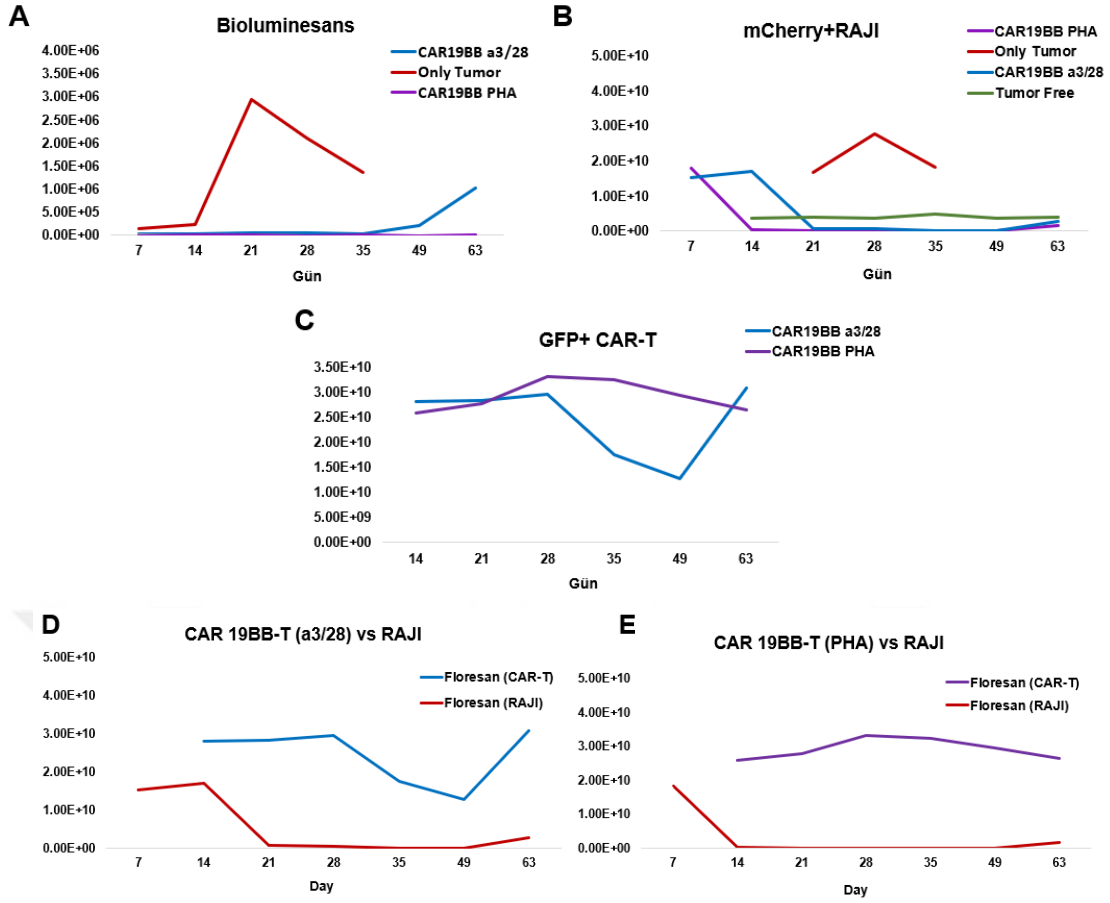
Şekil 34. CD19+B hücreli ALL kanser hayvan modeli farelerde CAR19BB-T hücre etkinliğinin zamana bağlı (7.-63. gün) görselleştirilmesi. (A) Biyoluminesans görüntüleme, lusiferin enjeksiyonunu takiben tedavi gruplarında fLuciferase+ mCherry+ CD19+ RAJI kanser hücrelerinin parlaklığını gösterir. **(B)** Floresan görüntüleme, tedavi gruplarındaki fLuciferase+ mCherry+ CD19+ RAJI kanser hücrelerinin parlaklığını gösterir. **(C)** GFP floresan görüntüleme, tedavi gruplarında GFP+ CAR-T hücrelerinin parlaklığını gösterir.

IVIS Spectrum *In Vivo* Görüntüleme Sistemi (PerkinElmer) kullanılarak 4 fare grubu, RAJI hücre enjeksiyonundan (*kontrol grubuna yalnızca Serum fizyolojik verilmiştir.*) sonraki 14. Günden itibaren 63.güne kadar CD19+ RAJI ve GFP+ CAR-T hücrelerinin izlenmesi için görüntüleme alınmıştır. Görüntüleme esnasında CD19+ RAJI ve GFP+ CAR-T hücrelerinin izlenmesi araştırılmış olup zamana bağlı takibi sağlanmıştır. CAR-T tedavi gruplarına kıyasla "tümör" grubunda fLuciferase+ RAJI hücrelerinin biyoluminesansının özellikle 21. günden itibaren 35. güne kadar önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (**Şekil 35A**). 35.günde ise tümör grubu sakrifiye edilmiştir. Ayrıca tümör gelişimi devam eden CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) grubu içerisindeki 1 farenin varlığının, grup içerisindeki ortalama lüminesans değerini arttırdığı görülmektedir (**Şekil 35A**). RAJI kanseri gelişiminin vücut içerisinde hassas değerlendirilmesi için bioluminesans görüntülemenin yanı sıra floresans görüntüleme ile mCherry ışımaya takibi yapılmıştır. mCherry floresan değerlendirmelerinin özellikle "tümör" grubunda fLusiferaz bioluminesans ışımaya benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) ve CAR19BB-T (PHA) CAR-T tedavi gruplarında mCherry+ RAJI hücre oranı, özellikle 14. günden itibaren önemli ölçüde azalmıştır (**Şekil 35B**). Anti-CD3&anti-CD28 grubuna kıyasla, PHA ile aktive CAR-T grubunda tümör vücut içerisinde daha hızlı ortadan kaybolmuştur. Ayrıca RAJI kanser hücre hattının nüksetmesi, 49. günden itibaren mCherry floresans kanalında da gözlemlenebilmektedir (**Şekil 35B**).

Tez kapsamında sorduğumuz bir diğer soru PHA ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen hücrelere kıyasla, CAR-T stabilitesini arttırıp arttıramayacağı sorusudur. GFP floresans lüminesans analizinde, CAR19BB-T (PHA) grubundaki CAR-T hücre oranının 63 gün boyunca çok fazla azalmadığı ve vücut içerisinde sabit kaldığı gözlenmiştir (**Şekil 35C**). Buna karşılık, anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CAR19BB-T hücrelerinin uygulandığı grupta CAR-T hücre oranları, CAR19BB-T (PHA) oranına kıyasla 28. günden itibaren önemli ölçüde azalmıştır ($p=0,032$) (**Şekil 35C**). GFP CAR-T ve mCherry RAJI floresans lüminesans analizleri ile birlikte CD19+B hücreli ALL'nin zamana bağlı nüksetmesi durumunda CAR-T hücrelerinin çoğalma ve stabilite kapasitesi değerlendirilmiştir.

CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) hücre uygulamasının yapıldığı grupta 14. günden itibaren RAJI kanser gelişiminin azaldığı ve sıfırlandığı, bununla birlikte CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) hücre oranının 49. güne kadar azalmaya devam ettiği gözükmemektedir (**Şekil 35D**). Üstelik CD19+ mCherry+ RAJI hücrelerinde 49. günden 63. güne kadar olan artışa paralel olarak CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) hücre oranı da bu artışa paralel olarak artış göstermektedir (**Şekil 35D**). CAR19BB-T (PHA) uygulanan grupta ise 14. günde RAJI kanseri gelişimi sıfırlanırken, 63. güne kadar CAR-T hücre oranında herhangi bir azalma gözlenmemiştir (**Şekil 35E**). Bu bulgular, PHA ile aktive edilen CAR19BB-T hücrelerinin anti-kanser etkinliğini koruduğunu ve zaman içinde anti-CD3&anti-CD28 ile aktivasyonla üretilen CAR19BB-T hücreleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir.

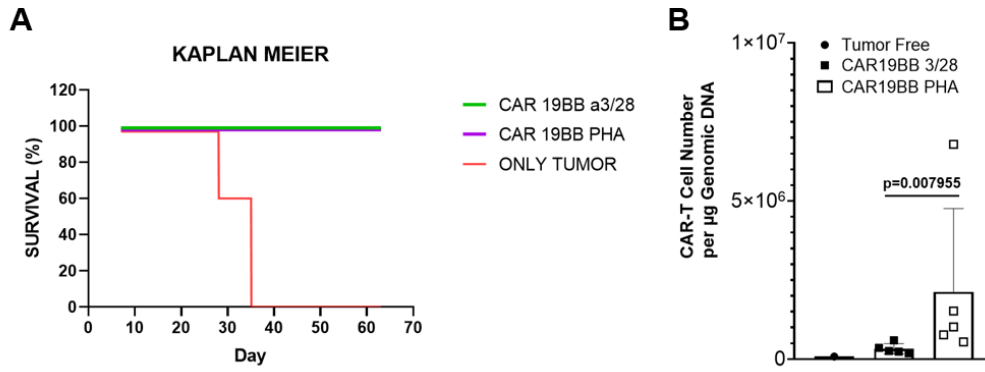




Şekil 35. fLusiferaz biyoluminesans, mCherry ve GFP floresan *in vivo* Kantifikasyonları. (A) Grafik, ALL model farelerinde fLusiferaz+ RAJI kanser hücresinin uygulama gruplarında zamana bağlı (7-63 gün) gelişmesini biyoluminesans ışına kanalında göstermektedir. (B) Grafik, ALL model farelerinde mCherry+ RAJI kanser hücresinin uygulama gruplarında zamana bağlı (7-63 gün) gelişmesini mCherry floresan ışına kanalında göstermektedir. (C) Grafik, ALL model farelerinde GFP+ CAR-T hücresinin uygulama gruplarında zamana bağlı (7-63 gün) varlığını GFP floresan ışına kanalında göstermektedir. Floresan ışına kanallarında *in vivo* mCherry+ RAJI kanserli hücre büyümesinin uygulama gruplarındaki GFP+ (D) CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28), (E) CAR19BB-T (PHA) ve hücre varlığı ile zamana bağlı kıyaslanmalarını göstermektedir. T-test istatistiksel önem, * $p < 0.05$ ile temsil edilmiştir.

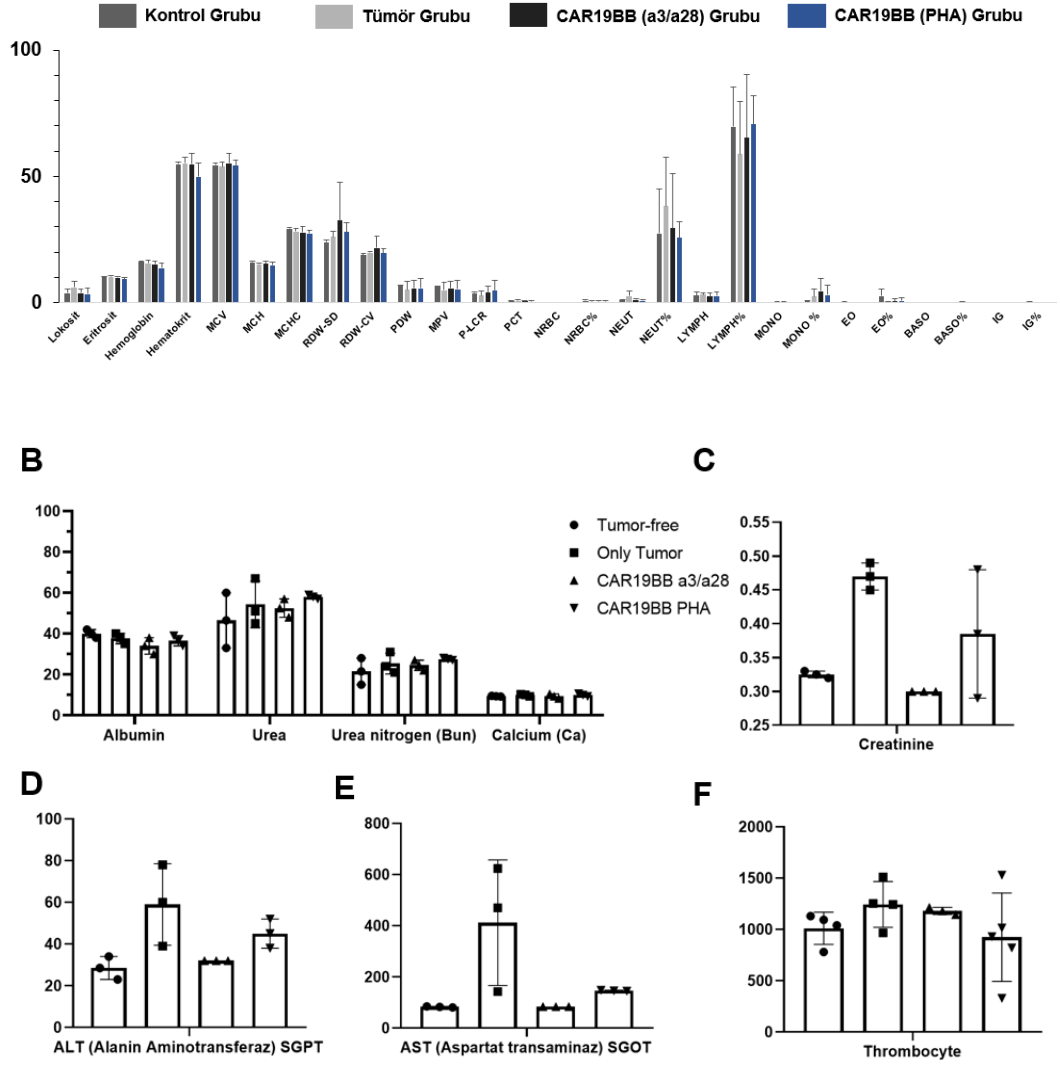
CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) ve CAR19BB-T (PHA) CAR-T hücre tedavisi alan gruplarda hayatta kalma analizi için Kaplan-Meier analizi yapılmıştır. *In vivo* çalışmanın ardından, "tümör" grubundaki tüm fareler 35. günde ölümlerken, CAR-T hücre tedavisi alan 2 farklı gruptaki farelerin genel hayatta kalma oranında 63 günlük bir analiz sonucunda herhangi bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 36A). Ancak hayatta kalan tüm fareler için, CAR-T hücresi stabilitesini değerlendirmek üzere 63. günde sakrifiye edildikten sonra toplanan kan örnekleri kullanılarak genomik DNA analizi yapılmıştır.

İzolasyonu takiben CAR-T hücrelerinin spesifik LTR hedefli dizilerinin varlığına bakmak amacıyla RT-PCR analizi yapılmıştır (Şekil 36B). Şekil 4C ve 4E'de, CAR-19BB-T (PHA) varlığının, CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) ($p=0,007955$) alan gruplara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 36B). Bu analizlere dayanarak PHA ile aktive edilen CAR19BB-T hücrelerinin kanser karşıtı etkinliğini koruduğu ve diğer uygulama yaklaşımlarına göre zaman içinde daha yüksek stabilite sergilediği düşünülmektedir.



Şekil 36. Kaplan Meier Sağ Kalım analizi ve CAR-T hücre In vivo PCR ile tespiti. (A) ALL kanser modeline sahip fare gruplarında CAR-T hücre enjeksiyonları sonrası 7-63. günler arasında sağ kalım analizi. (B) Çubuk grafik, ALL kanserli fare gruplarının kan analizleri sonrası CAR-T hücre varlığının LTR spesifik RT-PCR sonrası izole edilen 1µg genomik DNA içerisindeki CAR-T hücre sayısını vermektedir. T-test istatistiksel önem, * $p < 0.05$ ile temsil edilmiştir.

CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) ve CAR19BB-T (PHA) CAR-T hücre tedavisinin 63. günde sonlandırıldığı fare gruplarında sağkalım ve anti-kanser analizleri hemogram analizi ve biyokimyasal testler yapılarak değerlendirilmiştir. Hemogram analizi, CAR-T ile tedavi edilen gruplar ile tümörü olmayan kontrol grubu fareler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Hemogram değerleri, tümör grubu farelerle karşılaştırıldığında CAR-T gruplarındaki değerler genellikle tümörsüz kontrol grubunda gözlemlenen fizyolojik seviyelere geri dönmüştür (Şekil 37A). Ancak biyokimyasal analizde, CAR-T ile tedavi edilen grupların, yalnızca tümör gruplarına kıyasla Albümin ve Kreatinin düzeylerinde önemli ölçüde azalma ve Üre düzeylerinde artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 37B ve 37C).



Şekil 37. CAR-T hücre uygulama sonrası ALL kanser modeli farelerde hemogram ve biyokimya analizleri. (A) Çubuk grafikleri, CAR-T hücre uygulamaları yapılan fare gruplarının ve tumor free control grubunun 63. gün ve only tumor grubunun 35. gün hemogram analizlerini gösterir (n=5; grup). Çubuk grafikleri, CAR-T hücre uygulamaları yapılan fare gruplarının ve tumor free control grubunun 63. gün ve only tumor grubunun 35. gün (B) biyokimya analizlerini (Albumin, g/L; Üre, mg/dL; Üre nitrojeni, mg/dL; Kalsiyum, mg/dL), (C) Kreatinin (mg/dL), (D) ALT SGPT (U/L), (E) AST SGOT (U/L) gösterir. (F) Çubuk grafikleri, CAR-T hücre uygulamaları yapılan fare gruplarının ve tumor free control grubunun 63. gün ve only tumor grubunun 35. gün Tromosit ($10^3/uL$) analizlerini gösterir (n=5; grup). T-test istatistiksel önem, * $p < 0.05$ ile temsil edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Kanser, dünya çapında en yaygın ölüm nedenidir. Yalnızca 2020 yılında yaklaşık 10 milyon kanserle ilişkili ölüm rapor edilmiştir (Ferlay vd., 2021). Geleneksel kanser tedavileri (radyasyon ve kemoterapi) etkili olsa da sağlıklı hücrelere zarar vermekte ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Son yıllarda immünoterapi gibi yeni kanser tedavi yöntemleri ortaya çıkmıştır. Kimerik antijen reseptörü (CAR) T hücresi tedavisi en umut verici yaklaşımlardan biridir. CAR-T hücresi terapisi, T hücrelerinin, tümör hücrelerinin yüzeyindeki spesifik antijenleri tanıyan ve bunlara bağlanan CAR'ları eksprese etmesi için genetik olarak değiştirildiği bir immünoterapi şeklidir. CAR, hücre dışı bir antijen bağlama alanı, bir transmembran alanı ve bir hücre içi sinyalleme alanından oluşmaktadır. CAR-T hücresi, kanser hücresindeki antijene bağlandığında hücre içi sinyal domainini aktive etmektedir. Bu durum, T hücresinin çoğalmasını ve kanser hücresini öldüren sitokinleri serbest bırakmasını tetiklemektedir (Labanieh vd., 2018). CAR-T hücreleri, kanser hücrelerini tanıyıp yok edebilir ve vücutta uzun süre kalırken güçlü anti-tümör tepkiler üretebilmektedir. B hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (B-ALL), Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DLBCL), Multipl Miyelom (MM) ve katı tümörler gibi hematolojik malignitelerin tedavisinde CAR-T hücre terapisi umut verici sonuçlar göstermiştir.

Literatür çalışmaları, T hücre alt popülasyonlarından merkezi bellek T hücreleri (TCM) ve kök hücre benzeri bellek T hücreleri (TSCM) oranlarının CAR-T hücre popülasyonu içinde yüksek olmasının immünoterapinin etkinliği için önemli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, CAR-T hücrelerinin uzun süreli ve sitotoksik (anti-tümör) etkili kalabilmesini sağlamak amacıyla CAR eksprese eden TCM ve TSCM hücre popülasyonlarının artırılması hedeflenmektedir. Özellikle son yıllarda hematolojik ve katı tümörler için CAR-T hücresi tedavisinde büyük ilerleme kaydedilmiştir, ancak hastalarda tedaviden sonra hala nüks yaşanmaktadır. CAR-T hücrelerinin *in vivo* olarak zayıf kalıcılığı, nüksetmenin önemli bir nedenidir (Huang vd., 2020). CAR-T hücrelerinin *in vivo* olarak neden kalıcı olduğunu sınırlayan faktörlerden biri ise CAR-T hücrelerinin Hafıza (memory) hücre oranı olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, hafıza T hücrelerinin yüzdesi ne kadar yüksek olursa, T hücrelerinin *in vivo* olarak o kadar dayanıklı olduğunu göstermiştir (McLellan & Ali Hosseini Rad, 2019). Bu nedenle, hafıza CAR-T hücrelerinin oranını arttırmak önemlidir.

CAR-T hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* kanser modellerinde uzun süreli ve etkili kalabilmesi için merkezi hafıza özelliğine (TCM) ve kök hücre benzeri hafıza özelliğine (TSCM) sahip olması gerekmektedir. Şu anda mevcut CAR-T hücre teknolojileri, hücreleri aktive etmek için literatürde anti-CD3/anti-CD28 mikrobuncuklarını sıklıkla kullanılmaktadır. **Söz konusu tezdeki amaç** ise CD19+ B hücreli *in vitro* ve *in vivo* kanser modeli kullanılarak CD19 spesifik CAR-T hücrelerini aktiveleştirme yönteminde, *Fitohemaglutinin (PHA)* veya *anti-CD3&anti-CD28*, yapılacak değişikliklerle uzun süreli stabil ve sitotoksik etkin CAR-T hücre üretim yöntemi geliştirilmesidir.

Bu tez çalışması ile PHA'nın CAR-T hücrelerinin aktivasyonu ve çoğalma kapasitesi için iyi bir alternatif olabileceğini, *in vitro* ve *in vivo* ortamda daha stabil kalarak hafıza hücresi alt tiplerine dönüşebileceği kanıtlanmıştır. Tez kapsamında alınan sonuçlarla anti-CD3/anti-CD28 mikrobuncuklarının yerini alacak yeni bir alternatif CAR-T üretim süreci geliştirilmiştir.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda, 14.günde yapılan reaktivasyondan sonra transdüksiyonla CAR ifadesinin istenilen oranda artırılabilceği gösterilmiştir. 2. aktivasyonun CAR ekspresyonu arttırmasına karşın, PHA veya anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CD3+ T hücreleri ile 7., 14. (2.aktivasyon; reaktivasyon), ve 21. günlerde yapılan alt popülasyon çalışmaları ile elde edilen verilere bakıldığında, reaktivasyonun hücrelerin sağlığı ve hafıza özelliği açısından iyi olmadığı sonucuna varılmıştır. Dolayısı ile bir sonraki CAR-T üretimlerinde reaktivasyon yapılmadan hücreler yaklaşık 14 gün kültüre edilmiştir. Bununla birlikte transdüksiyon verimliliğini arttırmak için kullanılan BX-795 ve Protamine Sülfat'ın hücrelerde plak benzeri yapılar oluşturduğunu ve bu oluşan plakların hücre sağlığı açısından iyi olmadığı gözlemlenmiş olup sonraki transdüksiyon deneylerinde kullanılmamıştır.

Tez kapsamında yapılan *in vitro* çalışmalar kapsamında, lentivirüs üretimleri FuGENE ve PEI reaktifi ile denenmiştir. Virüs üretimi çalışmalarında gerçekleştirdiğimiz farklı optimizasyon çalışmaları sonucunda PEI reaktifi ile maliyeti uygun etkili virüs üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu sonuç doğrultusunda yapılan transfeksiyon ve virüs üretimleri PEI reaktifi ile yapılmıştır. Buna ek olarak, üretilen lentivirüsün konsantrasyonunu arttırmak ve daha etkin virüs üretimi gerçekleştirmek için Lenti-X™ Concentrator ve Amicon filter kullanılarak virüs titreleri test edilmiştir.

Lenti-X ile daha etkin viral titre sonuçları elde edilmiş olup, sonraki analizlerde lentivirüs konsantrasyon işlemleri Lenti-X ile gerçekleştirilmiştir. CD3+ T hücrelerinin izolasyonunu takiben lentiviral transdüksiyon ile CAR-T hücre üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. İki farklı aktivasyon reaktifiyle üretilen CAR-T hücrelerinin birinci transdüksiyon sonrası CAR ifadelerinin birbirine benzer düzeyde çıktığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında, anti-CD3/anti-CD28 mikrobuncuklarla karşılaştırıldığında, PHA ile aktiveleşen T hücrelerinin proliferasyonu önemli ölçüde arttığı keşfedilmiştir. Bu sonuç ile, PHA ile aktiveleşen CAR-T hücrelerinin klinik çalışmalar için hastalara uygulanmadan önce daha hızlı ve kolay bir şekilde çoğalabileceği görülmüştür.

Anti-CD3/anti-CD28 mikrobuncuklar veya PHA ile yapılan aktivasyondan sonra T hücre alt popülasyonları incelenmiş ve PHA aktivasyonuna sahip hücrelerde **TemEARLY** hücre popülasyonu oldukça yüksek olduğu görülmüştür. TemEARLY hücre popülasyonunun fazla olması, PHA uyarımı ile yüksek oranda tükenmemiş bellek hücresi olduğu anlamına gelmektedir. TemEARLY hücreleri çeşitli efektör fonksiyonlara sahiptir ve hedef dokularda etkinliği baskındır. **TemEARLY** hücreleri, efektör fonksiyonlara ve uzun ömre sahip oldukları için otoimmün hastalıkların sürekliliğine neden olabilmektedir. Kalıcı antijen, kronik enfeksiyonların çalışmalarında gösterildiği gibi TEM hücre popülasyon oranını arttırmaktadır. Bu durum kendiliğinden antijenlerin sürekli olduğu otoimmün hastalıklar bağlamında da geçerlidir (Devarajan & Chen, 2013).

PHA ile aktivasyon sonrası TemEARLY hücreleri, CAR-T hücrelerinin bellek hücreleri olarak daha uzun süre hastanın kanında kalması ve nükseden kansere karşı önemli bir savunma mekanizması sağlayabileceği tez kapsamında yapılan *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar sonucunda düşündürmektedir (Gulden vd., 2023; Sert vd., 2023).

TemEARLY hücrelerinin PHA ile aktive edilerek önemi, CAR-T hücresi uygulaması sonrasında CAR-T hücrelerinin hafıza hücreleri olarak hastanın kanında daha uzun süre kaldığını ve kanserin tekrarlama durumu önemli bir savunma mekanizması olduğunu göstermektedir. TemEARLY hücrelerinin yüksek sayısının yanı sıra, bir diğer önemli bulgu da TEMRA ve TemLATE hücre popülasyonlarının anti-CD3/anti-CD28 stimülasyonuna kıyasla PHA ile daha az olmasıdır. Bu sonuçlar, PHA'ın T hücre alt popülasyonlarını hafıza özelliği gösteren hücrelere yönlendirmesi hipotezini desteklemektedir. CAR-T hücre tedavisi sonrasında, hafıza hücreleri, zamana bağlı etkinlik ve stabilite açısından büyük önem taşımaktadır.

Anti-CD3/anti-CD28 veya PHA ile CD4+ veya CD8+ hücre popülasyonlarında TSCM oranları arasında anlamlı fark olmamasına karşın PHA ve geleneksel yöntem kıyasında CD+8 hücreler arasında anlamlı ölçüde fark gözlemlenmiştir. PHA aktive hücrelerde TSCM oranı daha yüksek bulunmuştur. CAR1928-T hücrelerindeki CD4+CAR+TSCM ve CD8+CRCA+TSCM oranlarına bakıldığında CD8+CAR+TSCM popülasyonun biraz daha fazla olduğu görülmüştür. Bu veriler, PHA ile aktive edilen hücrelerin anti-CD3/anti-CD28 aktivasyonuna kıyasla daha çok erken bellek hücresine farklılaştığını göstermektedir.

Ayrıca anti-CD3/anti-CD28 veya PHA'nın çeşitli CAR yapılarına bağlı olarak herhangi bir önemli fark yaratıp yaratamayacağını analiz etmek için iki farklı CAR yapısını farklı varyasyonlarla birbirleriyle karşılaştırarak değerlendirilmiştir. Toplam CD4+ ve CD8+ T hücre grupları karşılaştırıldığında PHA ile aktivasyon sonrasında hafıza hücrelerinin korunabildiği de gösterilmiştir. Ayrıca sonuçlar, hücrelerin tükenmiş profilden önemli ölçüde uzakta olduğunu da göstermektedir. Bu durum, anti-kanser çalışmalarında CAR1928 veya CAR19BB hücrelerini eksprese eden T hücrelerinin, özellikle anti-CD3/anti-CD28 reaktivasyonu ile neden daha yüksek anti-kanser kapasitesi gösterdiğini de açıklayabilmektedir.

Anti-kanser sonuçlarına bakıldığında, ikinci aktivasyonla üretilen CAR-T hücrelerinin anti-kanser aktivitelerini büyük ölçüde kaybettiğini gösterse de, bu, yeniden aktivasyonun, PHA ile aktive CAR-T hücreleri için tercih edilen hücre öldürme yolu olmayabileceği anlamına gelebilir. Bu, anti-CD3/anti-CD28 ile karşılaştırıldığında PHA ile ilk aktivasyonda CAR lentivirüslerinin eklenmesiyle T hücrelerinin transdüksiyona tabi tutulabileceğini gösteren ilk sonuç olup, anti-CD3/anti-CD28 mikro boncuklarının yerini alacak yeni bir alternatif CAR-T üretim süreci geliştirmenin önünü açmaktadır.

PHA ile CAR-T hücre üretiminin, geleneksel aktive etme yöntemi olan anti-CD3/anti-CD28 ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerinde hiçbir olumsuz etkisi gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, CAR-T hücre üretiminde anti-CD3/anti-CD28 mikroboncuklarına alternatif olarak PHA reaktifinin kullanılması gelecekteki çalışmalar için paralel bir araştırma konusu olabilir. Ayrıca reaktivasyon sonrasında transdüksiyonla CAR ifadesinin istenilen oranda artırılabilmesini de gösterilmiştir. Sonuç olarak, PHA ile CAR-T hücre üretiminin, anti-CD3/anti-CD28 aktivasyonunda elde edilen CAR-T hücre çoğalmasına benzer/daha iyi bir çoğalma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir.

Bunu takiben, anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilmiş CAR-T hücrelerine kıyasla PHA ile aktive edilmiş CAR-T hücrelerinin TCM-TSCM hafıza hücre oranlarında ve anti-kanser aktivitesinde artış gözlemlenmiştir.

Bununla beraber, ALL hasta kohort T hücrelerinden üretilen *in vivo* hayvan çalışmalarının veya *ex vivo* CAR-T hücrelerinin anti-kanser kapasitesinin daha kapsamlı olması gerektiği düşünülmüştür. Bu nedenle ALL hayvan modelinde PHA ile üretilen CAR-T hücrelerini kullanılarak *in vivo* anti-kanser çalışması yapılmıştır. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar ile, PHA ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin, anti-CD3 ve anti-CD28 ile aktive edilen CAR-T hücrelerine kıyasla daha yüksek stabilite ve anti-kanser etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu bulgular, CAR-T hücre popülasyonlarında yüksek oranda merkezi bellek T hücrelerinin (TCM) ve kök hücre benzeri bellek T hücrelerinin (TSCM), sürekli proliferasyon ve uzun süreli tedavi dahil olmak üzere etkili immünoterapi için gerekli olduğunu gösteren önceki literatür çalışmaları ile uyumludur (Blaeschke vd., 2016, 2018).

Yapılan *in vivo* çalışma ve değerlendirme, CAR19BB-T (PHA) ve CAR19BB-T (anti-CD3&anti-CD28) gruplarının hem biyoluminesans hem de mCherry floresans kanallarında CD19+ ALL modeli RAJI kanseri gelişiminin baskılandığını göstermiştir. **Tez çalışması kapsamında**, öncelikle farklı aktivasyon yöntemlerini aynı CAR yapısı ile karşılaştırırken, CAR1928 yapısı ile Fitohemaglutinin (PHA) aktivasyonunun uygulanmasına ilişkin daha fazla araştırma potansiyelini kabul ettiğimizi belirtmekte fayda bulunmaktadır. PHA'nın klinik uygulanabilirliğini desteklemek için Morgan ve ark. (L. R. Morgan vd., 1993) klinik çalışmalarda PHA ile uyarılan/aktifleştirilen otolog lenfositlerle başarılı sonuçlar bildirmiş, bunun düşük toksisitesini ve immünoterapi uygulamalarındaki klinik potansiyelini vurgulamıştır. Ayrıca, anti-CD3&anti-CD28 ile üretilen CAR-T hücrelerinin aksine, CAR-T hücre oranlarında bir azalmanın gözlemlendiği CAR-T hücrelerinin aksine, iki aylık çalışma süresi boyunca CAR19BB-T (PHA) varlığı herhangi bir azalma olmadan korunmuştur (Lee vd., 2015; Maude, Barrett, vd., 2014; Maude, Frey, vd., 2014).

Diğer yandan anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilerek üretilen CAR19BB-T hücrelerinin uygulandığı gruplarda kanserin baskılanmasını takiben CAR-T hücre oranının azaldığı ve kanserin tekrar nüksettiği tespit edilmiştir.

Her ne kadar bu CAR-T hücreleri nüksetmeyle beraber çoğalmaya başlamışsa da, PHA ile aktive edilen CAR19BB-T hücreleri hiçbir azalma göstermemiş olup kanser relapsını geciktirdiğini de düşündürmektedir. Ayrıca, PBMC'nin uyarlayıcı transferi ile klinik çalışmalarda PHA'nın kullanımı belgelenmiştir (L. R. Morgan vd., 1993). Bu, PHA'nın adaptif hücre tedavilerinde immün sistemi uyarıcı bir ajan olarak potansiyelini ortaya koymakta ve tez kapsamındaki bulguları daha da desteklemektedir. Bu tez kapsamında, akut lenfoblastik lösemide (ALL) terapötik etkinliğini arttırmayı amaçlayan CAR-T hücrelerinin aktivasyonu ve genişlemesi için PHA'nın immün sistemi uyarıcı potansiyelinden yararlanılmıştır. Bulgular, PHA ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin dikkat çekici stabilitesini ve anti-kanser etkinliğini gösterirken, PHA'nın indüklediği T hücresi genişlemesiyle ilişkili zorluklara ışık tutan önceki araştırmaları da kabul etmek önemlidir (Duarte vd., 2002). PHA'nın indüklediği genişleme ve retroviral transdüksiyonu takiben insan T lenfositlerindeki fonksiyonel bozulmayı araştıran ve gen terapisine yönelik çıkarımları araştıran çok önemli bir çalışma yayınlamıştır. Bu araştırma, PHA bazlı yöntemlerin T hücresi işlevselliği üzerindeki etkisini dikkatle değerlendirmenin önemini vurgulamıştır. Tez kapsamında elde edilen bulgular, PHA'nın CAR-T hücre performansını artırma potansiyelini ortaya koyarken, PHA'nın neden olduğu genişlemeyle ilişkili potansiyel sınırlamalar ve işlevsel değişiklikler konusunda ayrıntılı çalışmalar yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle PHA aktivasyonu, CAR-T hücre etkinliği ve potansiyel fonksiyonel değişiklikler arasındaki etkileşime ilişkin daha fazla araştırmanın önemini vurgulanmıştır. Bu yönleri ele alarak klinik uygulama için güvenli ve etkili CAR-T hücre tedavilerinin geliştirilmesini sağlayabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca, Kaplan-Meier hayatta kalma analizi, CAR-T hücre tedavisinin, tek tümör grubuyla karşılaştırıldığında tedavi edilen fare gruplarında daha uzun genel hayatta kalma süresine yol açtığını ortaya çıkarmıştır. Bu sonuç, CAR-T hücre tedavisinin potansiyel terapötik faydalarına işaret etmektedir. Spesifik LTR hedefli RT-PCR analizi, tedavi edilen gruplarda CAR-T hücrelerinin varlığını doğrulamıştır. Elde edilen sonuç ile, CAR19BB-T (PHA) grubunda, üretilen anti-CD3&anti-CD28 ile aktive edilen CAR19BB-T hücrelerini alan gruplarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek seviyeler gözlemlenmiştir. Bu, PHA ile aktive edilen CAR19BB-T hücrelerinin daha yüksek stabilite ve kalıcılık sergilediğini ve bunların kanser tedavisi için geçerli bir immünoterapötik yaklaşım olma potansiyelini desteklediğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında alınan sonuçlar, *in vitro* ve *in vivo* modellerde stabiliteyi ve kanser karşıtı etkinliği arttırmak amacıyla CAR-T hücre üretimi için PHA gibi uygun aktivasyon yöntemlerinin seçilmesinin önemini göstermektedir. Bu tez ile elde edilen sonuçlarla, PHA ile üretilen CAR-T hücrelerinin hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalar ile uzun süreli kalıcılık ve etkili anti-kanser kapasitesine sahip olabileceği; PHA aktivasyonunun, daha yüksek oranda merkezi bellek T hücreleri (TCM) ve kök hücre benzeri bellek T hücrelerini (TSCM) arttırdığı; PHA ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin, anti-CD3/anti-CD28 ile aktive edilenlerle karşılaştırılabilir CAR ekspresyon seviyeleri elde edildiği; bu da PHA'nın alternatif bir aktivasyon yöntemi olarak potansiyeli olduğu gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ile, CAR-T hücre tedavisini optimize etmek ve kanser tedavisine yönelik klinik uygulamalara dönüştürmek için değerli veriler sağlayacağı düşünülmektedir. PHA ile aktive edilen CAR-T hücrelerinin kullanımının, klinikte kansere karşı daha etkili ve kalıcı immünoterapötik stratejilerin geliştirilmesi için umut vaat edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abate-Daga, D., Lagisetty, K. H., Tran, E., Zheng, Z., Gattinoni, L., Yu, Z., Burns, W. R., Miermont, A. M., Teper, Y., Rudloff, U., Restifo, N. P., Feldman, S. A., Rosenberg, S. A., & Morgan, R. A. (2014). A novel chimeric antigen receptor against prostate stem cell antigen mediates tumor destruction in a humanized mouse model of pancreatic cancer. *Human Gene Therapy*, 25(12). <https://doi.org/10.1089/hum.2013.209>
- Abramson, J. S., Palomba, M. L., Gordon, L. I., Lunning, M. A., Wang, M., Arnason, J., Mehta, A., Purev, E., Maloney, D. G., Andreadis, C., Sehgal, A., Solomon, S. R., Ghosh, N., Albertson, T. M., Garcia, J., Kostic, A., Mallaney, M., Ogasawara, K., Newhall, K., ... Siddiqi, T. (2020). Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *The Lancet*, 396(10254). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31366-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31366-0)
- Acute Lymphocytic Leukemia — Cancer Stat Facts*. (t.y.). Geliş tarihi 17 Şubat 2024, gönderen <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/alyl.html>
- Acuto, O., & Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: A quantitative support for TCR signalling. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 3, Sayı 12). <https://doi.org/10.1038/nri1248>
- Ahmad, A., Haneef, M., Khan, S., Khan, F., Ahmad, N., Khan, S., & Jaswani, S. (2023). CAR T-cell immunotherapy: A safe and potent living drug technique for cancer treatment (Review). *World Academy of Sciences Journal*, 5(4). <https://doi.org/10.3892/wasj.2023.200>
- Ahmed, R., Roger, L., Costa del Amo, P., Miners, K. L., Jones, R. E., Boelen, L., Fali, T., Elemans, M., Zhang, Y., Appay, V., Baird, D. M., Asquith, B., Price, D. A., Macallan, D. C., & Ladell, K. (2016). Human Stem Cell-like Memory T Cells Are Maintained in a State of Dynamic Flux. *Cell Reports*, 17(11). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.037>
- Ajina, A., & Maher, J. (2018). Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling. İçinde *Molecular Cancer Therapeutics* (C. 17, Sayı 9). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1097>
- Akbar, A. N., Timms, A., & Janossy, G. (1989). Cellular events during memory T-cell activation in vitro: the UCHL1 (180,000 MW) determinant is newly synthesized after mitosis. *Immunology*, 66(2).
- Akondy, R. S., Fitch, M., Edupuganti, S., Yang, S., Kissick, H. T., Li, K. W., Youngblood, B. A., Abdelsamed, H. A., McGuire, D. J., Cohen, K. W., Alexe, G., Nagar, S., McCausland, M. M., Gupta, S., Tata, P., Haining, W. N., McElrath, M. J., Zhang, D., Hu, B., ... Ahmed, R. (2017). Origin and differentiation of human

- memory CD8 T cells after vaccination. *Nature*, 552(7685). <https://doi.org/10.1038/nature24633>
- Almåsbaek, H., Walseng, E., Kristian, A., Myhre, M. R., Suso, E. M., Munthe, L. A., Andersen, J. T., Wang, M. Y., Kvalheim, G., Gaudernack, G., & Kyte, J. A. (2015). Inclusion of an IgG1-Fc spacer abrogates efficacy of CD19 CAR T cells in a xenograft mouse model. *Gene Therapy*, 22(5). <https://doi.org/10.1038/gt.2015.4>
- Alvarez-Fernández, C., Escribà-Garcia, L., Vidal, S., Sierra, J., & Briones, J. (2016). A short CD3/CD28 costimulation combined with IL-21 enhance the generation of human memory stem T cells for adoptive immunotherapy. *Journal of Translational Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0973-y>
- Alves, C. C., Terziyska, N., Grunert, M., Gündisch, S., Graubner, U., Quintanilla-Martinez, L., & Jeremias, I. (2012). Leukemia-initiating cells of patient-derived acute lymphoblastic leukemia xenografts are sensitive toward TRAIL. *Blood*, 119(18). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-370114>
- Ammirati, E., Cianflone, D., Vecchio, V., Banfi, M., Vermi, A. C., De Metrio, M., Grigore, L., Pellegatta, F., Pirillo, A., Garlaschelli, K., Manfredi, A. A., Catapano, A. L., Maseri, A., Palini, A. G., & Norata, G. D. (2012). Effector memory T cells are associated with atherosclerosis in humans and animal models. *Journal of the American Heart Association*, 1(1). <https://doi.org/10.1161/JAHA.111.000125>
- Anderson, A. C., Joller, N., & Kuchroo, V. K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *İçinde Immunity* (C. 44, Sayı 5). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>
- Ando, M., Ito, M., Srirat, T., Kondo, T., & Yoshimura, A. (2020). Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. *İçinde Immunological Medicine* (C. 43, Sayı 1). <https://doi.org/10.1080/25785826.2019.1698261>
- Ansell, S. M., Lesokhin, A. M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E. C., Gutierrez, M., Schuster, S. J., Millenson, M. M., Cattry, D., Freeman, G. J., Rodig, S. J., Chapuy, B., Ligon, A. H., Zhu, L., Grosso, J. F., Kim, S. Y., Timmerman, J. M., Shipp, M. A., & Armand, P. (2015). PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 372(4). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1411087>
- Aparicio, C., Acebal, C., & González-Vallinas, M. (2023). Current approaches to develop “off-the-shelf” chimeric antigen receptor (CAR)-T cells for cancer treatment: a systematic review. *İçinde Experimental Hematology and Oncology* (C. 12, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00435-w>
- Aparicio, S., Hidalgo, M., & Kung, A. L. (2015). Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *İçinde Nature Reviews Cancer* (C. 15, Sayı 5). <https://doi.org/10.1038/nrc3944>
- Ardouin, L., Boyer, C., Gillet, A., Trucy, J., Bernard, A. M., Nunes, J., Delon, J., Trautmann, A., Hai-Tao, H., Malissen, B., & Malisen, M. (1999). Crippling of CD3-

- ζ ITAMs does not impair T cell receptor signaling. *Immunity*, 10(4). [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80041-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80041-2)
- Bagnara, D., Kaufman, M. S., Calissano, C., Marsilio, S., Patten, P. E. M., Simone, R., Chum, P., Yan, X. J., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Baskar, S., Rader, C., Mellstedt, H., Rabbani, H., Lee, A., Gregersen, P. K., Rai, K. R., & Chiorazzi, N. (2011). A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood*, 117(20). <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324210>
- Bai, Y., Kan, S., Zhou, S., Wang, Y., Xu, J., Cooke, J. P., Wen, J., & Deng, H. (2015). Enhancement of the in vivo persistence and antitumor efficacy of CD19 chimeric antigen receptor T cells through the delivery of modified TERT mRNA. *Cell Discovery*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/CELLDISC.2015.40>
- Bailey, S. R., Berger, T. R., Graham, C., Larson, R. C., & Maus, M. V. (2023). Four challenges to CAR T cells breaking the glass ceiling. İçinde *European Journal of Immunology* (C. 53, Sayı 11). <https://doi.org/10.1002/eji.202250039>
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., & Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077). <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- Barski, A., Cuddapah, S., Kartashov, A. V., Liu, C., Imamichi, H., Yang, W., Peng, W., Lane, H. C., & Zhao, K. (2017). Rapid Recall Ability of Memory T cells is Encoded in their Epigenome. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep39785>
- Benmebarek, M. R., Karches, C. H., Cadilha, B. L., Lesch, S., Endres, S., & Kobold, S. (2019). Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 20, Sayı 6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061283>
- Bennett, S. R. M., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. A. P., & Heath, W. R. (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *Journal of Experimental Medicine*, 186(1). <https://doi.org/10.1084/jem.186.1.65>
- Berger, C., Jensen, M. C., Lansdorp, P. M., Gough, M., Elliott, C., & Riddell, S. R. (2008). Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *Journal of Clinical Investigation*, 118(1). <https://doi.org/10.1172/JCI32103>
- Bettini, M. L., Chou, P.-C., Guy, C. S., Lee, T., Vignali, K. M., & Vignali, D. A. A. (2017). Cutting Edge: CD3 ITAM Diversity Is Required for Optimal TCR Signaling and Thymocyte Development. *The Journal of Immunology*, 199(5). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700069>
- Biasco, L., Izotova, N., Rivat, C., Ghorashian, S., Richardson, R., Guvenel, A., Hough, R., Wynn, R., Popova, B., Lopes, A., Pule, M., Thrasher, A. J., & Amrolia, P. J. (2021). Clonal expansion of T memory stem cells determines early anti-leukemic

- responses and long-term CAR T cell persistence in patients. *Nature Cancer*, 2(6). <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00207-7>
- Blaeschke, F., Kaeuferle, T., Feucht, J., Weber, D., Lotfi, R., Kaiser, A., Assenmacher, M., Doering, M., & Feuchtinger, T. (2016). Defined Central Memory and Stem Memory T Cell Phenotype of CD4 and CD8 CAR T Cells for the Treatment of CD19+ Acute Lymphoblastic Leukemia in an Automated Closed System. *Blood*, 128(22). <https://doi.org/10.1182/blood.v128.22.4558.4558>
- Blaeschke, F., Stenger, D., Kaeuferle, T., Willier, S., Lotfi, R., Kaiser, A. D., Assenmacher, M., Döring, M., Feucht, J., & Feuchtinger, T. (2018). Induction of a central memory and stem cell memory phenotype in functionally active CD4+ and CD8+ CAR T cells produced in an automated good manufacturing practice system for the treatment of CD19+ acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(7), 1053-1066. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2155-7>
- Blank, C. U., Haining, W. N., Held, W., Hogan, P. G., Kallies, A., Lugli, E., Lynn, R. C., Philip, M., Rao, A., Restifo, N. P., Schietinger, A., Schumacher, T. N., Schwartzberg, P. L., Sharpe, A. H., Speiser, D. E., Wherry, E. J., Youngblood, B. A., & Zehn, D. (2019). Defining 'T cell exhaustion'. *Nature Reviews Immunology*, 19(11). <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0221-9>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S33-S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Boomer, J. S., & Green, J. M. (2010). An enigmatic tail of CD28 signaling. İçinde *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (C. 2, Sayı 8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002436>
- Bos, R., & Sherman, L. A. (2010). CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Research*, 70(21). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1322>
- Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., Borquez-Ojeda, O., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Bernal, Y., Rijo, I. V., Hedvat, C., Kobos, R., Curran, K., ... Sadelain, M. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine*, 5(177). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005930>
- Brentjens, R. J., Santos, E., Nikhamin, Y., Yeh, R., Matsushita, M., La Perle, K., Quintás-Cardama, A., Larson, S. M., & Sadelain, M. (2007). Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clinical Cancer Research*, 13(18). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0674>
- Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Bagley, S., Blaylock, M., Holland, M., & Gilham, D. E. (2010). The Optimal Antigen Response of Chimeric Antigen Receptors Harboring the CD3ζ Transmembrane Domain Is Dependent upon Incorporation of the Receptor

- into the Endogenous TCR/CD3 Complex. *The Journal of Immunology*, 184(12). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901766>
- Brocker, T. (2000). Chimeric Fv- ζ or Fv- ϵ receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*, 96(5). https://doi.org/10.1182/blood.v96.5.1999.h8001999_1999_2001
- Brudno, J. N., & Kochenderfer, J. N. (2018). Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. İçinde *Nature Reviews Clinical Oncology* (C. 15, Sayı 1). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.128>
- Brudno, J. N., Lam, N., Vanasse, D., Shen, Y. wei, Rose, J. J., Rossi, J., Xue, A., Bot, A., Scholler, N., Mikkilineni, L., Roschewski, M., Dean, R., Cachau, R., Youkharibache, P., Patel, R., Hansen, B., Stroncek, D. F., Rosenberg, S. A., Gress, R. E., & Kochenderfer, J. N. (2020). Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma. *Nature Medicine*, 26(2). <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0737-3>
- Brummelman, J., Pilipow, K., & Lugli, E. (2018). The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8 + and CD4 + T Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 341. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.007>
- Bulfone-Paus, S., Ungureanu, D., Pohl, T., Lindner, G., Paus, R., Rückert, R., Krause, H., & Kunzendorf, U. (1997). Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nature Medicine*, 3(10). <https://doi.org/10.1038/nm1097-1124>
- Busch, D. H., Fräßle, S. P., Sommermeyer, D., Buchholz, V. R., & Riddell, S. R. (2016). Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. İçinde *Seminars in Immunology* (C. 28, Sayı 1). <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.02.001>
- Cai, B., Guo, M., Wang, Y., Zhang, Y., Yang, J., Guo, Y., Dai, H., Yu, C., Sun, Q., Qiao, J., Hu, K., Zuo, H., Dong, Z., Zhang, Z., Feng, M., Li, B., Sun, Y., Liu, T., Liu, Z., ... Ai, H. (2016). Co-infusion of haplo-identical CD19-chimeric antigen receptor T cells and stem cells achieved full donor engraftment in refractory acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0357-z>
- Camerini, D., Walz, G., Loenen, W. A., Borst, J., & Seed, B. (1991). The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *The Journal of Immunology*, 147(9). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.147.9.3165>
- Cao, Y., Lu, W., Sun, R., Jin, X., Cheng, L., He, X., Wang, L., Yuan, T., Lyu, C., & Zhao, M. (2019). Anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in combination with nivolumab are safe and effective against relapsed/refractory B-cell non-hodgkin lymphoma. *Frontiers in Oncology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00767>
- Cappell, K. M., & Kochenderfer, J. N. (2021). A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains. İçinde *Nature*

- Reviews Clinical Oncology* (C. 18, Sayı 11). <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00530-z>
- Caramalho, Í., Nunes-Cabaço, H., Foxall, R. B., & Sousa, A. E. (2015). Regulatory T-cell development in the human thymus. İçinde *Frontiers in Immunology* (C. 6, Sayı JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00395>
- Carpenito, C., Milone, M. C., Hassan, R., Simonet, J. C., Lakhai, M., Suhoski, M. M., Varela-Rohena, A., Haines, K. M., Heitjan, D. F., Albelda, S. M., Carroll, R. G., Riley, J. L., Pastan, I., & June, C. H. (2009). Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.0813101106>
- Caruso, H. G., Hurton, L. V., Najjar, A., Rushworth, D., Ang, S., Olivares, S., Mi, T., Switzer, K., Singh, H., Huls, H., Lee, D. A., Heimberger, A. B., Champlin, R. E., & Cooper, L. J. N. (2015). Tuning sensitivity of CAR to EGFR density limits recognition of normal tissue while maintaining potent antitumor activity. *Cancer Research*, 75(17). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0139>
- Casas, J., Brzostek, J., Zarnitsyna, V. I., Hong, J. S., Wei, Q., Hoerter, J. A. H., Fu, G., Ampudia, J., Zamoyska, R., Zhu, C., & Gascoigne, N. R. J. (2014). Ligand-engaged TCR is triggered by Lck not associated with CD8 coreceptor. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6624>
- Chailyan, A., Marcatili, P., & Tramontano, A. (2011). The association of heavy and light chain variable domains in antibodies: Implications for antigen specificity. *FEBS Journal*, 278(16). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08207.x>
- Chan, J. D., Lai, J., Slaney, C. Y., Kallies, A., Beavis, P. A., & Darcy, P. K. (2021). Cellular networks controlling T cell persistence in adoptive cell therapy. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 21, Sayı 12). <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00539-6>
- Chang, J. T., Palanivel, V. R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A. M., Banerjee, A., Longworth, S. A., Vinup, K. E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J. S., Russell, S. M., Weninger, W., & Reiner, S. L. (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*, 315(5819). <https://doi.org/10.1126/science.1139393>
- Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Tang, C., Jan, M., Weissman-Tsukamoto, R., Zhao, F., Park, C. Y., Weissman, I. L., & Majeti, R. (2011). Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research*, 71(4). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2238>
- Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Tang, C., Myklebust, J. H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A. C., Chan, C. K., Tan, B. T., Park, C. Y., Zhao, F., Kohrt, H. E., Malumbres, R., Briones, J., Gascoyne, R. D., Lossos, I. S., Levy, R., Weissman, I. L., & Majeti, R. (2010). Anti-CD47 Antibody Synergizes with Rituximab to Promote

- Phagocytosis and Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma. *Cell*, 142(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.044>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunological memory*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27158/>
- Chen, X., Song, X., Li, K., & Zhang, T. (2019). FC γ -binding is an important functional attribute for immune checkpoint antibodies in cancer immunotherapy. *İçinde Frontiers in Immunology* (C. 10, Sayı FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00292>
- Cherkassky, L., Morello, A., Villena-Vargas, J., Feng, Y., Dimitrov, D. S., Jones, D. R., Sadelain, M., & Adusumilli, P. S. (2016). Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *Journal of Clinical Investigation*, 126(8). <https://doi.org/10.1172/JCI83092>
- Chihara, N., Madi, A., Kondo, T., Zhang, H., Acharya, N., Singer, M., Nyman, J., Marjanovic, N. D., Kowalczyk, M. S., Wang, C., Kurtulus, S., Law, T., Etminan, Y., Nevin, J., Buckley, C. D., Burkett, P. R., Buenrostro, J. D., Rozenblatt-Rosen, O., Anderson, A. C., ... Kuchroo, V. K. (2018). Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature*, 558(7710). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0206-z>
- Chmielewski, M., & Abken, H. (2015). TRUCKs: The fourth generation of CARs. *İçinde Expert Opinion on Biological Therapy* (C. 15, Sayı 8). <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1046430>
- Chmielewski, M., Hombach, A. A., & Abken, H. (2013). Antigen-specific T-cell activation independently of the MHC: Chimeric antigen receptor-redirected T cells. *Frontiers in Immunology*, 4(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00371>
- Clark, R. A. (2010). Skin-resident T cells: The ups and downs of on site immunity. *İçinde Journal of Investigative Dermatology* (C. 130, Sayı 2). <https://doi.org/10.1038/jid.2009.247>
- Cohen, I. R. (2014). Activation of benign autoimmunity as both tumor and autoimmune disease immunotherapy: A comprehensive review. *İçinde Journal of Autoimmunity* (C. 54). <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.05.002>
- Cossarizza, A., Ortolani, C., Paganelli, R., Barbieri, D., Monti, D., Sansoni, P., Fagiolo, U., Castellani, G., Bersani, F., Londei, M., & Franceschi, C. (1996). CD45 isoforms expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells throughout life, from newborns to centenarians: Implications for T cell memory. *Mechanisms of Ageing and Development*, 86(3). [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(95\)01691-0](https://doi.org/10.1016/0047-6374(95)01691-0)
- Courtney, A. H., Lo, W. L., & Weiss, A. (2018). TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *İçinde Trends in Biochemical Sciences* (C. 43, Sayı 2). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.008>

- Croft, M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 9, Sayı 4). <https://doi.org/10.1038/nri2526>
- Crompton, J. G., Narayanan, M., Cuddapah, S., Roychoudhuri, R., Ji, Y., Yang, W., Patel, S. J., Sukumar, M., Palmer, D. C., Peng, W., Wang, E., Marincola, F. M., Klebanoff, C. A., Zhao, K., Tsang, J. S., Gattinoni, L., & Restifo, N. P. (2016). Lineage relationship of CD8⁺ T cell subsets is revealed by progressive changes in the epigenetic landscape. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(4). <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.32>
- Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. İçinde *Cell Death and Differentiation* (C. 15, Sayı 2). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402244>
- Curtsinger, J. M., Schmidt, C. S., Mondino, A., Lins, D. C., Kedl, R. M., Jenkins, M. K., & Mescher, M. F. (1999). Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4⁺ and CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*, 162(6). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.6.3256>
- Darcy, P. K., Kershaw, M. H., Trapani, J. A., & Smyth, M. J. (1998). Expression in cytotoxic T lymphocytes of a single-chain anti-carcinoembryonic antigen antibody. Redirected Fas ligand-mediated lysis of colon carcinoma. *European Journal of Immunology*, 28(5). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199805\)28:05<1663::AID-IMMU1663>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1663::AID-IMMU1663>3.0.CO;2-L)
- Davenport, A. J., Jenkins, M. R., Cross, R. S., Yong, C. S., Prince, H. M., Ritchie, D. S., Trapani, J. A., Kershaw, M. H., Darcy, P. K., & Neeson, P. J. (2015). CAR-T cells inflict sequential killing of multiple tumor target cells. *Cancer Immunology Research*, 3(5). <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0048>
- Davis, M. M., & Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. İçinde *Nature* (C. 334, Sayı 6181). <https://doi.org/10.1038/334395a0>
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E. J., Coovadia, H. M., Goulder, P. J. R., Klennerman, P., ... Walker, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443(7109). <https://doi.org/10.1038/nature05115>
- de Jong, R., Brouwer, M., Hooibrink, B., van der Pouw-Kraan, T., Miedema, F., & van Lier, R. A. W. (1992). The CD27⁻ subset of peripheral blood memory CD4⁺ lymphocytes contains functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo. *European Journal of Immunology*, 22(4). <https://doi.org/10.1002/eji.1830220418>
- De Marco, R. C., Monzo, H. J., & Ojala, P. M. (2023). CAR T Cell Therapy: A Versatile Living Drug. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 24, Sayı 7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076300>

- Defining an exhaustion-like program that restrains autoreactive CD8⁺ T cells. (2022). *Nature Immunology*, 23(6). <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01211-4>
- den Braber, I., Mugwagwa, T., Vrisekoop, N., Westera, L., Mögling, R., Bregje de Boer, A., Willems, N., Schrijver, E. H. R., Spierenburg, G., Gaiser, K., Mul, E., Otto, S. A., Ruiter, A. F. C., Ackermans, M. T., Miedema, F., Borghans, J. A. M., de Boer, R. J., & Tesselaar, K. (2012). Maintenance of Peripheral Naive T Cells Is Sustained by Thymus Output in Mice but Not Humans. *Immunity*, 36(2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.006>
- Deng, S., Sun, Z., Qiao, J., Liang, Y., Liu, L., Dong, C., Shen, A., Wang, Y., Tang, H., Fu, Y. X., & Peng, H. (2020). Targeting tumors with IL-21 reshapes the tumor microenvironment by proliferating PD-1^{int}Tim-3-CD8⁺ T cells. *JCI Insight*, 5(7). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.132000>
- Dermani, F. K., Samadi, P., Rahmani, G., Kohlan, A. K., & Najafi, R. (2019). PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. İçinde *Journal of Cellular Physiology* (C. 234, Sayı 2). <https://doi.org/10.1002/jcp.27172>
- Devarajan, P., & Chen, Z. (2013). Autoimmune effector memory T cells: The bad and the good. *Immunologic Research*, 57(1-3). <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8448-1>
- Dolina, J. S., Van Braeckel-Budimir, N., Thomas, G. D., & Salek-Ardakani, S. (2021). CD8⁺ T Cell Exhaustion in Cancer. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.715234/PDF>
- Dotti, G., Savoldo, B., & Brenner, M. (2009). Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: Are we nearly there yet? İçinde *Human Gene Therapy* (C. 20, Sayı 11). <https://doi.org/10.1089/hum.2009.142>
- Duarte, R. F., Chen, F. E., Lowdell, M. W., Potter, M. N., Lamana, M. L., Prentice, H. G., & Madrigal, J. A. (2002). Functional impairment of human T-lymphocytes following PHA-induced expansion and retroviral transduction: Implications for gene therapy. *Gene Therapy*, 9(20), 1359-1368. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301807>
- Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A., & Tagaya, Y. (2002). IL-15R α recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*, 17(5). [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00429-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00429-6)
- Dufva, O., Koski, J., Maliniemi, P., Ianevski, A., Klievink, J., Leitner, J., Pölönen, P., Hohtari, H., Saeed, K., Hannunen, T., Ellonen, P., Steinberger, P., Kankainen, M., Aittokallio, T., Keränen, M. A. I., Korhonen, M., & Mustjoki, S. (2020). Integrated drug profiling and CRISPR screening identify essential pathways for CAR T-cell cytotoxicity. *Blood*, 135(9). <https://doi.org/10.1182/blood.2019002121>
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal of Virology*, 72(11). <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.8463-8471.1998>

- Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., & Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nature Genetics*, 41(9). <https://doi.org/10.1038/ng.428>
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., & Schindler, D. G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the γ or ζ subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.720>
- Faguet, G. B. (1977). Mechanisms of Lymphocyte Activation BINDING KINETICS OF PHYTOHEMAGGLUTININ TO HUMAN LYMPHOCYTES*. İçinde *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (C. 252, Sayı 6).
- Fan, M., Li, M., Gao, L., Geng, S., Wang, J., Wang, Y., Yan, Z., & Yu, L. (2017). Chimeric antigen receptors for adoptive T cell therapy in acute myeloid leukemia. İçinde *Journal of Hematology and Oncology* (C. 10, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0519-7>
- Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2019). CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. İçinde *Journal of Cellular Physiology* (C. 234, Sayı 6). <https://doi.org/10.1002/jcp.27782>
- Fehniger, T. A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J. B., Cooper, M. A., Florea, S. M., Freud, A. G., Robinson, M. L., Durbin, J., & Caligiuri, M. A. (2001). Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 193(2). <https://doi.org/10.1084/jem.193.2.219>
- Feins, S., Kong, W., Williams, E. F., Milone, M. C., & Fraietta, J. A. (2019). An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *American Journal of Hematology*, 94(S1), S3-S9. <https://doi.org/10.1002/ajh.25418>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021a). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4). <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021b). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789. <https://doi.org/10.1002/IJC.33588>
- Feucht, J., Sun, J., Eyquem, J., Ho, Y. J., Zhao, Z., Leibold, J., Dobrin, A., Cabriolu, A., Hamieh, M., & Sadelain, M. (2019). Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. *Nature Medicine*, 25(1). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0290-5>
- Finney, H. M., Akbar, A. N., & Lawson, A. D. G. (2004). Activation of Resting Human Primary T Cells with Chimeric Receptors: Costimulation from CD28, Inducible

- Costimulator, CD134, and CD137 in Series with Signals from the TCR ζ Chain. *The Journal of Immunology*, 172(1). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.104>
- Finney, H. M., Lawson, A. D. G., Bebbington, C. R., & Weir, A. N. C. (1998). Chimeric Receptors Providing Both Primary and Costimulatory Signaling in T Cells from a Single Gene Product. *The Journal of Immunology*, 161(6). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.161.6.2791>
- Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. İçinde *Journal of the National Cancer Institute* (C. 59, Sayı 1). <https://doi.org/10.1093/jnci/59.1.221>
- Fraietta, J. A., Lacey, S. F., Orlando, E. J., Pruteanu-Malinici, I., Gohil, M., Lundh, S., Boesteanu, A. C., Wang, Y., O'connor, R. S., Hwang, W. T., Pequignot, E., Ambrose, D. E., Zhang, C., Wilcox, N., Bedoya, F., Dorfmeier, C., Chen, F., Tian, L., Parakandi, H., ... Melenhorst, J. J. (2018). Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nature Medicine*, 24(5). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0010-1>
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7). <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
- Frey, A. B. (2015). Suppression of T cell responses in the tumor microenvironment. *Vaccine*, 33(51). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.096>
- Frigault, M. J., Lee, J., Basil, M. C., Carpenito, C., Motohashi, S., Scholler, J., Kawalekar, O. U., Guedan, S., McGettigan, S. E., Posey, A. D., Ang, S., Cooper, L. J. N., Platt, J. M., Johnson, F. B., Paulos, C. M., Zhao, Y., Kalos, M., Milone, M. C., & June, C. H. (2015). Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. *Cancer Immunology Research*, 3(4). <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0186>
- Frumento, G., Verma, K., Croft, W., White, A., Zuo, J., Nagy, Z., Kissane, S., Anderson, G., Moss, P., & Chen, F. E. (2020). Homeostatic Cytokines Drive Epigenetic Reprogramming of Activated T Cells into a “Naive-Memory” Phenotype. *iScience*, 23(4). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100989>
- Fu, Q., Fu, T. M., Cruz, A. C., Sengupta, P., Thomas, S. K., Wang, S., Siegel, R. M., Wu, H., & Chou, J. J. (2016). Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor. *Molecular Cell*, 61(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.009>
- Fuertes Marraco, S. A., Soneson, C., Cagnon, L., Gannon, P. O., Allard, M., Maillard, S. A., Montandon, N., Rufer, N., Waldvogel, S., Delorenzi, M., & Speiser, D. E. (2015). Long-lasting stem cell-like memory CD8⁺ T cells with a naïve-like profile

- upon yellow fever vaccination. *Science Translational Medicine*, 7(282). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3700>
- Fujiwara, K., Tsunei, A., Kusabuka, H., Ogaki, E., Tachibana, M., & Okada, N. (2020). Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051182>
- Ganusov, V. V., & De Boer, R. J. (2007). Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends in Immunology*, 28(12). <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.08.009>
- Garlie, N. K., LeFever, A. V., Siebenlist, R. E., Levine, B. L., June, C. H., & Lum, L. G. (1999). T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and Anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer. *Journal of Immunotherapy*, 22(4). <https://doi.org/10.1097/00002371-199907000-00007>
- Gattinoni, L., Klebanoff, C. A., & Restifo, N. P. (2012). Paths to stemness: Building the ultimate antitumour T cell. İçinde *Nature Reviews Cancer* (C. 12, Sayı 10). <https://doi.org/10.1038/nrc3322>
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., Almeida, J. R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D. C., Price, D. A., June, C. H., Marincola, F. M., Roederer, M., & Restifo, N. P. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*, 17(10). <https://doi.org/10.1038/nm.2446>
- Gattinoni, L., Powell, D. J., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: Building on success. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 6, Sayı 5). <https://doi.org/10.1038/nri1842>
- Gaud, G., Lesourne, R., & Love, P. E. (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 18, Sayı 8). <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0020-8>
- Geginat, J., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2001). Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 194(12). <https://doi.org/10.1084/jem.194.12.1711>
- Geiger, T. L., Leitenberg, D., & Flavell, R. A. (1999). The TCR ζ -Chain Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motifs Are Sufficient for the Activation and Differentiation of Primary T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 162(10). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.10.5931>
- Germain, R. N. (2002). t-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 2, Sayı 5). <https://doi.org/10.1038/nri798>
- Ghassemi, S., Durgin, J. S., Nunez-Cruz, S., Patel, J., Leferovich, J., Pinzone, M., Shen, F., Cummins, K. D., Plesa, G., Cantu, V. A., Reddy, S., Bushman, F. D., Gill, S. I., O'Doherty, U., O'Connor, R. S., & Milone, M. C. (2022). Rapid manufacturing of

- non-activated potent CAR T cells. *Nature Biomedical Engineering*, 6(2). <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00842-6>
- Ghassemi, S., Nunez-Cruz, S., O'Connor, R. S., Fraietta, J. A., Patel, P. R., Scholler, J., Barrett, D. M., Lundh, S. M., Davis, M. M., Bedoya, F., Zhang, C., Leferovich, J., Lacey, S. F., Levine, B. L., Grupp, S. A., June, C. H., Melenhorst, J. J., & Milone, M. C. (2018). Reducing ex vivo culture improves the antileukemic activity of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Cancer Immunology Research*, 6(9). <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0405>
- Gil, D., & Schrum, A. G. (2013). Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 04(04). <https://doi.org/10.4236/abb.2013.44a011>
- Goardon, N., Marchi, E., Atzberger, A., Quek, L., Schuh, A., Soneji, S., Woll, P., Mead, A., Alford, K. A., Rout, R., Chaudhury, S., Gilkes, A., Knapper, S., Beldjord, K., Begum, S., Rose, S., Geddes, N., Griffiths, M., Standen, G., ... Vyas, P. (2011). Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 19(1). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.012>
- Gomes-Silva, D., Mukherjee, M., Srinivasan, M., Krenciute, G., Dakhova, O., Zheng, Y., Cabral, J. M. S., Rooney, C. M., Orange, J. S., Brenner, M. K., & Mamonkin, M. (2017). Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent. *Cell Reports*, 21(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.015>
- Gross, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.10024>
- Guedan, S., Chen, X., Madar, A., Carpenito, C., McGettigan, S. E., Frigault, M. J., Lee, J., Posey, A. D., Scholler, J., Scholler, N., Bonneau, R., & June, C. H. (2014). ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/ TH1 cells. *Blood*, 124(7). <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535245>
- Guedan, S., Madar, A., Casado-Medrano, V., Shaw, C., Wing, A., Liu, F., Young, R. M., June, C. H., & Posey, A. D. (2020). Single residue in CD28-costimulated CAR-T cells limits long-term persistence and antitumor durability. *Journal of Clinical Investigation*, 130(6). <https://doi.org/10.1172/JCI133215>
- Guest, R. D., Hawkins, R. E., Kirillova, N., Cheadle, E. J., Arnold, J., O'Neill, A., Irlam, J., Chester, K. A., Kemshead, J. T., Shaw, D. M., Embleton, M. J., Stern, P. L., & Gilham, D. E. (2005). The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: Evaluation of four different scFvs and antigens. *Journal of Immunotherapy*, 28(3). <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000161397.96582.59>
- Gulden, G., Sert, B., Teymur, T., Ay, Y., Tiryaki, N. N., Mishra, A. K., Ovali, E., Tarhan, N., & Tastan, C. (2023). CAR-T Cells with Phytohemagglutinin (PHA) Provide

- Anti-Cancer Capacity with Better Proliferation, Rejuvenated Effector Memory, and Reduced Exhausted T Cell Frequencies. *Vaccines*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/vaccines11020313>
- Guo, Y., Xie, Y. Q., Gao, M., Zhao, Y., Franco, F., Wenes, M., Siddiqui, I., Bevilacqua, A., Wang, H., Yang, H., Feng, B., Xie, X., Sabatel, C. M., Tschumi, B., Chaiboonchoe, A., Wang, Y., Li, W., Xiao, W., Held, W., ... Tang, L. (2021). Metabolic reprogramming of terminally exhausted CD8⁺ T cells by IL-10 enhances anti-tumor immunity. *Nature Immunology*, 22(6). <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00940-2>
- Haining, W. N., Ebert, B. L., Subrmanian, A., Wherry, E. J., Eichbaum, Q., Evans, J. W., Mak, R., Rivoli, S., Pretz, J., Angelosanto, J., Smutko, J. S., Walker, B. D., Kaech, S. M., Ahmed, R., Nadler, L. M., & Golub, T. R. (2008). Identification of an Evolutionarily Conserved Transcriptional Signature of CD8 Memory Differentiation That Is Shared by T and B Cells. *The Journal of Immunology*, 181(3). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1859>
- Hashimoto, M., Kamphorst, A. O., Im, S. J., Kissick, H. T., Pillai, R. N., Ramalingam, S. S., Araki, K., & Ahmed, R. (2018). CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. *Annual Review of Medicine*, 69. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043208>
- Haynes, N. M., Snook, M. B., Trapani, J. A., Cerruti, L., Jane, S. M., Smyth, M. J., & Darcy, P. K. (2001). Redirecting Mouse CTL Against Colon Carcinoma: Superior Signaling Efficacy of Single-Chain Variable Domain Chimeras Containing TCR- ζ vs Fc ϵ RI- γ . *The Journal of Immunology*, 166(1). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.182>
- Haynes, N. M., Trapani, J. A., Teng, M. W. L., Jackson, J. T., Cerruti, L., Jane, S. M., Kershaw, M. H., Smyth, M. J., & Darcy, P. K. (2002). Rejection of Syngeneic Colon Carcinoma by CTLs Expressing Single-Chain Antibody Receptors Codelivering CD28 Costimulation. *The Journal of Immunology*, 169(10). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5780>
- Hengel, R. L., Thaker, V., Pavlick, M. V., Metcalf, J. A., Dennis, G., Yang, J., Lempicki, R. A., Sereti, I., & Lane, H. C. (2003). Cutting Edge: L-Selectin (CD62L) Expression Distinguishes Small Resting Memory CD4⁺ T Cells That Preferentially Respond to Recall Antigen. *The Journal of Immunology*, 170(1). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.28>
- Henson, S. M., Riddell, N. E., & Akbar, A. N. (2012). Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Çinde Current Opinion in Immunology* (C. 24, Sayı 4). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.04.001>
- Hernández-López, A., Téllez-González, M. A., Mondragón-Terán, P., & Meneses-Acosta, A. (2021). Chimeric Antigen Receptor-T Cells: A Pharmaceutical Scope. *Çinde Frontiers in Pharmacology* (C. 12). <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.720692>

- Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., Budinská, E., Byrne, A. T., Caldas, C., Clarke, R. B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G. M., Roman-Roman, S., Seoane, J., Trusolino, L., & Villanueva, A. (2014). Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discovery*, 4(9). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001>
- Hinrichs, C. S., Borman, Z. A., Cassard, L., Gattinoni, L., Spolski, R., Zhiya, Y., Sanchez-Perez, L., Muranski, P., Kern, S. J., Logun, C., Palmer, D. C., Yun, J., Reger, R. N., Leonard, W. J., Danner, R. L., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2009). Adoptively transferred effector cells derived from naïve rather than central memory CD8⁺ T cells mediate superior antitumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41). <https://doi.org/10.1073/pnas.0907448106>
- Hombach, A., Hombach, A. A., & Abken, H. (2010). Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: Modification of the IgG1 Fc spacer domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids off-target activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Therapy*, 17(10). <https://doi.org/10.1038/gt.2010.91>
- Hombach, A., Köhler, H., Rappl, G., & Abken, H. (2006). Human CD4⁺ T Cells Lyse Target Cells via Granzyme/Perforin upon Circumvention of MHC Class II Restriction by an Antibody-Like Immunoreceptor. *The Journal of Immunology*, 177(8). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5668>
- Hu, Y., Sun, J., Wu, Z., Yu, J., Cui, Q., Pu, C., Liang, B., Luo, Y., Shi, J., Jin, A., Xiao, L., & Huang, H. (2016). Predominant cerebral cytokine release syndrome in CD19-directed chimeric antigen receptor-modified T cell therapy. *Journal of Hematology and Oncology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0299-5>
- Huang, R., Li, X., He, Y., Zhu, W., Gao, L., Liu, Y., Gao, L., Wen, Q., Zhong, J. F., Zhang, C., & Zhang, X. (2020). Recent advances in CAR-T cell engineering. *İçinde Journal of Hematology and Oncology* (C. 13, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00910-5>
- Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hünig, T., Mittrücker, H. W., Brüstle, A., Kamradt, T., & Lohoff, M. (2009). Th17-like developmental process leads to CD8⁺ Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *European Journal of Immunology*, 39(7). <https://doi.org/10.1002/eji.200939412>
- Hudecek, M., Sommermeyer, D., Kosasih, P. L., Silva-Benedict, A., Liu, L., Rader, C., Jensen, M. C., & Riddell, S. R. (2015). The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunology Research*, 3(2). <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0127>
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., & Levitsky, H. (1998). The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *Journal of Experimental Medicine*, 188(12). <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2357>

- Huppa, J. B., & Davis, M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Içinde Nature Reviews Immunology* (C. 3, Sayı 12). <https://doi.org/10.1038/nri1245>
- Imai, C., Mihara, K., Andreansky, M., Nicholson, I. C., Pui, C. H., Geiger, T. L., & Campana, D. (2004). Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18(4). <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403302>
- Isabel Da Cunha, M., & Terra, M. (t.y.). *Interleukin-15 and Phytohaemagglutinin: a combination to study human CD8 + T cell differentiation in vitro*.
- Ishii, K., Pouzolles, M., Chien, C. D., Erwin-Cohen, R. A., Eric Kohler, M., Qin, H., Lei, H., Kuhn, S., Ombrello, A. K., Dulau-Florea, A., Eckhaus, M. A., Shalabi, H., Yates, B., Lichtenstein, D. A., Zimmermann, V. S., Kondo, T., Shern, J. F., Young, H. A., Taylor, N., ... Fry, T. J. (2020). Perforin-deficient CAR T cells recapitulate late-onset inflammatory toxicities observed in patients. *Journal of Clinical Investigation*, 130(10). <https://doi.org/10.1172/JCI130059>
- Iwai, Y., Terawaki, S., & Honjo, T. (2005). PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International Immunology*, 17(2). <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh194>
- Jacobson, C. A., Chavez, J. C., Sehgal, A. R., William, B. M., Munoz, J., Salles, G., Munshi, P. N., Casulo, C., Maloney, D. G., de Vos, S., Reshef, R., Leslie, L. A., Yakoub-Agha, I., Oluwole, O. O., Fung, H. C. H., Rosenblatt, J., Rossi, J. M., Goyal, L., Plaks, V., ... Neelapu, S. S. (2022). Axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 23(1). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00591-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00591-X)
- Jacobson, C. A., Locke, F. L., Miklos, D. B., Herrera, A. F., Westin, J. R., Lee, J., Rossi, J. M., Sun, J., Zheng, L., Avanzi, M. P., & Roberts, Z. J. (2019). End of Phase 1 Results from Zuma-6: Axicabtagene Ciloleucel (Axi-Cel) in Combination with Atezolizumab for the Treatment of Patients with Refractory Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 25(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.314>
- James, J. R. (2018). Tuning ITAM multiplicity on T cell receptors can control potency and selectivity to ligand density. *Science Signaling*, 11(531). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aan1088>
- James, S. E., Greenberg, P. D., Jensen, M. C., Lin, Y., Wang, J., Till, B. G., Raubitschek, A. A., Forman, S. J., & Press, O. W. (2008). Antigen Sensitivity of CD22-Specific Chimeric TCR Is Modulated by Target Epitope Distance from the Cell Membrane. *The Journal of Immunology*, 180(10). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.7028>
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., Von Herrath, M. G., & Schoenberger, S. P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and

- memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature*, 421(6925). <https://doi.org/10.1038/nature01441>
- Jayaraman, J., Mellody, M. P., Hou, A. J., Desai, R. P., Fung, A. W., Pham, A. H. T., Chen, Y. Y., & Zhao, W. (2020a). CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102931>
- Jayaraman, J., Mellody, M. P., Hou, A. J., Desai, R. P., Fung, A. W., Pham, A. H. T., Chen, Y. Y., & Zhao, W. (2020b). CAR-T design: Elements and their synergistic function. *İçinde EBioMedicine* (C. 58). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102931>
- Jensen, M. C., & Riddell, S. R. (2015). Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. *İçinde Current Opinion in Immunology* (C. 33). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.002>
- Jiang, N., Huang, J., Edwards, L. J., Liu, B., Zhang, Y., Beal, C. D., Evavold, B. D., & Zhu, C. (2011). Two-Stage Cooperative T Cell Receptor-Peptide Major Histocompatibility Complex-CD8 Trimolecular Interactions Amplify Antigen Discrimination. *Immunity*, 34(1). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>
- Jiang, W., He, Y., He, W., Wu, G., Zhou, X., Sheng, Q., Zhong, W., Lu, Y., Ding, Y., Lu, Q., Ye, F., & Hua, H. (2021). Exhausted CD8⁺T Cells in the Tumor Immune Microenvironment: New Pathways to Therapy. *İçinde Frontiers in Immunology* (C. 11). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.622509>
- Jogalekar, M. P., Rajendran, R. L., Khan, F., Dmello, C., Gangadaran, P., & Ahn, B. C. (2022). CAR T-Cell-Based gene therapy for cancers: new perspectives, challenges, and clinical developments. *İçinde Frontiers in Immunology* (C. 13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.925985>
- June, C. H. (2007). Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *İçinde Journal of Clinical Investigation* (C. 117, Sayı 6). <https://doi.org/10.1172/JCI32446>
- Kabelitz, D., & Janssen, O. (1997). Antigen-induced death of T-lymphocytes. *İçinde Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* (C. 2). <https://doi.org/10.2741/A175>
- Kagoya, Y., Tanaka, S., Guo, T., Anczurowski, M., Wang, C. H., Saso, K., Butler, M. O., Minden, M. D., & Hirano, N. (2018). A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nature Medicine*, 24(3). <https://doi.org/10.1038/nm.4478>
- Karas, M., Zaks, T. Z., Yakar, S., Dudley, M. E., & LeRoith, D. (2001). TCR stimulation protects CD8⁺ T cells from CD95 mediated apoptosis. *Human Immunology*, 62(1). [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(00\)00223-8](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(00)00223-8)
- Karlsson, H., Svensson, E., Gigg, C., Jarvius, M., Olsson-Strömberg, U., Savoldo, B., Dotti, G., & Loskog, A. (2015). Evaluation of intracellular signaling downstream chimeric antigen receptors. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144787>

- Kato, D., Yaguchi, T., Iwata, T., Morii, K., Nakagawa, T., Nishimura, R., & Kawakami, Y. (2017). Prospects for personalized combination immunotherapy for solid tumors based on adoptive cell therapies and immune checkpoint blockade therapies. *Japanese Journal of Clinical Immunology*, 40(1). <https://doi.org/10.2177/jsci.40.68>
- Kawalekar, O. U., O'Connor, R. S., Fraietta, J. A., Guo, L., McGettigan, S. E., Posey, A. D., Patel, P. R., Guedan, S., Scholler, J., Keith, B., Snyder, N., Blair, I., Milone, M. C., & June, C. H. (2016). Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity*, 44(2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.021>
- Keene, J. A., & Forman, J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 155(3). <https://doi.org/10.1084/jem.155.3.768>
- Kennedy, R., & Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *İçinde Immunological Reviews* (C. 222, Sayı 1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00616.x>
- Kershaw, M. H., Westwood, J. A., & Darcy, P. K. (2013). Gene-engineered T cells for cancer therapy. *İçinde Nature Reviews Cancer* (C. 13, Sayı 8). <https://doi.org/10.1038/nrc3565>
- Kershaw, M. H., Westwood, J. A., Parker, L. L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S. A., White, D. E., Wunderlich, J. R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., Chen, C. C., Yang, J. C., Rosenberg, S. A., & Hwu, P. (2006). A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(20 PART 1). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1183>
- Kim-Schulze, S., Kim, H. S., Fan, Q., Kim, D. W., & Kaufman, H. L. (2009). Local IL-21 promotes the therapeutic activity of effector T cells by decreasing regulatory T cells within the tumor microenvironment. *Molecular Therapy*, 17(2). <https://doi.org/10.1038/mt.2008.249>
- Kishton, R. J., Sukumar, M., & Restifo, N. P. (2017). Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. *İçinde Cell Metabolism* (C. 26, Sayı 1). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.016>
- Klebanoff, C. A., Finkelstein, S. E., Surman, D. R., Lichtman, M. K., Gattinoni, L., Theoret, M. R., Grewal, N., Spiess, P. J., Antony, P. A., Palmer, D. C., Tagaya, Y., Rosenberg, S. A., Waldmann, T. A., & Restifo, N. P. (2004). IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8 + T Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.0307298101>
- Klebanoff, C. A., Gattinoni, L., & Restifo, N. P. (2006). CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *İçinde Immunological Reviews* (C. 211). <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00391.x>

- Koch, S., Larbi, A., Derhovanessian, E., Özcelik, D., Naumova, E., & Pawelec, G. (2008). Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immunity and Ageing*, 5. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-6>
- Kochenderfer, J. N., Feldman, S. A., Zhao, Y., Xu, H., Black, M. A., Morgan, R. A., Wilson, W. H., & Rosenberg, S. A. (2009). Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *Journal of Immunotherapy*, 32(7). <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181ac6138>
- Kochenderfer, J. N., & Rosenberg, S. A. (2013). Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. İçinde *Nature Reviews Clinical Oncology* (C. 10, Sayı 5). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.46>
- Korell, F., Berger, T. R., & Maus, M. V. (2022). Understanding CAR T cell-tumor interactions: Paving the way for successful clinical outcomes. İçinde *Med* (C. 3, Sayı 8). <https://doi.org/10.1016/j.medj.2022.05.001>
- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. İçinde *Immunity* (C. 48, Sayı 2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Labanieh, L., Majzner, R. G., & Mackall, C. L. (2018). Programming CAR-T cells to kill cancer. İçinde *Nature Biomedical Engineering* (C. 2, Sayı 6). <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0235-9>
- Lai, W., Yu, M., Huang, M.-N., Okoye, F., Keegan, A. D., & Farber, D. L. (2011). Transcriptional Control of Rapid Recall by Memory CD4 T Cells. *The Journal of Immunology*, 187(1). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002742>
- Lamers, C. H. J., Langeveld, S. C. L., Groot-Van Ruijven, C. M., Debets, R., Sleijfer, S., & Gratama, J. W. (2007). Gene-modified T cells for adoptive immunotherapy of renal cell cancer maintain transgene-specific immune functions in vivo. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(12). <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0330-3>
- Landgraf, M., McGovern, J. A., Friedl, P., & Huttmacher, D. W. (2018). Rational Design of Mouse Models for Cancer Research. İçinde *Trends in Biotechnology* (C. 36, Sayı 3). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.001>
- Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. İçinde *Cell* (C. 106, Sayı 3). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00455-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00455-X)
- Lapante, M., & Sabatini, D. M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(8). <https://doi.org/10.1242/jcs.125773>
- Laport, G. G., Levine, B. L., Stadtmauer, E. A., Schuster, S. J., Luger, S. M., Grupp, S., Bunin, N., Strobl, F. J., Cotte, J., Zheng, Z., Gregson, B., Rivers, P., Vonderheide, R. H., Liebowitz, D. N., Porter, D. L., & June, C. H. (2003). Adoptive transfer of costimulated T cells induces lymphocytosis in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma following CD34 +selected hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 102(6). <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0095>

- Larbi, A., & Fulop, T. (2014). From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: When markers predict functionality. *Içinde Cytometry Part A* (C. 85, Sayı 1). <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22351>
- Lee, D. W., Gardner, R., Porter, D. L., Louis, C. U., Ahmed, N., Jensen, M., Grupp, S. A., & Mackall, C. L. (2014). Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*, 124(2). <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-552729>
- Lee, D. W., Kochenderfer, J. N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y. K., Delbrook, C., Feldman, S. A., Fry, T. J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N. N., Steinberg, S. M., Stroncek, D., Tschernia, N., Yuan, C., Zhang, H., Zhang, L., Rosenberg, S. A., Wayne, A. S., & Mackall, C. L. (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, 385(9967). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61403-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61403-3)
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., & Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Içinde Annual Review of Immunology* (C. 14). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.233>
- Levine, B. L., Bernstein, W. B., Connors, M., Craighead, N., Lindsten, T., Thompson, C. B., & June, C. H. (1997). Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4⁺ T cells in the absence of exogenous feeder cells. *The Journal of Immunology*, 159(12). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.159.12.5921>
- Li, Y., & Kurlander, R. J. (2010). Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: Differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *Journal of Translational Medicine*, 8. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-104>
- Liadi, I., Singh, H., Romain, G., Rey-Villamizar, N., Merouane, A., Adolacion, J. R. T., Kebriaei, P., Huls, H., Qiu, P., Roysam, B., Cooper, L. J. N., & Varadarajan, N. (2015). Individual motile CD4⁺ T cells can participate in efficient multikilling through conjugation to multiple tumor cells. *Cancer Immunology Research*, 3(5). <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0195>
- Lim, W. A., & June, C. H. (2017). The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Içinde Cell* (C. 168, Sayı 4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.016>
- Lindner, S. E., Johnson, S. M., Brown, C. E., & Wang, L. D. (2020). Chimeric antigen receptor signaling: Functional consequences and design implications. *Içinde Science Advances* (C. 6, Sayı 21). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz3223>
- Liu, D., Badeti, S., Dotti, G., Jiang, J. G., Wang, H., Dermody, J., Soteropoulos, P., Streck, D., Birge, R. B., & Liu, C. (2020). The Role of Immunological Synapse in Predicting the Efficacy of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Immunotherapy. *Içinde Cell Communication and Signaling* (C. 18, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00617-7>

- Liu, F., Liu, Y., & Chen, Z. (2018). Tim-3 expression and its role in hepatocellular carcinoma. İçinde *Journal of Hematology and Oncology* (C. 11, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0667-4>
- Liu, J., Zhang, S., Hu, Y., Yang, Z., Li, J., Liu, X., Deng, L., Wang, Y., Zhang, X., Jiang, T., & Lu, X. (2016). Targeting PD-1 and Tim-3 pathways to reverse CD8 T-cell exhaustion and enhance ex vivo T-cell responses to autologous dendritic/tumor vaccines. *Journal of Immunotherapy*, 39(4). <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000122>
- Liu, Q., & Gao, B. (2008). Manipulation of MHC-I/TCR interaction for immune therapy. İçinde *Cellular and Molecular Immunology* (C. 5, Sayı 3). <https://doi.org/10.1038/cmi.2008.21>
- Liu, Q., Sun, Z., & Chen, L. (2020). Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. İçinde *Protein and Cell* (C. 11, Sayı 8). <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00707-9>
- Liu, X., Jiang, S., Fang, C., Yang, S., Olalere, D., Pequignot, E. C., Cogdill, A. P., Li, N., Ramones, M., Granda, B., Zhou, L., Loew, A., Young, R. M., June, C. H., & Zhao, Y. (2015). Affinity-tuned ErbB2 or EGFR chimeric antigen receptor T cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice. *Cancer Research*, 75(17). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0159>
- Loh, Y. H., Hartung, O., Li, H., Guo, C., Sahalie, J. M., Manos, P. D., Urbach, A., Heffner, G. C., Grskovic, M., Vigneault, F., William Lensch, M., Park, I. H., Agarwal, S., Church, G. M., Collins, J. J., Irion, S., & Daley, G. Q. (2010). Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell*, 7(1). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.004>
- Long, A. H., Haso, W. M., Shern, J. F., Wanhainen, K. M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J. P., Walker, A. J., Kohler, M. E., Venkateshwara, V. R., Kaplan, R. N., Patterson, G. H., Fry, T. J., Orentas, R. J., & Mackall, C. L. (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nature Medicine*, 21(6). <https://doi.org/10.1038/nm.3838>
- Lopez, J. A., Susanto, O., Jenkins, M. R., Lukyanova, N., Sutton, V. R., Law, R. H. P., Johnston, A., Bird, C. H., Bird, P. I., Whisstock, J. C., Trapani, J. A., Saibil, H. R., & Voskoboinik, I. (2013). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, 121(14). <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-446146>
- López-Cantillo, G., Urueña, C., Camacho, B. A., & Ramírez-Segura, C. (2022). CAR-T Cell Performance: How to Improve Their Persistence? İçinde *Frontiers in Immunology* (C. 13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878209>
- Love, P. E., & Hayes, S. M. (2010). ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. İçinde *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (C. 2, Sayı 6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002485>

- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4 +T cells: Differentiation and functions. İçinde *Clinical and Developmental Immunology* (C. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Lustgarten, J., Waks, T., & Eshhar, Z. (1991). CD4 and CD8 accessory molecules function through interactions with major histocompatibility complex molecules which are not directly associated with the T cell receptor-antigen complex. *European Journal of Immunology*, 21(10). <https://doi.org/10.1002/eji.1830211030>
- Maalej, K. M., Merhi, M., Inchakalody, V. P., Mestiri, S., Alam, M., Maccalli, C., Cherif, H., Uddin, S., Steinhoff, M., Marincola, F. M., & Dermime, S. (2023). CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances. İçinde *Molecular Cancer* (C. 22, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01723-z>
- Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Rivière, I., & Sadelain, M. (2002). Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor. *Nature Biotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1038/nbt0102-70>
- Mamonkin, M., Rouce, R. H., Tashiro, H., & Brenner, M. K. (2015). A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood*, 126(8). <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629527>
- Marelli-Berg, F. M., Clement, M., Mauro, C., & Caligiuri, G. (2013). An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *Journal of Cell Science*, 126(11). <https://doi.org/10.1242/jcs.124099>
- Marin, V., Pizzitola, I., Agostoni, V., Attianese, G. M. P. G., Finney, H., Lawson, A., Pule, M., Rousseau, R., Biondi, A., & Biagi, E. (2010). Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: Improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors. *Haematologica*, 95(12). <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.026310>
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14(2), 1-10. <https://doi.org/10.1186/S13223-018-0278-1/TABLES/4>
- Martin, M. D., & Badovinac, V. P. (2018). Defining memory CD8 T cell. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02692>
- Martin, T., Usmani, S. Z., Berdeja, J. G., Agha, M., Cohen, A. D., Hari, P., Avigan, D., Deol, A., Htut, M., Lesokhin, A., Munshi, N. C., O'donnell, E., Stewart, A. K., Schecter, J. M., Goldberg, J. D., Jackson, C. C., Yeh, T. M., Banerjee, A., Allred, A., ... Jagannath, S. (2022). Ciltacabtagene Autoleucel, an Anti-B-cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy, for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: CARTITUDE-1 2-Year Follow-Up. *Journal of Clinical Oncology*, 19. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.00842>
- Martinez, G. J., Pereira, R. M., Äijö, T., Kim, E. Y., Marangoni, F., Pipkin, M. E., Togher, S., Heissmeyer, V., Zhang, Y. C., Crotty, S., Lamperti, E. D., Ansel, K. M., Mempel, T. R., Lähdesmäki, H., Hogan, P. G., & Rao, A. (2015). The Transcription Factor

- NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8⁺ T Cells. *Immunity*, 42(2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.006>
- Martínez-Lostao, L., Anel, A., & Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical Cancer Research*, 21(22). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0685>
- Martinovic, K. M., Srdic-Rajic, T., Babovic, N., Džodic, R., Jurišić, V., & Konjevic, G. (2016). Decreased expression of pSTAT, IRF-1 and DAP10 signalling molecules in peripheral blood lymphocytes of patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Pathology*, 69(4). <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203107>
- Masopust, D., & Schenkel, J. M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 13, Sayı 5). <https://doi.org/10.1038/nri3442>
- Maude, S. L., Barrett, D., Teachey, D. T., & Grupp, S. A. (2014). Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. İçinde *Cancer Journal (United States)* (C. 20, Sayı 2). <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000035>
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., & Grupp, S. A. (2014). Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 371(16). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1407222>
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., ... Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 378(5). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1709866>
- Maurer, U., Preiss, F., Brauns-Schubert, P., Schlicher, L., & Charvet, C. (2014). GSK-3 -at the crossroads of cell death and survival. İçinde *Journal of Cell Science* (C. 127, Sayı 7). <https://doi.org/10.1242/jcs.138057>
- Maus, M. V., Fraietta, J. A., Levine, B. L., Kalos, M., Zhao, Y., & June, C. H. (2014). Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. İçinde *Annual Review of Immunology* (C. 32). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120136>
- Maus, M. V., & Levine, B. L. (2016). Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Community Oncologist. *The Oncologist*, 21(5). <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0421>
- McGuirk, J., Waller, E. K., Qayed, M., Abhyankar, S., Ericson, S., Holman, P., Keir, C., & Myers, G. D. (2017). Building blocks for institutional preparation of CTL019 delivery. İçinde *Cytotherapy* (C. 19, Sayı 9). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.06.001>

- McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S., & Wherry, E. J. (2019). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. İçinde *Annual Review of Immunology* (C. 37). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055318>
- McLellan, A. D., & Ali Hosseini Rad, S. M. (2019). Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation. İçinde *Immunology and Cell Biology* (C. 97, Sayı 7). <https://doi.org/10.1111/imcb.12254>
- Mestas, J., & Hughes, C. C. W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*, 172(5). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Michie, C. A., McLean, A., Alcock, C., & Beverley, P. C. L. (1992). Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*, 360(6401). <https://doi.org/10.1038/360264a0>
- Mikkilineni, L., & Kochenderfer, J. N. (2021). CAR T cell therapies for patients with multiple myeloma. İçinde *Nature Reviews Clinical Oncology* (C. 18, Sayı 2). <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0427-6>
- Miliotou, A. N., & Papadopoulou, L. C. (2018). CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.2174/1389201019666180418095526>
- Milone, M. C., Fish, J. D., Carpenito, C., Carroll, R. G., Binder, G. K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhal, M., Gloss, B., Danet-Desnoyers, G., Campana, D., Riley, J. L., Grupp, S. A., & June, C. H. (2009). Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Molecular Therapy*, 17(8). <https://doi.org/10.1038/mt.2009.83>
- Ming Hsu, C. Y., & Uluda Ğ, H. (2012). A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. *Nature Protocols*, 7(5). <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.038>
- Morad, G., Helmink, B. A., Sharma, P., & Wargo, J. A. (2021). Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade. İçinde *Cell* (C. 184, Sayı 21). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.020>
- Morgan, L. R., Krentz, E. T., Fan, S. W., & Fan, D. (1993). Adoptive immunotherapy of advanced renal cell cancer using PHA-stimulated autologous lymphocytes. *Anticancer Research*, 13(5 C).
- Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M., & Rosenberg, S. A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy*, 18(4). <https://doi.org/10.1038/mt.2010.24>
- Morsut, L., Roybal, K. T., Xiong, X., Gordley, R. M., Coyle, S. M., Thomson, M., & Lim, W. A. (2016). Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors

- Using Synthetic Notch Receptors. *Cell*, 164(4).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.012>
- Movafagh, A., Heydary, H., Mortazavi-Tabatabaei, A., & Azargashb, E. (2011). *The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure*.
- Mullard, A. (2017). FDA approves first CAR T therapy. İçinde *Nature Reviews Drug Discovery* (C. 16, Sayı 10). <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.196>
- Munshi, N. C., Anderson, L. D., Shah, N., Madduri, D., Berdeja, J., Lonial, S., Raje, N., Lin, Y., Siegel, D., Oriol, A., Moreau, P., Yakoub-Agha, I., Delforge, M., Cavo, M., Einsele, H., Goldschmidt, H., Weisel, K., Rambaldi, A., Reece, D., ... San-Miguel, J. (2021). Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 384(8). <https://doi.org/10.1056/nejmoa2024850>
- Muranski, P., Borman, Z. A., Kerkar, S. P., Klebanoff, C. A., Ji, Y., Sanchez-Perez, L., Sukumar, M., Reger, R. N., Yu, Z., Kern, S. J., Roychoudhuri, R., Ferreyra, G. A., Shen, W., Durum, S. K., Feigenbaum, L., Palmer, D. C., Antony, P. A., Chan, C. C., Laurence, A., ... Restifo, N. P. (2011). Th17 Cells Are Long Lived and Retain a Stem Cell-like Molecular Signature. *Immunity*, 35(6).
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.019>
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. İçinde *Cell* (C. 88, Sayı 3).
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81874-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81874-7)
- Nagata, S., & Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 17, Sayı 5). <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>
- Neelapu, S. S., Locke, F. L., Bartlett, N. L., Lekakis, L. J., Miklos, D. B., Jacobson, C. A., Braunschweig, I., Oluwole, O. O., Siddiqi, T., Lin, Y., Timmerman, J. M., Stiff, P. J., Friedberg, J. W., Flinn, I. W., Goy, A., Hill, B. T., Smith, M. R., Deol, A., Farooq, U., ... Go, W. Y. (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 377(26).
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1707447>
- Newick, K., O'brien, S., Sun, J., Kapoor, V., Maceyko, S., Lo, A., Puré, E., Moon, E., & Albelda, S. M. (2016). Augmentation of CAR T-cell trafficking and antitumor efficacy by blocking protein kinase a localization. *Cancer Immunology Research*, 4(6). <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0263>
- Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., Höfer, T., Viola, A., & Acuto, O. (2010). Constitutively active lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity*, 32(6). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.011>
- Nolz, J. C., & Richer, M. J. (2020). Control of memory CD8+ T cell longevity and effector functions by IL-15. İçinde *Molecular Immunology* (C. 117).
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.11.011>

- Omilusik, K. D., & Goldrath, A. W. (2017). The origins of memory T cells. İçinde *Nature* (C. 552, Sayı 7685). <https://doi.org/10.1038/d41586-017-08280-8>
- Otten, G. R., & Germain, R. N. (1991). Split Anergy in a CD8 + T Cell: Receptor-dependent Cytolysis in the Absence of Interleukin-2 Production . *Science*, 251(4998). <https://doi.org/10.1126/science.1900952>
- Palacios, E. H., & Weiss, A. (2004). Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. İçinde *Oncogene* (C. 23, Sayı 48 REV. ISS. 7). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208074>
- Pang, Y., Hou, X., Yang, C., Liu, Y., & Jiang, G. (2018). Advances on chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy for oncotherapy. İçinde *Molecular Cancer* (C. 17, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0840-y>
- Park, T. S., Rosenberg, S. A., & Morgan, R. A. (2011). Treating cancer with genetically engineered T cells. İçinde *Trends in Biotechnology* (C. 29, Sayı 11). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.009>
- Perrin, S. (2014). Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature*, 507(7493). <https://doi.org/10.1038/507423a>
- Philipsen, L., Reddycherla, A. V., Hartig, R., Gumz, J., Kästle, M., Kritikos, A., Poltorak, M. P., Prokazov, Y., Turbin, E., Weber, A., Zuschratter, W., Schraven, B., Simeoni, L., & Müller, A. J. (2017). De novo phosphorylation and conformational opening of the tyrosine kinase Lck act in concert to initiate T cell receptor signaling. *Science Signaling*, 10(462). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf4736>
- Picker, L. J., Treer, J. R., Ferguson-Darnell, B., Collins, P. A., Buck, D., & Terstappen, L. W. (1993). Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *The Journal of Immunology*, 150(3). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.150.3.1105>
- Pitcher, L. A., & Van Oers, N. S. C. (2003). T-cell receptor signal transmission: Who gives an ITAM? İçinde *Trends in Immunology* (C. 24, Sayı 10). <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.08.003>
- Poltorak, M. P., Graef, P., Tschulik, C., Wagner, M., Cletiu, V., Dreher, S., Borjan, B., Fraessle, S. P., Effenberger, M., Turk, M., Busch, D. H., Plitzko, J., Kugler, D. G., Ragan, S., Schmidt, T., Stemberger, C., & Germeroth, L. (2020). Expamers: a new technology to control T cell activation. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74595-8>
- Poondla, N., Sheykhhasan, M., Akbari, M., Samadi, P., Kalhor, N., & Manoochehri, H. (2022). The Promise of CAR T-Cell Therapy for the Treatment of Cancer Stem Cells: A Short Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 17(5). <https://doi.org/10.2174/1574888x17666220217101817>
- Porter, D. L., Hwang, W. T., Frey, N. V., Lacey, S. F., Shaw, P. A., Loren, A. W., Bagg, A., Marcucci, K. T., Shen, A., Gonzalez, V., Ambrose, D., Grupp, S. A., Chew, A.,

- Zheng, Z., Milone, M. C., Levine, B. L., Melenhorst, J. J., & June, C. H. (2015). Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science Translational Medicine*, 7(303). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5415>
- Press Announcements | FDA. (t.y.). Geliş tarihi 16 Ocak 2024, gönderen <https://www.fda.gov/news-events/fda-newsroom/press-announcements>
- Przybylowski, M., Hakakha, A., Stefanski, J., Hodges, J., Sadelain, M., & Rivière, I. (2006). Production scale-up and validation of packaging cell clearance of clinical-grade retroviral vector stocks produced in Cell Factories. *Gene Therapy*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302648>
- Puckett, Y., & Chan, O. (2023). Acute Lymphocytic Leukemia. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459149/>
- Puhr, H. C., & İlhan-Mutlu, A. (2019). New emerging targets in cancer immunotherapy: The role of LAG3. İçinde *ESMO Open* (C. 4, Sayı 2). <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000482>
- Pulè, M. A., Straathof, K. C., Dotti, G., Heslop, H. E., Rooney, C. M., & Brenner, M. K. (2005). A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Molecular Therapy*, 12(5). <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.04.016>
- Pulko, V., Davies, J. S., Martinez, C., Lanteri, M. C., Busch, M. P., Diamond, M. S., Knox, K., Bush, E. C., Sims, P. A., Sinari, S., Billheimer, D., Haddad, E. K., Murray, K. O., Wertheimer, A. M., & Nikolich-Zugich, J. (2016). Human memory T cells with a naive phenotype accumulate with aging and respond to persistent viruses. *Nature Immunology*, 17(8). <https://doi.org/10.1038/ni.3483>
- Quezada, S. A., Simpson, T. R., Peggs, K. S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P. A., Restifo, N. P., & Allison, J. P. (2010). Tumor-reactive CD4⁺ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *Journal of Experimental Medicine*, 207(3). <https://doi.org/10.1084/jem.20091918>
- Quintarelli, C., Orlando, D., Boffa, I., Guercio, M., Polito, V. A., Petretto, A., Lavarello, C., Sinibaldi, M., Weber, G., Del Bufalo, F., Giorda, E., Scarsella, M., Petrini, S., Pagliara, D., Locatelli, F., De Angelis, B., & Caruana, I. (2018). Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma. *OncoImmunology*, 7(6). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1433518>
- Ramello, M. C., Benzaïd, I., Kuenzi, B. M., Lienlaf-Moreno, M., Kandell, W. M., Santiago, D. N., Pabón-Saldaña, M., Darville, L., Fang, B., Rix, U., Yoder, S., Berglund, A., Koomen, J. M., Haura, E. B., & Abate-Daga, D. (2019). An immunoproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome. *Science Signaling*, 12(568). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aap9777>

- Ramos, C. A., Rouse, R., Robertson, C. S., Reyna, A., Narala, N., Vyas, G., Mehta, B., Zhang, H., Dakhova, O., Carrum, G., Kamble, R. T., Gee, A. P., Mei, Z., Wu, M. F., Liu, H., Grilley, B., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K., ... Dotti, G. (2018). In Vivo Fate and Activity of Second- versus Third-Generation CD19-Specific CAR-T Cells in B Cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *Molecular Therapy*, 26(12). <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.09.009>
- Rapoport, A. P., Stadtmauer, E. A., Aqui, N., Badros, A., Cotte, J., Chrisley, L., Veloso, E., Zheng, Z., Westphal, S., Mair, R., Chi, N., Ratterree, B., Pochran, M. F., Natt, S., Hinkle, J., Sickles, C., Sohal, A., Ruehle, K., Lynch, C., ... June, C. H. (2005). Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer. *Nature Medicine*, 11(11). <https://doi.org/10.1038/nm1310>
- Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J. P., & Gögenur, I. (2021). Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. İçinde *British Journal of Cancer* (C. 124, Sayı 2). <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>
- Restifo, N. P., & Gattinoni, L. (2013). Lineage relationship of effector and memory T cells. İçinde *Current Opinion in Immunology* (C. 25, Sayı 5). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.09.003>
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue [5]. İçinde *Nature* (C. 338, Sayı 6214). <https://doi.org/10.1038/338383b0>
- Riddell, S. R., & Greenberg, P. D. (1990). The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *Journal of Immunological Methods*, 128(2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(90\)90210-M](https://doi.org/10.1016/0022-1759(90)90210-M)
- Roybal, K. T., Rupp, L. J., Morsut, L., Walker, W. J., McNally, K. A., Park, J. S., & Lim, W. A. (2016). Precision Tumor Recognition by T Cells with Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell*, 164(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.011>
- Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. İçinde *Immunological Reviews* (C. 229, Sayı 1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x>
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., & Wilson, I. A. (2006a). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. İçinde *Annual Review of Immunology* (C. 24). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658>
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., & Wilson, I. A. (2006b). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. İçinde *Annual Review of Immunology* (C. 24). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658>
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., & Wilson, I. A. (2006c). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. İçinde *Annual Review of Immunology* (C. 24). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658>
- Sad, S., Marcotte, R., & Mosmann, T. R. (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*, 2(3). [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90051-9](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90051-9)

- Sadelain, M., Brentjens, R., & Rivière, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Içinde Cancer Discovery* (C. 3, Sayı 4). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>
- Sadelain, M., Rivière, I., & Riddell, S. (2017). Therapeutic T cell engineering. *Içinde Nature* (C. 545, Sayı 7655). <https://doi.org/10.1038/nature22395>
- Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Içinde Annual Review of Immunology* (C. 22). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754). <https://doi.org/10.1038/44385>
- Salter, A. I., Ivey, R. G., Kennedy, J. J., Voillet, V., Rajan, A., Alderman, E. J., Voytovich, U. J., Lin, C., Sommermeyer, D., Liu, L., Whiteaker, J. R., Gottardo, R., Paulovich, A. G., & Riddell, S. R. (2018). Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Science Signaling*, 11(544). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat6753>
- Samji, T., & Khanna, K. M. (2017). Understanding memory CD8+T cells. *Içinde Immunology Letters* (C. 185). <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.012>
- Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W. N., Konieczny, B. T., Subramaniam, S., & Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *Journal of Experimental Medicine*, 205(3). <https://doi.org/10.1084/jem.20071641>
- Savoldo, B., Ramos, C. A., Liu, E., Mims, M. P., Keating, M. J., Carrum, G., Kamble, R. T., Bollard, C. M., Gee, A. P., Mei, Z., Liu, H., Grilley, B., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K., & Dotti, G. (2011). CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *Journal of Clinical Investigation*, 121(5). <https://doi.org/10.1172/JCI46110>
- Schmidts, A., Ormhøj, M., Choi, B. D., Taylor, A. O., Bouffard, A. A., Scarfò, I., Larson, R. C., Frigault, M. J., Gallagher, K., Castano, A. P., Riley, L. S., Cabral, M. L., Boroughs, A. C., Velasco Cárdenas, R. M. H., Schamel, W., Zhou, J., Mackay, S., Tai, Y. T., Anderson, K. C., & Maus, M. V. (2019). Rational design of a trimeric April-based CAR-binding domain enables efficient targeting of multiple myeloma. *Blood Advances*, 3(21). <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000703>
- Schmitt, N., & Ueno, H. (2015). Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Içinde Current Opinion in Immunology* (C. 34). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.03.007>
- Schober, K., Müller, T. R., Gökmen, F., Grassmann, S., Effenberger, M., Poltorak, M., Stemberger, C., Schumann, K., Roth, T. L., Marson, A., & Busch, D. H. (2019). Orthotopic replacement of T-cell receptor α - and β -chains with preservation of near-

- physiological T-cell function. *Nature Biomedical Engineering*, 3(12). <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0409-0>
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *İçinde Science (C. 331, Sayı 6024)*. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- Schuster, S. J., Bishop, M. R., Tam, C. S., Waller, E. K., Borchmann, P., McGuirk, J. P., Jäger, U., Jaglowski, S., Andreadis, C., Westin, J. R., Fleury, I., Bachanova, V., Foley, S. R., Ho, P. J., Mielke, S., Magenau, J. M., Holte, H., Pantano, S., Pacaud, L. B., ... Maziarz, R. T. (2019). Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 380(1). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1804980>
- Schwartz, R. H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*, 248(4961). <https://doi.org/10.1126/science.2113314>
- Schwella, N., Braun, A., Ahrens, N., Rick, O., & Salama, A. (2003). Leukapheresis after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: A novel approach to harvest a second autograft. *Transfusion*, 43(2). <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2003.00306.x>
- Scott, A. C., Dündar, F., Zumbo, P., Chandran, S. S., Klebanoff, C. A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S., Zamarin, D., Walther, T., Snyder, A., Femia, M. R., Comen, E. A., Wen, H. Y., Hellmann, M. D., Anandasabapathy, N., Liu, Y., ... Schietinger, A. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature*, 571(7764). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1324-y>
- Seki, N., Brooks, A. D., Carter, C. R. D., Back, T. C., Parsoneault, E. M., Smyth, M. J., Wiltrott, R. H., & Sayers, T. J. (2002). Tumor-Specific CTL Kill Murine Renal Cancer Cells Using Both Perforin and Fas Ligand-Mediated Lysis In Vitro, But Cause Tumor Regression In Vivo in the Absence of Perforin. *The Journal of Immunology*, 168(7). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3484>
- Sert, B., Gulden, G., Teymur, T., Ay, Y., Turan, R. D., Mert Unaldi, O., Guzenge, E., Erdil, H. E., Isik, S., Oz, P., Bozkurt, I., Ozer, S., Yurdakul, T., Kamali, O., Ovali, E., Tarhan, N., & Tastan, C. (t.y.). *Enhancing CAR-T cells: unleashing lasting impact potential with phytohemagglutinin activation in in vivo leukemia model*. <https://doi.org/10.1038/s41417-023-00709-9>
- Shah, B. D., Ghobadi, A., Oluwole, O. O., Logan, A. C., Boissel, N., Cassaday, R. D., Leguay, T., Bishop, M. R., Topp, M. S., Tzachanis, D., O'Dwyer, K. M., Arellano, M. L., Lin, Y., Baer, M. R., Schiller, G. J., Park, J. H., Subklewe, M., Abedi, M., Minnema, M. C., ... Houot, R. (2021). KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *The Lancet*, 398(10299). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01222-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01222-8)

- Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J., & Kazi, J. U. (2021). T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. İçinde *Signal Transduction and Targeted Therapy* (C. 6, Sayı 1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00823-w>
- Shultz, L. D., Brehm, M. A., Victor Garcia-Martinez, J., & Greiner, D. L. (2012). Humanized mice for immune system investigation: Progress, promise and challenges. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 12, Sayı 11). <https://doi.org/10.1038/nri3311>
- Singh, N., Lee, Y. G., Shestova, O., Ravikumar, P., Hayer, K. E., Hong, S. J., Lu, X. M., Pajarillo, R., Agarwal, S., Kuramitsu, S., Orlando, E. J., Mueller, K. T., Good, C. R., Berger, S. L., Shalem, O., Weitzman, M. D., Frey, N. V., Maude, S. L., Grupp, S. A., ... Ruella, M. (2020). Impaired death receptor signaling in leukemia causes antigen-independent resistance by inducing CAR T-cell dysfunction. *Cancer Discovery*, 10(4). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0813>
- Smith, T. R. F., & Kumar, V. (2008). Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. İçinde *Trends in Immunology* (C. 29, Sayı 7). <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.04.002>
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., & Jordan, M. S. (2009). T Cell Activation. *Annual review of immunology*, 27, 591. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132706>
- Song, D. G., Ye, Q., Poussin, M., Harms, G. M., Figini, M., & Powell, D. J. (2012). CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood*, 119(3). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-344275>
- Srivastava, S., & Riddell, S. R. (2015). Engineering CAR-T cells: Design concepts. İçinde *Trends in Immunology* (C. 36, Sayı 8). <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.06.004>
- Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. İçinde *Blood Cancer Journal* (C. 11, Sayı 4). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- Stinchcombe, J. C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., & Griffiths, G. M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*, 443(7110). <https://doi.org/10.1038/nature05071>
- Sukumar, M., Kishton, R. J., & Restifo, N. P. (2017). Metabolic reprogramming of anti-tumor immunity. İçinde *Current Opinion in Immunology* (C. 46). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.011>
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R., & Srivastava, R. K. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: Apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*, 20(17). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204282>
- Supimon, K., Sangsuwannukul, T., Sujjitjoon, J., Phanthaphol, N., Chieochansin, T., Pongvarin, N., Wongkham, S., Junking, M., & Yenchitsomanus, P. thai. (2021). Anti-mucin 1 chimeric antigen receptor T cells for adoptive T cell therapy of cholangiocarcinoma. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85747-9>

- Takada, K., & Jameson, S. C. (2009). Naive T cell homeostasis: From awareness of space to a sense of place. *İçinde Nature Reviews Immunology* (C. 9, Sayı 12). <https://doi.org/10.1038/nri2657>
- Tantalo, D. G. M., Oliver, A. J., Von Scheidt, B., Harrison, A. J., Mueller, S. N., Kershaw, M. H., & Slaney, C. Y. (2021). Understanding T cell phenotype for the design of effective chimeric antigen receptor T cell therapies. *İçinde Journal for ImmunoTherapy of Cancer* (C. 9, Sayı 5). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002555>
- Tantalo, D. G., Oliver, A. J., Von Scheidt, B., Harrison, A. J., Mueller, S. N., Kershaw, M. H., & Slaney, C. Y. (2021). Understanding T cell phenotype for the design of effective chimeric antigen receptor T cell therapies. *J Immunother Cancer*, 9, 2555. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002555>
- Taştan, C., Kançağı, D. D., Turan, R. D., Yurtsever, B., Çakırsoy, D., Abanuz, S., Yılcı, M., Seyis, U., Özer, S., Mert, S., Kayhan, C. K., Tokat, F., Elmas, M. A., Birdoğan, S., Arbak, S., Yalçın, K., Sezgin, A., Kızılkılıç, E., Hemşinlioğlu, C., ... Ovalı, E. (2020). Preclinical Assessment of Efficacy and Safety Analysis of CAR-T Cells (ISIKOK-19) Targeting CD19-Expressing B-Cells for the First Turkish Academic Clinical Trial with Relapsed/Refractory ALL and NHL Patients. *Turkish Journal of Hematology*, 37(4), 234. <https://doi.org/10.4274/TJH.GALENOS.2020.2020.0070>
- Tawbi, H. A., Schadendorf, D., Lipson, E. J., Ascierto, P. A., Matamala, L., Castillo Gutiérrez, E., Rutkowski, P., Gogas, H. J., Lao, C. D., De Menezes, J. J., Dalle, S., Arance, A., Grob, J.-J., Srivastava, S., Abaskharoun, M., Hamilton, M., Keidel, S., Simonsen, K. L., Sobieski, A. M., ... Long, G. V. (2022). Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 386(1). <https://doi.org/10.1056/nejmoa2109970>
- Thapa, P., & Farber, D. L. (2019). The Role of the Thymus in the Immune Response. *İçinde Thoracic surgery clinics* (C. 29, Sayı 2). <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.12.001>
- Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Chen, E. Y., Wood, B. L., Greisman, H. A., Qian, X., James, S. E., Raubitschek, A., Forman, S. J., Gopal, A. K., Pagel, J. M., Lindgren, C. G., Greenberg, P. D., Riddell, S. R., & Press, O. W. (2008). Adoptive immunotherapy for indolent non-hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, 112(6). <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-128843>
- Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Qian, X., Gopal, A. K., Maloney, D. G., Lindgren, C. G., Lin, Y., Pagel, J. M., Budde, L. E., Raubitschek, A., Forman, S. J., Greenberg, P. D., Riddell, S. R., & Press, O. W. (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: Pilot clinical trial results. *Blood*, 119(17). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-387969>
- Toes, R. E. M., Ossendorp, F., Offringa, R., & Melief, C. J. M. (1999). CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *İçinde Journal of Experimental Medicine* (C. 189, Sayı 5). <https://doi.org/10.1084/jem.189.5.753>

- Tomayko, M. M., Anderson, S. M., Brayton, C. E., Sadanand, S., Steinel, N. C., Behrens, T. W., & Shlomchik, M. J. (2008). Systematic Comparison of Gene Expression between Murine Memory and Naive B Cells Demonstrates That Memory B Cells Have Unique Signaling Capabilities. *The Journal of Immunology*, 181(1). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.27>
- Tonnerre, P., Wolski, D., Subudhi, S., Aljabban, J., Hoogeveen, R. C., Damasio, M., Drescher, H. K., Bartsch, L. M., Tully, D. C., Sen, D. R., Bean, D. J., Brown, J., Torres-Cornejo, A., Robidoux, M., Kvistad, D., Alatrakchi, N., Cui, A., Lieb, D., Cheney, J. A., ... Lauer, G. M. (2021). Differentiation of exhausted CD8⁺ T cells after termination of chronic antigen stimulation stops short of achieving functional T cell memory. *Nature Immunology*, 22(8). <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00982-6>
- Trowbridge, I. S., & Thomas, M. L. (1994). CD45: An emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annual Review of Immunology* (C. 12). <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.000505>
- Tsao, H. W., Kaminski, J., Kurachi, M., Barnitz, R. A., DiIorio, M. A., LaFleur, M. W., Ise, W., Kurosaki, T., Wherry, E. J., Haining, W. N., & Yosef, N. (2022). Batf-mediated epigenetic control of effector CD8⁺ T cell differentiation. *Science Immunology*, 7(68). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abi4919>
- Tuluc, F., Spitsin, S., Tustin, N. B., Murray, J. B., Tustin, R., Schankel, L. A., Wiznia, A., Nachman, S., & Douglas, S. D. (2017). Decreased PD-1 Expression on CD8 Lymphocyte Subsets and Increase in CD8 Tscm Cells in Children with HIV Receiving Raltegravir. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 33(2). <https://doi.org/10.1089/aid.2016.0108>
- Turvey SE, B. D. (2010). Chapter 2: Innate Immunity. *J allergy clin Immunol*, 125(2 Suppl 2).
- Unsoeld, H., & Pircher, H. (2005). Complex Memory T-Cell Phenotypes Revealed by Coexpression of CD62L and CCR7. *Journal of Virology*, 79(7). <https://doi.org/10.1128/jvi.79.7.4510-4513.2005>
- Vairy, S., Garcia, J. L., Teira, P., & Bittencourt, H. (2018). CTL019 (Tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *İçinde Drug Design, Development and Therapy* (C. 12). <https://doi.org/10.2147/DDDT.S138765>
- Van Den Broek, T., Borghans, J. A. M., & Van Wijk, F. (2018). The full spectrum of human naive T cells. *İçinde Nature Reviews Immunology* (C. 18, Sayı 6). <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0001-y>
- van der Schans, J. J., van de Donk, N. W. C. J., & Mutis, T. (2020). Dual Targeting to Overcome Current Challenges in Multiple Myeloma CAR T-Cell Treatment. *İçinde Frontiers in Oncology* (C. 10). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01362>

- Van Der Stegen, S. J. C., Hamieh, M., & Sadelain, M. (2015). The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. İçinde *Nature Reviews Drug Discovery* (C. 14, Sayı 7). <https://doi.org/10.1038/nrd4597>
- Villinger, F., Miller, R., Mori, K., Mayne, A. E., Bostik, P., Sundstrom, J. B., Sugimoto, C., & Ansari, A. A. (2004). IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. *Vaccine*, 22(25-26). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.07.022>
- Vormittag, P., Gunn, R., Ghorashian, S., & Veraitch, F. S. (2018). A guide to manufacturing CAR T cell therapies. İçinde *Current Opinion in Biotechnology* (C. 53). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.025>
- Walczak, H. (2013). Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008698>
- Wang, M., Munoz, J., Goy, A., Locke, F. L., Jacobson, C. A., Hill, B. T., Timmerman, J. M., Holmes, H., Jaglowski, S., Flinn, I. W., McSweeney, P. A., Miklos, D. B., Pagel, J. M., Kersten, M.-J., Milpied, N., Fung, H., Topp, M. S., Houot, R., Beitinjane, A., ... Reagan, P. M. (2020). KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 382(14). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1914347>
- Wang, X., & Rivière, I. (2016). Clinical manufacturing of CAR T cells: Foundation of a promising therapy. İçinde *Molecular Therapy Oncolytics* (C. 3). <https://doi.org/10.1038/mt.2016.15>
- Wange, R. L., & Samelson, L. E. (1996). Complex complexes: Signaling at the TCR. İçinde *Immunity* (C. 5, Sayı 3). [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80315-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80315-5)
- Waring, P., & Müllbacher, A. (1999). Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. İçinde *Immunology and Cell Biology* (C. 77, Sayı 4). <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x>
- Weinkove, R., George, P., Dasyam, N., & McLellan, A. D. (2019). Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. İçinde *Clinical and Translational Immunology* (C. 8, Sayı 5). <https://doi.org/10.1002/cti2.1049>
- Weng, N. P., Levine, B. L., June, C. H., & Hodes, R. J. (1995). Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11091>
- Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. İçinde *Nature Immunology* (C. 12, Sayı 6, ss. 492-499). <https://doi.org/10.1038/ni.2035>
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 15, Sayı 8). <https://doi.org/10.1038/nri3862>

- Whitlow, M., Bell, B. A., Feng, S. L., Filpula, D., Hardman, K. D., Hubert, S. L., Rollence, M. L., Wood, J. F., Schott, M. E., Milenic, D. E., Yokota, T., & Schlom, J. (1993). An improved linker for single-chain fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Engineering, Design and Selection*, 6(8). <https://doi.org/10.1093/protein/6.8.989>
- Wilkie, S., Picco, G., Foster, J., Davies, D. M., Julien, S., Cooper, L., Arif, S., Mather, S. J., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J. M., & Maher, J. (2008). Retargeting of Human T Cells to Tumor-Associated MUC1: The Evolution of a Chimeric Antigen Receptor. *The Journal of Immunology*, 180(7). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4901>
- Wolf, Y., Anderson, A. C., & Kuchroo, V. K. (2020). TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *İçinde Nature Reviews Immunology* (C. 20, Sayı 3). <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0224-6>
- Woo, S. R., Turnis, M. E., Goldberg, M. V., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C. J., Bettini, M. L., Gravano, D. M., Vogel, P., Liu, C. L., Tansombatvisit, S., Grosso, J. F., Netto, G., Smeltzer, M. P., Chaux, A., Utz, P. J., Workman, C. J., Pardoll, D. M., Korman, A. J., ... Vignali, D. A. A. (2012). Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Research*, 72(4). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1620>
- Wu, Z., Zheng, Y., Sheng, J., Han, Y., Yang, Y., Pan, H., & Yao, J. (2022). CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *İçinde Frontiers in Immunology* (C. 13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.816005>
- Xu, Y., Zhang, M., Ramos, C. A., Durett, A., Liu, E., Dakhova, O., Liu, H., Creighton, C. J., Gee, A. P., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Savoldo, B., & Dotti, G. (2014). Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood*, 123(24). <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-552174>
- Yang, J., Brook, M. O., Carvalho-Gaspar, M., Zhang, J., Ramon, H. E., Sayegh, M. H., Wood, K. J., Turka, L. A., & Jones, N. D. (2007). Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.0704397104>
- Yi, M., Zheng, X., Niu, M., Zhu, S., Ge, H., & Wu, K. (2022). Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *İçinde Molecular Cancer* (C. 21, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01489-2>
- Ying, Z., He, T., Wang, X., Zheng, W., Lin, N., Tu, M., Xie, Y., Ping, L., Zhang, C., Liu, W., Deng, L., Qi, F., Ding, Y., Lu, X. an, Song, Y., & Zhu, J. (2019). Parallel Comparison of 4-1BB or CD28 Co-stimulated CD19-Targeted CAR-T Cells for B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.08.002>

- Ying, Z., Huang, X. F., Xiang, X., Liu, Y., Kang, X., Song, Y., Guo, X., Liu, H., Ding, N., Zhang, T., Duan, P., Lin, Y., Zheng, W., Wang, X., Lin, N., Tu, M., Xie, Y., Zhang, C., Liu, W., ... Chen, S. Y. (2019). A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nature Medicine*, 25(6). <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0421-7>
- Youngblood, B., Hale, J. S., Kissick, H. T., Ahn, E., Xu, X., Wieland, A., Araki, K., West, E. E., Ghoneim, H. E., Fan, Y., Dogra, P., Davis, C. W., Konieczny, B. T., Antia, R., Cheng, X., & Ahmed, R. (2017). Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature*, 552(7685). <https://doi.org/10.1038/nature25144>
- Yu, S., Li, A., Liu, Q., Li, T., Yuan, X., Han, X., & Wu, K. (2017). Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. İçinde *Journal of Hematology and Oncology* (C. 10, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0444-9>
- Zarour, H. M. (2016). Reversing T-cell dysfunction and exhaustion in cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(8). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1849>
- Zhang, B., Strauss, A. C., Chu, S., Li, M., Ho, Y., Shiang, K. D., Snyder, D. S., Huettner, C. S., Shultz, L., Holyoake, T., & Bhatia, R. (2010). Effective Targeting of Quiescent Chronic Myelogenous Leukemia Stem Cells by Histone Deacetylase Inhibitors in Combination with Imatinib Mesylate. *Cancer Cell*, 17(5). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.011>
- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F., & Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomarker Research*, 5(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/S40364-017-0102-Y/FIGURES/2>
- Zhang, G., Wang, L., Cui, H., Wang, X., Zhang, G., Ma, J., Han, H., He, W., Wang, W., Zhao, Y., Liu, C., Sun, M., & Gao, B. (2014). Anti-melanoma activity of T cells redirected with a TCR-like chimeric antigen receptor. *Scientific Reports*, 4(SREP03571). <https://doi.org/10.1038/srep03571>
- Zhang, L., Kerkar, S. P., Yu, Z., Zheng, Z., Yang, S., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A., & Morgan, R. A. (2011). Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Molecular Therapy*, 19(4). <https://doi.org/10.1038/mt.2010.313>
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. İçinde *Immunity* (C. 35, Sayı 2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>
- Zhang, T., Wu, M.-R., & Sentman, C. L. (2012). An NKp30-Based Chimeric Antigen Receptor Promotes T Cell Effector Functions and Antitumor Efficacy In Vivo. *The Journal of Immunology*, 189(5). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103495>
- Zhang, Y., Joe, G., Hexner, E., Zhu, J., & Emerson, S. G. (2005). Host-reactive CD8+ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nature Medicine*, 11(12). <https://doi.org/10.1038/nm1326>
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4+ T cell populations. İçinde *Annual Review of Immunology* (C. 28). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>

- Zhu, X., Li, Q., & Zhu, X. (2022). Mechanisms of CAR T cell exhaustion and current counteraction strategies. İçinde *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (C. 10). <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1034257>
- Ziegler, S. F. (2016). Division of labour by CD4⁺ T helper cells. İçinde *Nature Reviews Immunology* (C. 16, Sayı 7). <https://doi.org/10.1038/nri.2016.53>
- Zitvogel, L., Pitt, J. M., Daillère, R., Smyth, M. J., & Kroemer, G. (2016). Mouse models in oncoimmunology. İçinde *Nature Reviews Cancer* (C. 16, Sayı 12). <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.91>



EKLER

Ek 1.

İlgili tez çalışması Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından kabul edilen ve tamamlanan 4293 proje kodlu ‘‘Phytohemagglutinin/ aCD3&aCD28 Tabanlı İki Farklı CD19 Spesifik CAR (CD28/4-1BB) T Hücre Üretiminin Pre-Klinik In Vitro ve In Vivo Etkinliklerinin Karşılaştırılması’’ projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Tez sahibi **Berranur Sert** Yardımcı Personel/Araştırmacı olarak projede görev almıştır. Tez kapsamında *in vitro* ve *in vivo* sonuçların sunulduğu yayınlarla (*Vaccines* ve *Nature* yayın grubundan *Cancer Gene Therapy*) birlikte, sözlü bildiriler ve poster sunumu gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması sahibi **Berranur Sert**, Türkiye’nin İlk İnsanlı Uzay Misyonu olan ve TÜBİTAK UZAY tarafından kabul edilen TÜRK ASTRONOT VE BİLİM MİSYONU (TABM) PROJESİ kapsamında 7T210900 proje kodlu 13 bilim misyonundan biri olan MESSAGE (MICROGRAVITY ASSOCIATED GENETICS) Bilim Misyonu Araştırmacısı olarak görev almaktadır. Söz konusu projede yerçekimsiz ortamdan etkilenen henüz işlevi keşfedilmemiş genlerin tespit edilmesi ve uzay görevlerinde, bağışıklık hücrelerinin hangilerinin yer çekimi tarafından direkt olarak etkileneceğinin, CRISPR gen mühendisliği yöntemleri ile belirlenmesi üzerine çalışmalarını sürdürmektedir. MESSAGE Bilim Misyonu kapsamında Yeryüzü Laboratuvar Deneyleri (Akustik Levitasyon ve 2D Kültür), Transkriptom Analizleri, CRISPR Knockout PBMC geliştirmeleri, Akustik Levitasyon ve 2D kültür testleri, CRISPR modifiye PBMC etkinlik analizlerini (sitokin salınım profili, immün hafıza profili, anti-kanser etkinliği, canlılık ve proliferasyon) gerçekleştirmektedir.

Araştırmacı, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından kabul edilen 28499 proje kodlu ‘‘Nöral Farklılaştırılmış ve Amiloid β 1-42 Peptitleriyle *in vitro* Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulmuş SHSY5Y Hücrelerinde Kararlı DNA Topoisomerase IIb Aşırı İfadesinin Nöroprotektif Rolünün Araştırılması’’ projesinde Bursiyer olarak görev almaktadır. Söz konusu projede genetik tasarım çalışması, bakteriyel transformasyon, izolasyon, lentivirüs üretimi, transgenik hücre üretimi ve kalite kontrol testlerini gerçekleştirmektedir.