



37. OTDK Biológia Szekció

**A Ca^{2+} -aktivált KCa3.1 ioncsatorna szerepe a CAR-T sejtek tumor
eliminációjában**

Horváth Péter

Biológia BSc, III. évfolyam

Témavezetők:

Jusztus Vivien

PhD hallgató

Dr. Hajdu Péter Béla

Egyetemi docens

Debreceni Egyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Tartalomjegyzék

1. Áttekintés	3
2. Elméleti bevezető	4
Az immunrendszer és T-sejtek szerepe az immunválasz során	4
Ioncsatornák.....	5
Ca ²⁺ -aktivált KCa3.1 ioncsatorna	6
Ioncsatornák szerepe a T-sejtek aktivációjában.....	7
CAR-T sejtek és szerepük.....	8
CAR-T sejtés immunterápia.....	11
Retrovirális transzdukció.....	12
Áramlási citometria	12
Konfokális mikroszkópia	13
Direkt immunofluoreszcens jelölés	14
Live-or-Dye alapú killing-assay.....	15
3. Célkitűzés	16
4. Anyagok és módszerek.....	18
HEK293T sejtvonat	18
Raji sejtvonat.....	18
Jurkat sejtvonat	18
Retrovirális transzdukció.....	18
CD19 direkt jelölés	19
Live-or-Dye alapú killing-assay.....	20
5. Eredmények	22
6. Diskusszió	26
8. Köszönetnyilvánítás	27
9. Irodalomjegyzék.....	28

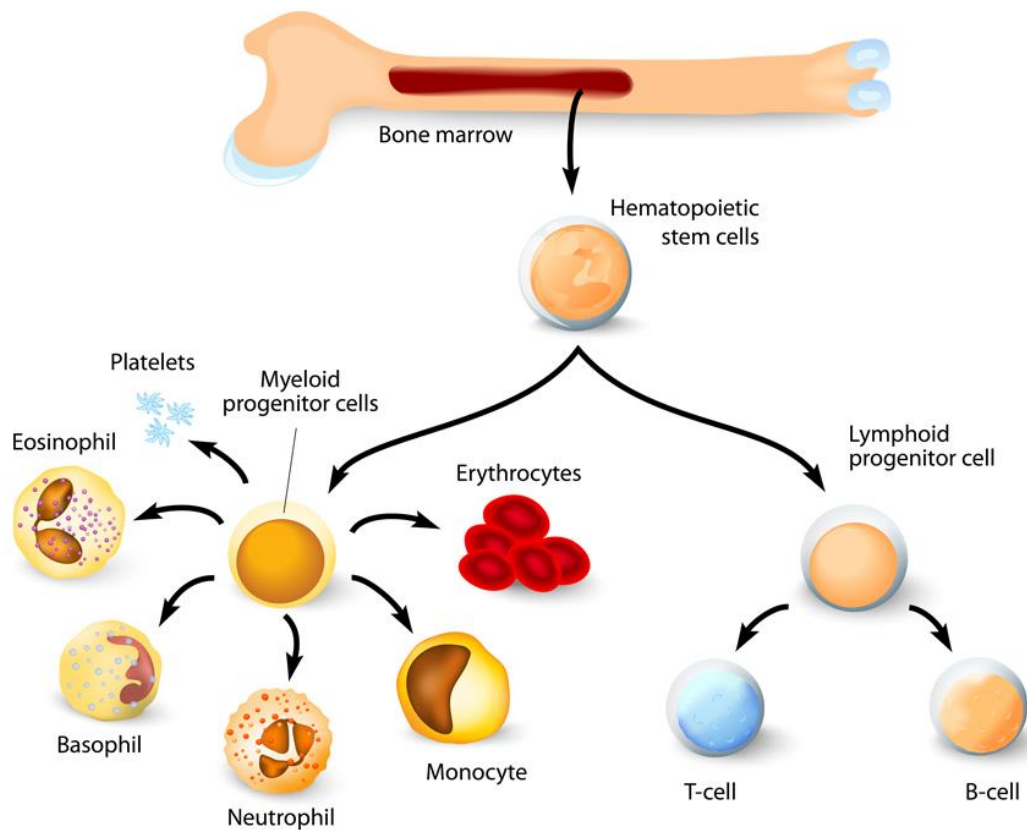
1. Áttekintés

A T-sejtek a limfociták igen nagy csoportját alkotják, melyek fontos szerepet játszanak az aktív immunitás kialakításában. Ezen sejtek legismertebb képviselői a $CD4^+$ T-sejtek (helper/segítő T-sejtek) és $CD8^+$ T-sejtek (citotoxikus/ölő T-sejtek). A T-sejtek csak fehérje alapú, receptorokhoz kötött antigéneket képes felismerni. Ez az MHC/HLA 1 és 2 receptorok segítségével történik, melyhez hozzákötődnek a TCR-ek (T-sejt receptorok) és komplexet alkotva ismeri fel az adott antigént. Az antigén felismerés következtében elindul egy sejten belüli Ca^{2+} -függő jelátvitel, melynek következtében a T-sejt aktiválódik, proliferálódik, citokin interleukin 2 (IL2) és további citotoxikus molekula, mint például granzim B expresszálódik. A T-sejtek kálium ioncsatornái, mint amilyen a Ca^{2+} -függő KCa3.1 kritikus szerepet játszik T-sejtek jelátvitelének és működésének szabályozásában azáltal, hogy biztosítják a hajtóerőt a megfelelő Ca^{2+} -függő jelátvitelhez. A genetikailag módosított T-sejtek az úgynevezett CAR-T sejtek, kiméra antigén receptorokkal (CAR) rendelkeznek. Ezeket a sejteket daganat ellenes terápiáknál használják, hiszen az új, módosított receptorainak köszönhetően képes a tumorsejtek felszínén található specifikus antigént detektálni, hozzákapcsolódni és elpusztítani a tumorsejtet. A munkám során a KCa3.1 ioncsatorna CAR-T sejtek effektor funkciójában betöltött szerepét tanulmányoztam. Retrovirális transzdukció segítségével sGFP konjugált, harmadik generációs, CD19-specifikus CAR-t és mCherry (monomer piros fluoreszcens fehérje) konjugált KCa3.1 ioncsatornát expresszáltattunk KCa3.1-deficiens Jurkat limfocita sejtvonalban, majd a transzdukció hatékonyságát áramlási citométerrel határoztuk meg. Direkt immunofluoreszcens jelölést végeztünk a CD19 sejtfelszíni marker expressziójának validálása céljából. Végezetül Live-or-Dye alapú killing-assay-t végeztünk TRAM34, KCa3.1 ioncsatorna gátlószer jelenlétében, amely segítségével meghatározhattuk a KCa3.1 ioncsatornák szerepét a CAR-T antitumorális válaszában. Sikeresen igazoltunk, hogy az általunk létrehozott mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejtek specifikusan felismerték és eliminálták célsejteket. Továbbá a KCa3.1 ioncsatorna gátlása szignifikánsan növelte az általunk létrehozott sejtek specifikus ölési hatékonyságát.

2. Elméleti bevezető

Az immunrendszer és T-sejtek szerepe az immunválasz során

Az immunrendszer egy igen összetett rendszer, mely sokszor még azelőtt elpusztítja a kórokozókat, mielőtt azok károkat okozhatnának. Az evolúcióban kétféle immunrendszer fejlődött ki: a veleszületett és az adaptív (1). A veleszületett immunitás embriókorban alakul ki, melyekben egyaránt megtalálhatóak fizikai és anatómiai védelmi paraméterek (pl.: bőr nyálkahártyája), effektor sejtek, sejt receptorok, antimikrobiális peptidok is. Ez esetben nem szükséges a kórokozóval való előzetes találkozás, ugyanis ez a fajta immunitás nem specifikus, és a betolakodókkal szemben rövidtávú memóriával rendelkezik. Az adaptív immunitás lassabb immunválaszt tesz lehetővé, azonban sokkal specifikusabb és a hosszútávú memória kialakulása is megtörténik. Megkülönböztethetünk elsődleges és másodlagos nyirokszerveket, szöveteket egyaránt. A vörös csontvelő elsődleges nyirokszövet, amely a vér- és immunsejteket termeli, míg a másodlagos esetén a termelt limfociták találkoznak a szervezet antigéneivel (2). Az immunsejtek hematopoetikus őssejtekből (1. Ábra) jönnek létre, majd a mieloid előalakból granulociták, dendritikus sejtek (DC), makrofágok, a limfoid előalakból a T- és B-sejtek fejlődnek ki. (3). Azonban egyik féle immunrendszer sem elegendő egymagában a teljes védelemhez, hanem szoros kapcsolatban működnek együtt, melyre jó példa az, hogy a B- és T-sejtek aktiválásához elengedhetetlenek az antigén prezentáló sejtek (APC) megléte. Az adaptív immunitás egyik legfontosabb szereplője a T-sejt. Ezen sejtek mindegyikén megtalálható az ún. T-sejt receptor (röviden: TCR), ám két típusa eltérő ko-receptort tartalmaz: a citotoxikus T-sejt felszínén $CD8^+$, míg a helper T-sejt felszínén $CD4^+$ expresszálódik. A citotoxikus T-sejt képes a fertőzött sejtek eliminálására (4). A helper T-sejtek fontos szerepet játszanak a humorális immunválasz, a veleszületett és T-sejtes immunválasz stimulálásában, és a memória kialakításában is (5). Mint említettem a limfociták aktiválásához elengedhetetlenek az APC-k megléte, melyek a fő hisztonkompatibilitási komplexhez (MHC) kapcsolódva mutatják be az antigént a T-sejteknek, illetve a természetes ölő sejteknek (NK). Ilyen sejtek például a dendritikus sejtek. A prezentációt követően különféle jelátviteli útvonalak aktiválódnak, melyek hatására citokinek és más citoxikus anyagok szabadulnak fel, melyek elősegítik a fertőzött sejt eliminálását.



1.Ábra: Az immunrendszer sejtjeinek fejlődése

Forrás: <https://researchfeatures.com/steady-state-hematopoietic-stem-cells-transplantation/>

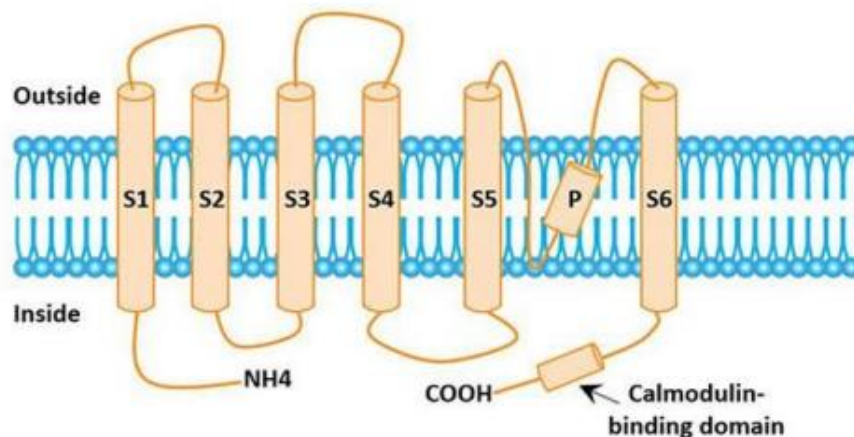
Ioncsatornák

Az ioncsatornák olyan integráns membránfehérjék, melyek biztosítják az ionok szabályozott, szelektív átjutását a sejtmembránon. Az ionáramlás képessége viszont a sejtek számos életfunkciójához elengedhetetlen. Az ioncsatornákat tulajdonságaik szerint lehet csoportosítani több szempont alapján, például szelektivitás és kapuzás alapján. Az ioncsatornák szelektivitása azt jelenti, hogy csak bizonyos ion, vagy ionok számára átjárható. Ez alapján megkülönböztethetünk nagy szelektivitású csatornákat melyek leginkább K^+ , Na^+ , Ca^{2+} és Cl^- számára átjárható és jellemzően 4 alegységből állnak. Lehetnek még kis szelektivitásúak, melyek kationokra specifikusak és 5 alegységből állnak és lehetnek nem szelektív csatornák, amelyek 6 alegységből állnak. Kapuzás alapján egy csatorna lehet például feszültség-kapuzott, ligand-kapuzott, intracelluláris (i.c.) hírvivő által kapuzott, mechanoszenzitív kapuzott és háttér csatorna. A feszültség-kapuzott ioncsatornák esetében a membránpotenciálváltozás jelenti az

ingert, a ligand kapuzott ioncsatornák egy extracelluláris ligand kötődés hatására nyitnak ki, az i.c. hírvivő által kapuzott csatornák esetén a ligand bekötődése az intracelluláris oldalról jelenti az ingert, míg a mechanoszenzitív csatornák esetében a membrán feszülése jelenti az ingert (6). A háttér csatornák konstitutívan aktívak és segítik fenntartani a nyugalmi potenciált (7). Nyitás és zárás esetén a csatornák konformációja megváltozik, lehetővé téve az ionok áramlását. Az ioncsatornák lehetséges állapotai: nyitott, zárt és esetenként inaktív. Hosszan tartó kémiai vagy elektromos stimulus hatására inaktivált állapotba kerülhetnek addig, amíg az adott inger meg nem szűnik. Az ioncsatornák rendellenességei, mutációi számos betegséget okoznak, például a cisztás fibrózis, ahol mutáció miatt a CFTR rendellenesen működik, éppen ezért igen jó célpontot jelentenek a gyógyszeripar számára (8).

Ca²⁺-aktivált KCa3.1 ioncsatorna

A T-sejt ioncsatornák egyik kiemelkedő képviselője a KCa3.1 ioncsatorna (2. Ábra). A Ca²⁺-aktivált kálium csatornák közül farmakológiai és fiziológiás szempontból 3 típust különböztetünk meg: nagy vezetőképességű káliumcsatorna (pl.: KCa1.1); kis vezetőképességű káliumcsatorna (pl.: KCa2.1); és a közepes vezetőképességű káliumcsatorna, ahova a KCa3.1 is tartozik. A KCa3.1 ioncsatorna 4 alfa alegységet tartalmazó transzmembrán fehérje, ami egyenként 6 transzmembrán szegmenset (S1-S6) tartalmaz. Az S5 és S6 között található az úgynevezett pórus régió, amely az ionvezetést teszi lehetővé. A fehérje C-terminálisán található egy kalmodulin kötő domén, melynek funkciója, a csatorna Ca²⁺ kötött kalmodulin aktivációja, mely következtében a csatorna K⁺-t juttat ki az extracelluláris térbe a membránpotenciál szabályozása érdekében. A KCa3.1 specifikus gátlószere a TRAM34, amely egy igen szelektív inhibitor (K_d érték: 20nM), éppen ezért széleskörben alkalmazzák kutatásokban kalcium ioncsatornák gátlására (9). A T sejtekben expresszálandó KCa3.1 csatorna hozzájárul a sejtek proliferációjához és aktiválódását, effektor funkcióját elősegítő gének expressziójához. Kulcsszerepet játszik továbbá különböző autoimmun kórképekben, mint például a reumatoid arthritisz, illetve szerepe van más immunrendszeri gyulladásos betegségekben is (10)

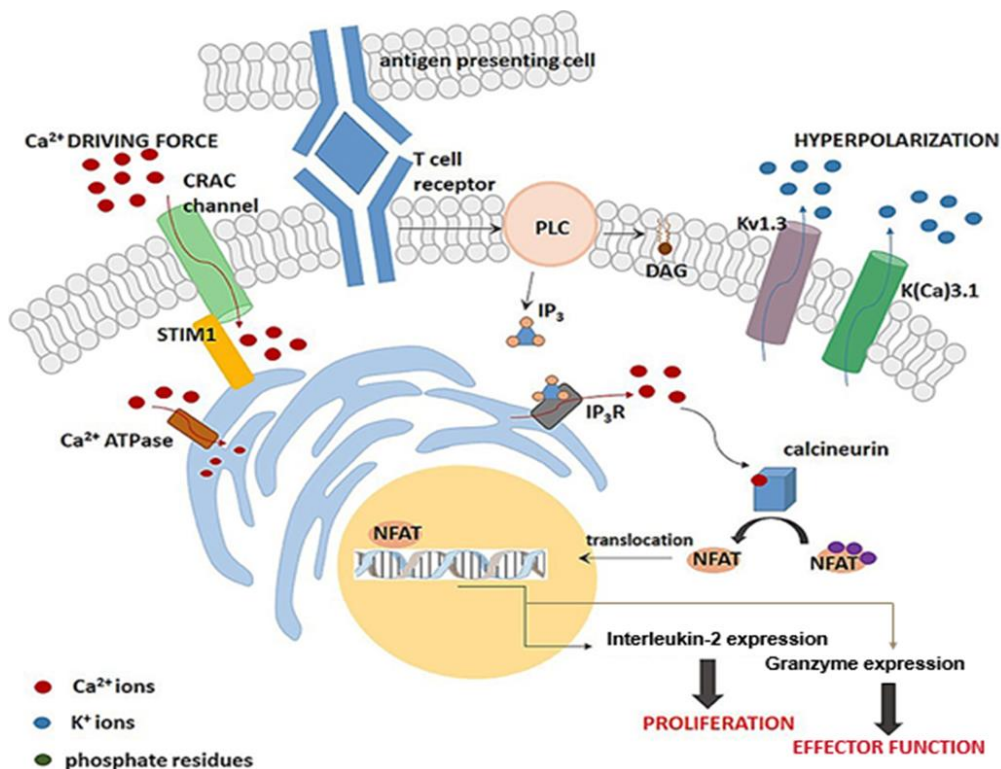


2. Ábra. KCa3.1 strukturális modellje

Forrás: <https://www.cusabio.com/c-20939.html>

Ioncsatornák szerepe a T-sejtek aktivációjában

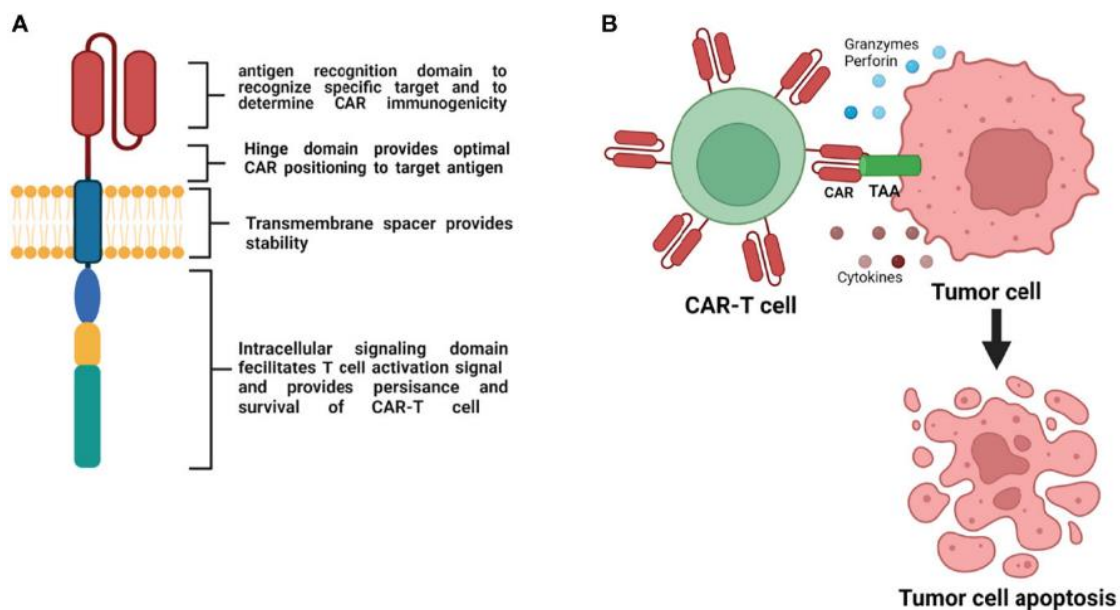
A T-sejt ioncsatornák, mint a Kv1.3, KCa3.1 és Orai1 ioncsatorna kiemelkedő szerepet játszik T-sejtek aktivációja, proliferációja és tumor-ölése során (3. Ábra). A T-sejtek antigén felismerésének hatására elindul egy sejten belüli jelátvitel kaszkád, amely során foszfolipáz C aktiválódik, ami a foszfatidil-inozitol-biszfoszfátokat (PIP₂) oldható inozitol-1,4,5-trifoszfáttá (IP₃) hidrolizálja. Az így keletkezett IP₃ hozzákötődik az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában található IP₃ receptorhoz, amely következtében az ER-ből kalciumion szabadul fel az IP₃ csatornán keresztül (11). A Ca²⁺ kiürülését az ER-ből a CRAC csatorna (Calcium Release Activated Channel) STIM1 alegysége érzékeli, majd transzlokálódik a plazmamembránban található Orai1 csatornához, amely a CRAC csatorna másik alegységét adja. Ennek következtében a CRAC csatorna aktiválódik, majd az Orai1-en keresztül kalcium áramlik be extracelluláris térből az intracelluláris térbe. A fokozott Ca²⁺ ion beáramlás miatt a sejt membránpotenciálja pozitívabbá válik, azaz depolarizálódik, melynek hatására jelentős elektorkémiai különbség alakul ki az intra- és az extracelluláris tér között. A depolarizáció hatására kinyit Kv.1.3 feszültségfüggő ioncsatorna, míg a megemelkedett kalcium koncentráció a Ca²⁺-függő KCa3.1 csatornát aktiválja. Ezen két kálium csatorna a membránpotenciált kellően negatív értéken tartják a kálium-efflux által, így biztosítva a hajtóerőt a megfelelő Ca²⁺-függő jelátvitelhez. Ezen jelátviteli folyamat hozzájárul bizonyos citokinek, citotoxikus molekulák expressziójához (pl.: IL-2, granzim B), amely elősegítik T-sejtek aktivációját, proliferációját, effektor funkciók betöltését (12)



3. Ábra: A kálium ioncsatornák szerepe a T-sejtek aktivációjában (Teisseire et al., 2019)

CAR-T sejtek és szerepük

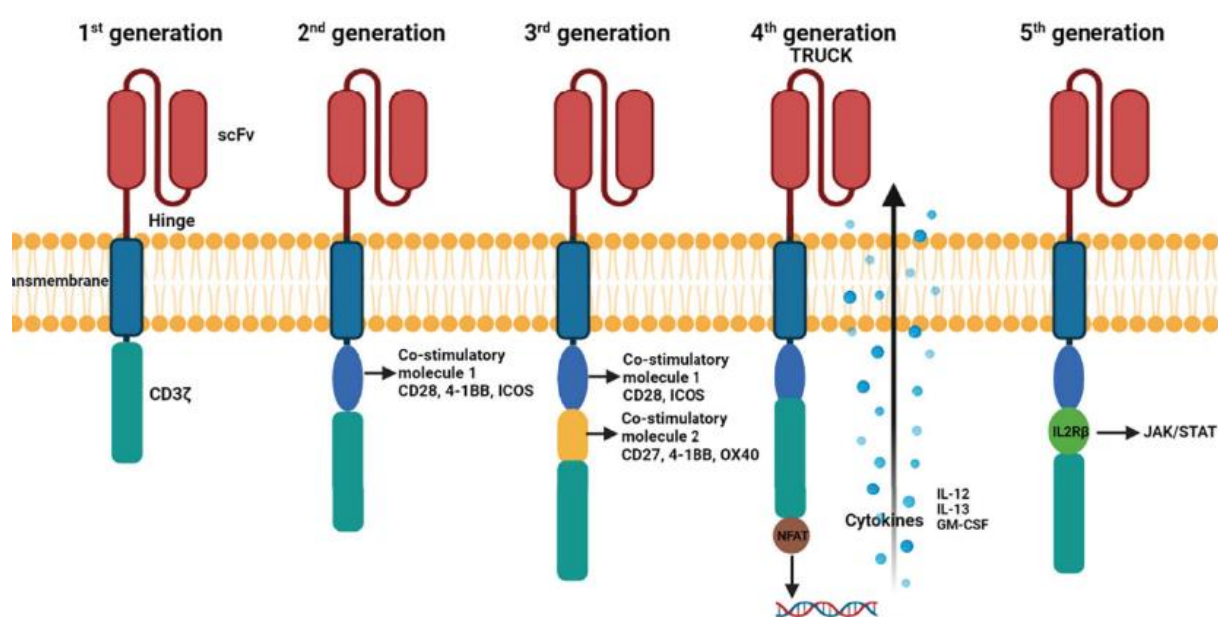
A CAR-ok olyan biotechnológiailag/genetikailag létrehozott receptorok, melyek specifikusan egy kívánt antigént céloznak meg. Ezen receptorok képesek az antigéneket MHC/HLA prezentáció hiányában is felismerni, melyekre a veleszületett TCR-ek nem képesek. Mivel a sejtfelismerés a fő hisztonkompatibilitási komplextől független, emiatt a tumor képtelen megtéveszteni ezeket a sejteket, úgy, mint a természetes T-sejteket. Ezek a receptorok négy fő doménből állnak (4. Ábra): egy extracelluláris térben található antigén-felismerő doménből (ún. ektodomén), egy csukló doménből, egy transzmembrán doménből, mely elengedhetetlen a receptor felszíni kifejeződése illetve stabilitása érdekében, illetve egy intracelluláris doménből (ún. endodomén), amely a sejten belül helyezkedik el és stimuláció hatására konformáció változáson keresztülmenve lehetővé teszi a szignálfehérjék toborzását és foszforilációját (13). Évek alatt a CAR endodomén konformációja hatalmas fejlődésnek indult, melynek köszönhetően javult a CAR-T sejtek aktivitása, proliferációja és hatékonysága is.



4. Ábra: Kiméra antigén receptor felépítése (A), CAR-T sejt specifikus tumor-asszociált antigén felismerése (B) (Kandra et al., 2022)

Az endodomén alapján öt CAR generációt különböztetünk meg (5. Ábra). Az első generációs CAR-ok scFV-t tartalmazó extracelluláris doménból és CD3 jelátviteli intracelluláris doménból állnak. Megfigyelhető, hogy a T-sejtek kevésbé proliferálnak, a citokin felszabadulása nem megfelelő mennyiségű, a daganatellenes aktivitása csökkent, így ez manapság elavultnak tekinthető. A második generációba tartozó sejtek intracellulárisan a CD3 mellett úgynevezett kostimuláló molekulákat is tartalmaz, mint például a CD28, CD134 és CD137, melyek kettős jelátviteli útvonalakat eredményez. Ez fokozza a T-sejtek aktiválódását, proliferációját, és mivel a CAR-T sejtek ellenállnak az apoptózisnak megnövekedett az *in vivo* élettartamuk is. A jelentős javulás ellenére egy kostimuláló molekula nem bizonyult elégségesnek a sejtek perzisztenciáját illetően. A harmadik generációs CAR-okban két kostimuláló molekulát kombinálnak a CD3 mellett. A kutatási adatok egyértelműen azt mutatják, hogy jobb teljesítményt nyújtanak egyes ráktípusok esetén, jobb tumorellenes aktivitással és *in vivo* proliferációval. Ugyanakkor nagyobb a súlyos mellékhatások előfordulásának kockázata és gyorsabban kimerülnek, mint a második generációs társaik, mely a többszörös jelátviteli molekulák túlzott aktivitásának köszönhető. A 4. generációs CAR-ok konstrukciója leginkább a második generáció konstrukciójához hasonlít. Az intracelluláris domén azonban speciális transzkripciós faktorokat (NFAT (nuclear factor of activated T-cells,)) tartalmaz, melyek

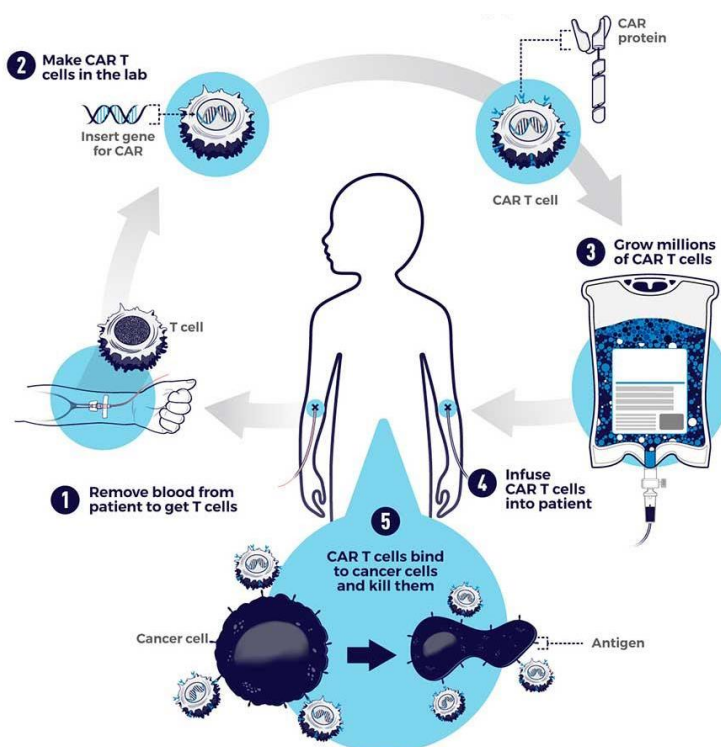
szabályozzák a transzgénikus fehérjék expresszióját, és a CAR aktiválásakor a célzott tumorhelyhez való eljuttatását, ezáltal az immunválaszoknak kedvezőbb tumor mikrokörnyezetet alakítanak ki. A NFAT promóterszekvencia aktiválása olyan citokinek termelését eredményezi, amelyek a veleszületett immunsejtek aktiválásával elpusztítják a daganatokat. A fejlesztések ellenére a szolid tumorok ellen még mindig igen kis hatékonysággal bír, és a tumoron kívüli aktivációja és a transzgénikus citokinek felszabadulása más, egészséges szövetekben nem kívánt mellékhatásokat eredményeznek. Az utolsó, 5. generációs CAR-okat a második generáció alapján tervezték, további membránreceptorok és T-sejtösszekötők, mint a JAK/STAT jelátviteli domén endodoménbe való integrálásával. A jelátviteli doménbe építették az IL-2 béta láncát, amely STAT3 transzkripciós faktorra kötődik és mikor az antigén ehhez a receptorhoz kötődik a CD3, a kostimuláló molekula és a JAK/STAT3 citokin indukáló hármas jelátvitelének egyidejű aktiválása történik. E három jel együttesen javítja a T-sejtek aktiválódását, túlélését és proliferációját is. Azonban ezeknek a CAR-oknak is akadályt jelentenek a szolid tumorok, mert bár az egyetlen antigént célzó CAR-T sejtek kezdetben igen nagy válaszarányt mutatnak, később a daganatos sejtek elveszítik az adott célsejt expressziójának a képességét. Ezt hívják antigénszökésnek. Az antigénszökés mellett további nehézségeket jelentenek még a CAR-T sejtek nem hatékony mozgása a tumor központjába, a sűrű extracelluláris mátrix és az immunszuppresszív tumor mikrokörnyezet. Ezeken túl igen nagy kihívást jelent az egészséges sejtek megkímélése, ugyanis a szolid tumorok felszínén jelen lévő célantigének többsége a normális sejteken is expresszálódik. Ezen sejteket daganat ellenes immunterápiákra használják fel, igen effektívek a hematológiai tumorok kezelésében (14,15).



5. Ábra: Kiméra antigén receptor (CAR) generációk (Kandra et al., 2022)

CAR-T sejtes immunterápia

Az immunterápiák célja, az immunrendszer felkészítése, erősítése a daganatok elleni harcban (16). A CAR-T sejtes tumor terápiák klinikai előállítására több lépést foglal magába, melyeket szigorú minőségellenőrzési folyamatok követnek (6. Ábra). Először is a beteg (autológ) vagy donor (allogén) perifériás véréből leukocitákat gyűjtenek, majd a visszamaradt vérkészítményt visszaengedik a páciens vérkeringésébe. A második lépésben felszaporítják a T-sejteket. Az így kapott $CD4^+$ és $CD8^+$ sejteket elválasztják, majd az izolált sejteket autológ APC (Antigén Prezentáló Sejt) vagy monoklonális antitestekkel aktiválják. A sejtek gyors növekedése érdekében leggyakrabban használt növekedési faktor az IL-2. Ezután a CAR-t kódoló gént vagy vírusvektorral, vagy nem vírusvektorral juttatják be a sejtbe. A klinikai/alaputatásokban legtöbbször vírusvektort használnak, ugyanis a vektorok reverz transzkripció potenciáljának köszönhetően az RNS-t tartósan integrált DNS-sé alakítja a T-limfociták genomjában. A leggyakrabban használt vírusok: adenovírusok és retrovírusok. A T-sejtek vírusvektorokkal való átalakítása terápiás CAR-T sejtekké azonban biztonsági kockázatot jelenthetnek. A következő lépésben az így kapott sejtek osztódnak, majd, ha elérték a megfelelő mennyiséget akkor terápiás szerként visszajuttatják a betegbe.



6. Ábra: CAR-T sejt terápia

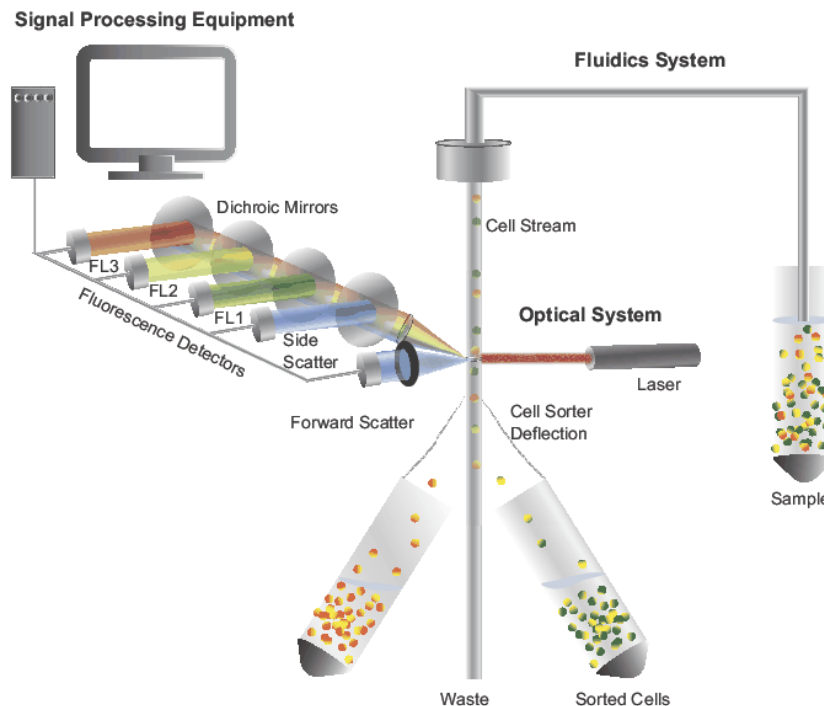
Forrás: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>

Retrovirális transzdukció

A retrovírusokat széles körben alkalmazzák vírusvektorként a génexpresszió módosítására, ugyanis az RNS-genomjukat képesek DNS-sé transzformálni és azt beépíteni a gazdasejt genomjába. Kísérletek szempontjából is kitűnő, ugyanis igen egyszerű laboratóriumi körülmények között manipulálni ezen vektorokat, illetve hosszú távú és stabil génexpressziót tesz lehetővé a célsejtben és utódjaiban is egyaránt. A retrovírus fertőzőképességét a burok glikoproteinje határozza meg. Hátránya, hogy ciklikus sejteket képesek hatékonyan megfertőzni (17).

Áramlási citometria

Az áramlási citometria olyan eljárás, mely lehetővé teszi az oldatban lévő sejtek, részecskék többparaméteres elemzését (7. Ábra). Az áramlási citométerek fényforrásként lézert használnak, melyek fluoreszcens és szórt fényjeleket bocsátanak ki, és ezeket detektorok (pl.: fotodiódák) olvassák le, majd ezeket elektronikus jellé konvertálják, melyeket a számítógép elemez és egy szabványosított formátumú fájlba ír. A látható fény szórását két különböző irányba mérik, előre haladó irányba (Forward Scatter), mely jelzi a sejt relatív méretét; illetve 90 fokba (Side Scatter), mely jelzi a sejt összetettségét. Detektálás céljából különböző fluoreszcens reagenseket alkalmaznak az áramlási citometriában, mint a DNS-kötő festékek, fluoreszcens konjugált antitestek, ionindikátor-festékek. Az elmúlt években azonban megnőtt a monoklonális antitestek konjugálásához használt fluorokrómok, valamint a fluoreszcensek (GFP, mCherry, mOrange) száma. Hatékony lehet az immunrendszer fertőző betegségekre, daganatokra adott válaszáinak tanulmányozásában, valamint különböző szilárd szövetek, tumorok sejtjeinek egyidejű elemzésére (18)

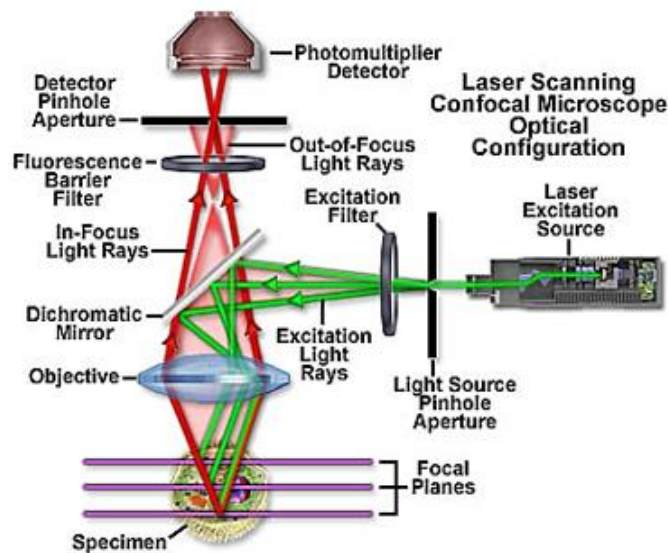


7. Ábra: Áramlási citométer felépítése

Forrás: <https://www.newport.com/n/flow-cytometry>

Konfokális mikroszkópia

A hagyományos fénymikroszkópok esetén a megvilágító fény a lehető legegyenletesebben jut át a mintán. A fókuszon kívüli fény elmosódást okoz a képen és ez csökkenti a felbontást. A konfokális mikroszkópia ezzel ellentétben fluoreszcensen megjelölt minták elemzésére igen hatékony (8. Ábra). Itt a látómezőben minden festékmolekula stimulálódik, ideértve a fókuszon kívül esőket is. A megvilágító és a detektáló optika is a minta ugyanazon pontjára fókuszál, mely az egyetlen olyan pont, amit a detektor leképez. Ahhoz, hogy teljes képet hozzunk létre a mintán át kell mozgatni és az adatokat pontról pontra gyűjteni (19)



8. Ábra: A konfokális mikroszkóp felépítése

Forrás:

<https://www.olympuslifescience.com/es/microscopresource/primer/techniques/confocal/c>

Direkt immunfluoreszcens jelölés

Az immunfluoreszcencia olyan hisztokémiai festési eljárás, mely az antigén-antitest kötődés létrejöttének megállapítására szolgál. Az antitest egy nagy molekulatömegű glikoprotein, amely specifikusan kötődik az ún. epitóphoz, vagy antigénhez. Ezen eljárásban az antigén és antitest kötődését mutatja ki az antitesthez kötött fluoreszcens festék. Két típusát tudjuk megkülönböztetni: a direkt és indirekt jelölést. A direkt jelölés esetén az epitópot specifikusan kötő antitest fluorofórral jelölik. Az indirektnél jelölés pedig az elsődleges antitest megköti az epitópot, majd a kötött antitestre specifikusan kötődő, fluorofórral jelölt másodlagos antitest kötődik az elsődlegeshez (20). Kísérleteim során a direkt jelölést használtam. A CD19 marker egy transzmembrán glikoprotein, amely a B sejtek felszínén található. Igen vonzó célpont a CAR-T sejt immunterápiák esetén, ugyanis a B limfocita rosszindulatú daganatok esetén következetesen és specifikusan expresszálódik, de a vérképző őssejteken nem (21).

Live-or-Dye alapú killing-assay

A T-sejtes killing-assay vizsgálatok a T-sejtek tumorölő képességének a mérésére szolgálnak. Segítségével megérthetjük az új immunterápiás szerek immunmodulátor hatását és új gyógyszerek hatékonyságát optimalizálhatjuk. A vizsgálat elvégzéséhez szükségünk van egy effektor és target sejtre. Többféle stratégia használható arra, hogy lehetővé váljon a tumorsejtek elpusztítása T-sejtek segítségével, egyik ilyen stratégia a tumor-specifikus CAR-T-sejtek használata. Az élő/halott sejtek detektálásához festési eljárást is alkalmazhatunk. A Live-or-Dye 640/662 egy olyan festék, amely képes behatolni az elhalt sejtekbe, melyek membránjai sérültek és kovalensen megjelölik az intracelluláris fehérjék szabad aminosavait. Ez a festés igen stabil, lehetővé teszi a sejtek fixálását anélkül, hogy a festék átvitelre kerül a sejtek között és a fluoreszcencia elvesszen. A folyamat kiértékelése történhet áramlási citometriával és konfokális mikroszkóppal is.

3. Célkitűzés

Távlati célunk az volt, hogy retrovirális transzdukció segítségével harmadik generációs, CD19 specifikus, zöld fluoreszcens fehérjével konjugált (sGPF) kiméra antigén receptort (CAR) és mCherry (piros fluoreszcens fehérje) konjugált KCa3.1 ioncsatornát ko-expresszáltassunk Jurkat limfocita sejtvonalban, ezáltal létrehozva az mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejteket. Majd meghatározzuk a transzdukciós hatékonyságot áramlási citométer segítségével. Emellett a CD19 pozitivitás ellenőrzésének szempontjából CD19 direkt jelölést alkalmazunk CD19⁺ (Raji) és CD19⁻ (Jurkat) sejteken egyaránt. A CD19 pozitivitás ellenőrzése kiemelten fontos, ugyanis a CD19⁺ Raji sejtek target sejtként szolgálnak a CD19 specifikus CAR-T sejtek számára. A KCa3.1 ioncsatorna CAR-T sejt effektor funkciójában betöltött szerepének tisztázása céljából Live-or-Dye alapú killing-assay módszert alkalmazunk TRAM34, KCa3.1 ioncsatorna gátlószer jelenlétben.

1. Retrovirális transzdukció:

- A pBMN-mCherry-KCa3.1 és a pBMN-sGFP-CD19-CAR ko-expressziója Jurkat limfocita sejtekben.
- A transzdukciós hatékonyságok meghatározása áramlási citométer segítségével történik FITC (sGFP) és TexasRed (mCherry) csatornában.

2. CD19 direkt immunofluoreszcens jelölés:

- CD19 sejtfelszíni marker pozitivitás ellenőrzése Raji és Jurkat sejteken Alexa647 konjugált anti-CD19 antitest segítségével direkt immunofluoreszcens jelöléssel.
- A folyamat kiértékelése áramlási citometriával történik, APC csatornában detektálva.

3. Killing-assay:

- Az általunk előállított CD19 specifikus, harmadik generációs CAR-T sejtek ölési képességének vizsgálatát Live-or-Dye alapú killing-assay segítségével végezzük el.
- Raji (CD19⁺) sejteket, mint target sejteket CAR-T effektor sejtekkel ko-inkubáltuk.
- A kívánt mintához 1 μM TRAM34, KCa3.1 ioncsatorna gátlószer adunk, a KCa3.1 ioncsatorna effektoros funkcióban betöltött szerepének tisztázása érdekében.

- Konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk, majd ImageJ szoftver segítségével meghatározzuk az ölési rátát, az összsejtszám, az sGFP pozitív (CAR-T) sejtek és Live-or-Dye pozitív (halott sejtek) számának definiálása által.

4. Anyagok és módszerek

HEK293T sejtvonala

Humán embrionális vese sejtvonala, melyet előszeretettel használnak kutatásokban. A sejteket DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) tápoldatban tenyésztettük, mely tartalmazott 10 % fetális szarvasmarha szérumot, 2mM végkoncentrációban Glutamax-ot, valamint 100 IU/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycin antibiotikumot. A sejteket inkubátorban tenyésztettük 5% CO₂ mellett 37 Celsius fokon felhasználásig.

Raji sejtvonala

Humán Burkitt Lymphoma sejtvonala, amit RPMI-1640 médiumban (tartalmaz: 10%-os fetális szarvasmarha szérumot, 2 mM Glutamax-ot, 100 µg/ml streptomycin és 100 IU/ml penicillint) tenyésztettük 5% CO₂ mellett 37 Celsius fokon felhasználásig.

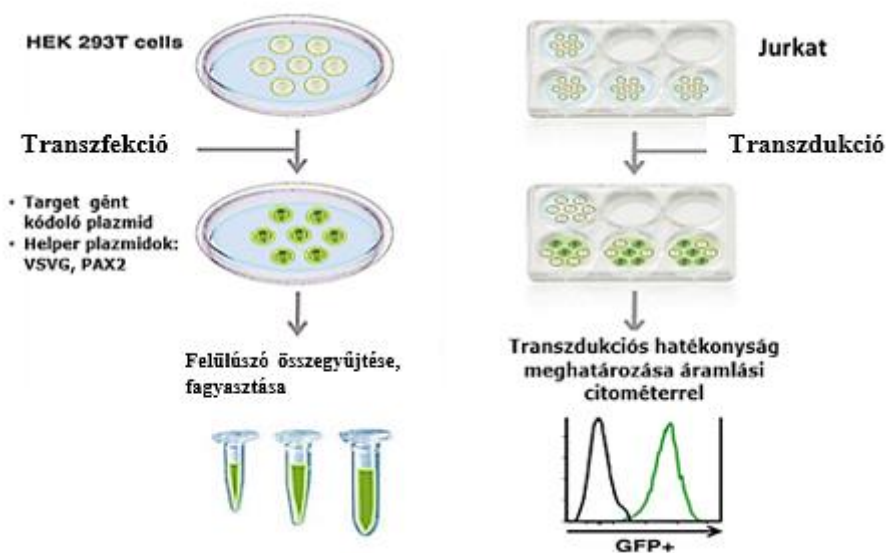
Jurkat sejtvonala

Humán leukémia örökített T-sejtvonala, amit előszeretettel használnak T-sejtes (pl.: jelátviteli folyamatok vizsgálata) és daganatellenes immunterápiák kutatásánál. Ezt a sejtvonalat RPMI-1640 médiumban (tartalmaz: 10%-os fetális szarvasmarha szérumot, 2mM Glutamax-ot, 100 µg/ml streptomycin és 100 IU/ml penicillint), inkubátorban tenyésztettük 5% CO₂ mellett 37 Celsius fokon felhasználásig.

Retrovirális transzdukció

A transzfekció előtt 72 órával 2×10^6 HEK293T sejtet rakunk ki 100mm-es sejtenyésző petribe. Majd mintánként 15ml-es csőbe összekeverünk Jetprime pufferrel az általunk expresszálni kívánt plazmid DNS-t, úgy, mint a pBMN-mcherry-KCa3.1 és pBMN-sGFP-CD19-CAR plazmidok DNS-ét, illetve a Pax2 és VSVG helper plazmidok DNS-ét. Mindegyikből 4 µg-ot használunk. Ezt követően a csöveket 10 másodpercig vortexeljük. Majd Jetprime reagenst adunk a mintákhoz, és 10 másodpercig vortexeljük, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezután az előkészített HEK293T sejtekre pipetázzuk a DNS mixet, majd 48 óráig

inkubáljuk. 48 óra elteltével a felülúszót egy fecskendő segítségével eltávolítjuk a HEK293T sejtekről, majd 0,45 mikronos filteren keresztül átszűrjük 15 ml-es csőbe. 24 lyukú non-tissue culture plate-re kirakjuk a célsejteket (5×10^5 sejt) 500 μ l médiumban szuszpendálva, majd hozzáadunk 500 μ l virális felülúszót (250 μ l pBMN-mcherry-KCa3.1-gyet és 250 μ l pBMN-sGFP-CD19-CAR-t). A sejtekre 2 μ l polybrene-t adunk, melyet 48 óráig tartó inkubáció követ, 37 C-on. A transzdukciós hatékonyságot NovoCyte típusú áramlási citométerrel határozzuk meg. Az élő sejtek alpopulációját előre-(FSC) és oldalrészórás (SSC) értékek alapján detektáljuk. Az sGFP-vel konjugált sejtek esetén FITC míg az mCherry esetén Texas Red csatornát használtunk. Az eredményeket hisztogram segítségével ábrázoltuk.



9. Ábra: A retrovirális transzdukció lépései

Forrás: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-1133-2_20

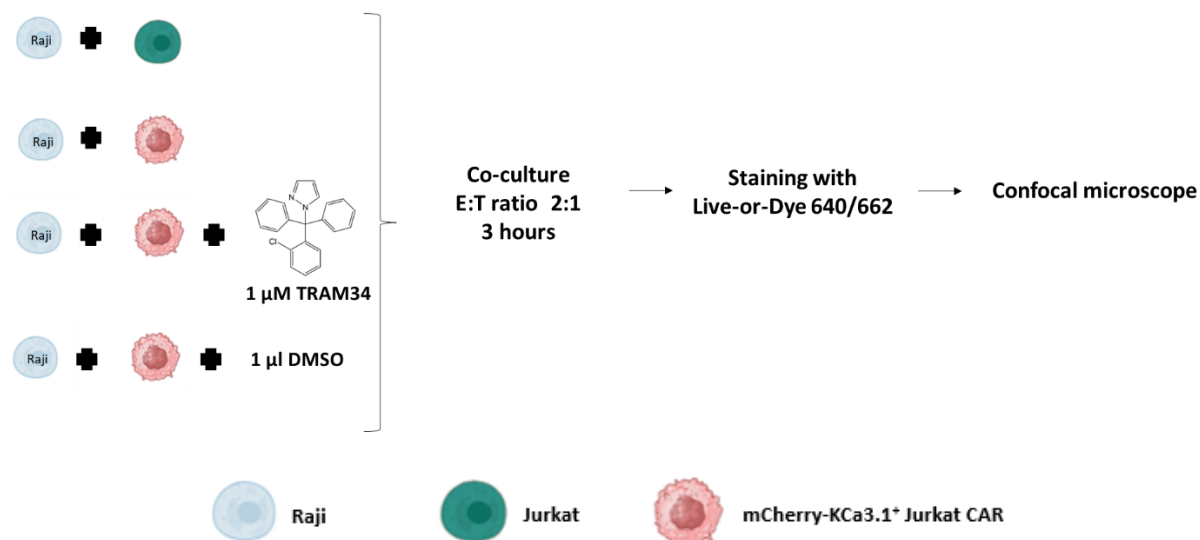
CD19 direkt jelölés

A PBS-sel lemosott sejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáljuk. 1×10^6 -on/100 μ l paraformaldehidet adunk a sejtekre, majd 10 percig sötétben, jégen inkubáljuk azokat. Ezt mosási lépés követi 1 ml hideg 1x PBS-sel, 400g-n, 4 °C-on, 5 percig centrifugáltatjuk. A folyamat végeztével a felülúszót eltávolítjuk és 100 μ l 10%-os BSA-PBS-t adunk a sejtekre. 100 μ l/1 μ g anti-CD16/CD32-t adunk a megfelelő sejtekre, amely gátolja az aspecifikus

interakciókat. Ezután ismét inkubáljuk 10 percig sötétben, jégen. Az inkubációt követően ismét mossuk PBS-sel és 400g-n 4 °C-on 5 percig centrifugáljuk, majd ismételtén 100 µl 10%-os BSA-PBS oldatot adunk a sejtekre. Ezután 100 µl koncentrációnként 5 µl egér anti-humán CD19 Alexa647 antitestet adunk a sejtszuszpenzióra és inkubáljuk 30 percig sötétben, jégen. Az inkubáció után következett egy mosási lépés, majd citometráshoz 300 µl PBS-t adunk a sejtekre és átpipettázzuk őket szorter csövekbe. A CD19 sejtfelszíni marker jelenlétét áramlási citométerrel detektáltuk, APC csatornában. Az eredményeket hisztogram segítségével ábrázoltuk.

Live-or-Dye alapú killing-assay

A killing-assayhoz 8 lyukú ibidi kamrát használtam, melyben összesen 6 mintát készítettem elő a kísérlet során. A CD19⁺ target Raji és a CD19-specifikus mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat-CAR effektor sejtekből álló ko-kultúrát 3 óráig szobahőmérsékleten inkubáltam. Az effektor-target sejtek aránya 2:1 volt a kísérlet során. A sejteket szintelen 10%-os FBS-RPMI médiumban szuszpendáltam. A KCa3.1 ioncsatorna CAR-T sejtek tumorölésben betöltött szerepének tisztázása érdekében a kívánt mintához 1µM TRAM34, KCa3.1 ioncsatorna blokkolót adtam. Kontrollként a Raji sejteket nem transzdukált Jurkat sejtek kokultúráját hoztam létre, továbbá a TRAM34 oldószerét, DMSO-t alkalmaztam. Az inkubálást követően Live-or-Dye 640/662 életképességi festéket adtam a mintákhoz, majd Nikon-STORM konfokális mikroszkóp segítségével konfokális felvételeket készítettünk az adott mintákról. Mivel effektor Jurkat sejteket sGFP és mCherry fehérjét expresszálnak, ezért az sGFP esetén 488 nm-es lézervonallal gerjesztettünk, emissziója 508 nm-nél volt detektálható, míg az mCherry esetén 561 nm-es lézervonallal gerjesztettük és az emissziója 610 nm-nél volt detektálható. A Live-or-Dye 640/662 festéket 640 nm-es lézervonallal gerjesztettünk és ennek az emissziója 662 nm-nél volt detektálható. A sejtek vizsgálatát 10x-es nagyítású objektív lencsével végeztük.



10. Ábra: Live-or-Dye alapú killing-assay.

A konfokális felvételeket ImageJ program segítségével értékeltük ki. Az adott mintáról készült felvételt Brightfield (összes sejt), sGFP + mCherry (mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR) és Live-Or-Dye (halott sejtek) csatornákra osztva vizsgáltuk meg. Megfelelő Threshold beállítása után, a felvételt binárisá alakítottuk, majd Watershed szerparálást végeztünk. Ezután az „Analyze particles” funkció segítségével meghatároztuk a csatornánkénti sejtszámokat. Ezek után kiszámoltuk az ölési rátát (killing rate) amelyet az alábbi módon kaptunk meg:

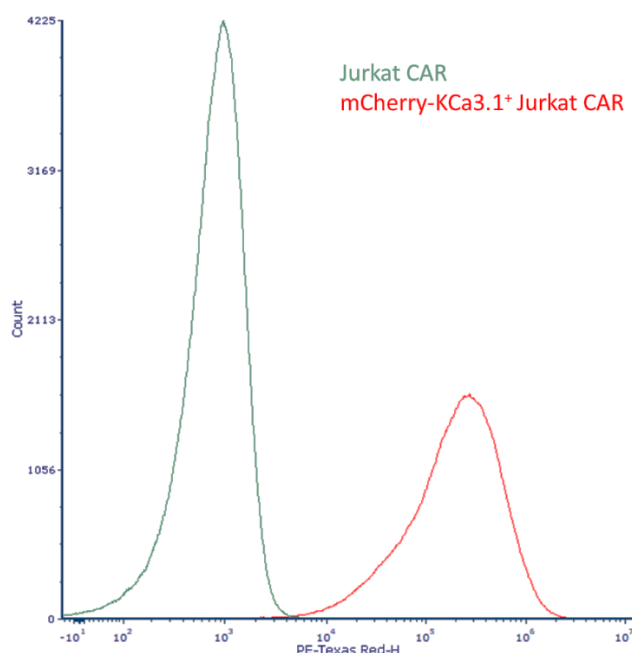
$$\frac{\text{halott sejtek száma}}{\text{összsejtszám} - \text{KCa3.1 Jurkat CAR sejtek száma}}.$$

A minták *in vitro* kapott numerikus értékeinek

összehasonlítására one-way ANOVA-tesztet alkalmaztunk. Minden statisztikai elemzést a GraphPad Prism 9.3.1 szoftverrel végeztünk. A $<0,05$ *p* értékeket statisztikailag szignifikáns különbségnek tekintettük. Az általunk kapott eredményeket hisztogram segítségével, átlag-SEM paraméterekkel ábrázoltuk.

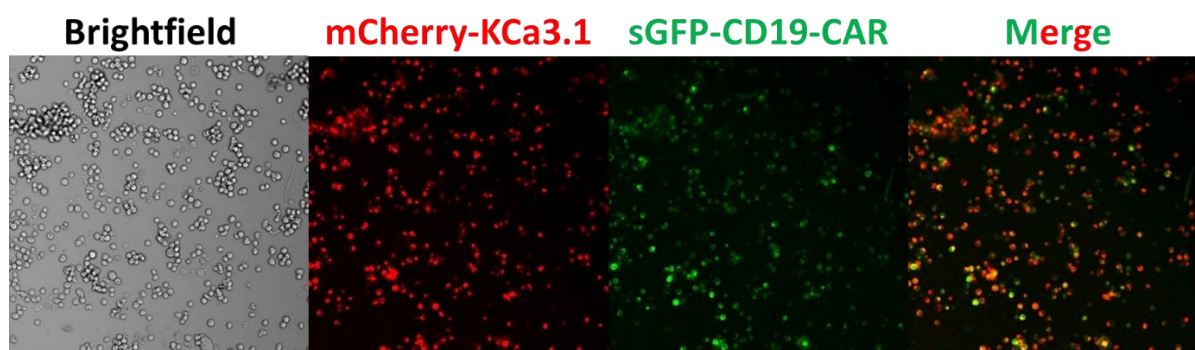
5. Eredmények

Először Jurkat sejtekben ko-expresszáltattuk az sGFP-CD19-CAR-t és a pBMN-mCherry-KCa3.1-et kódoló plazmidokat retrovirális transzdukciós módszerrel, majd a transzdukciós hatékonyságot áramlási citometriával mértük. Az sGFP-vel konjugált sejtek esetén FITC, az mCherry-vel konjugáltakat pedig Texas Red csatornákat használtunk (11. Ábra). A sejtpopulációra az élő sejtek, illetve a CAR⁺ sejtek kapuját alkalmaztuk, amelyet itt nem kívántunk feltüntetni. Látható, hogy a Jurkat CAR sejtek szinte teljes populációja expresszálja az általunk bevitt mCherry konjugált KCa3.1 ioncsatornát.



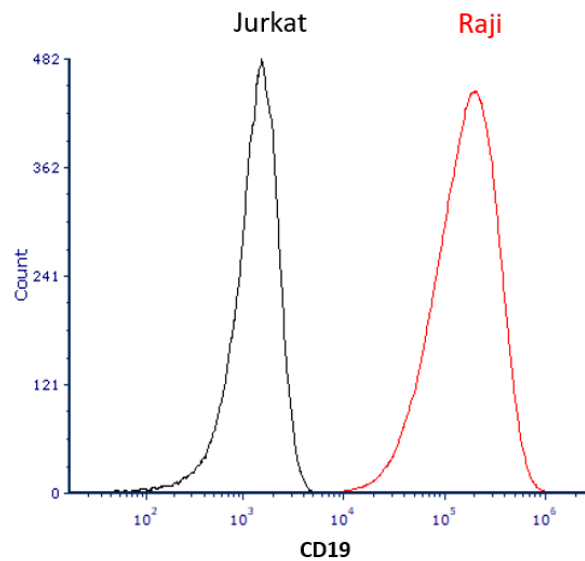
11. Ábra: Az mCherry-vel konjugált KCa3.1-et expresszáló Jurkat CAR és Jurkat CAR sejtek hisztogramja. Az ábra a Jurkat CAR és az mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR PE-TexasRED csatornában mért fluoreszcens intenzitást ábrázolja.

Az mCherry-KCa3.1 és az sGFP-CD19-CAR retrovirális transzdukció általi ko-expressziója detektálhatóvá vált konfokális mikroszkóp segítségével is. A 12. Ábrán jól megfigyelhető az mCherry-vel konjugált Ca²⁺-aktivált KCa3.1 ioncsatorna és a sGFP-vel konjugált kiméra antigén receptor ko-expressziója. Az mCherry esetében 561 nm-es lézervonallal gerjesztettünk és az emissziója 610 nm-nél volt detektálható, az sGFP esetén pedig 488 nm-es lézervonallal gerjesztettük, és az emissziója 508 nm-nél volt detektálható.



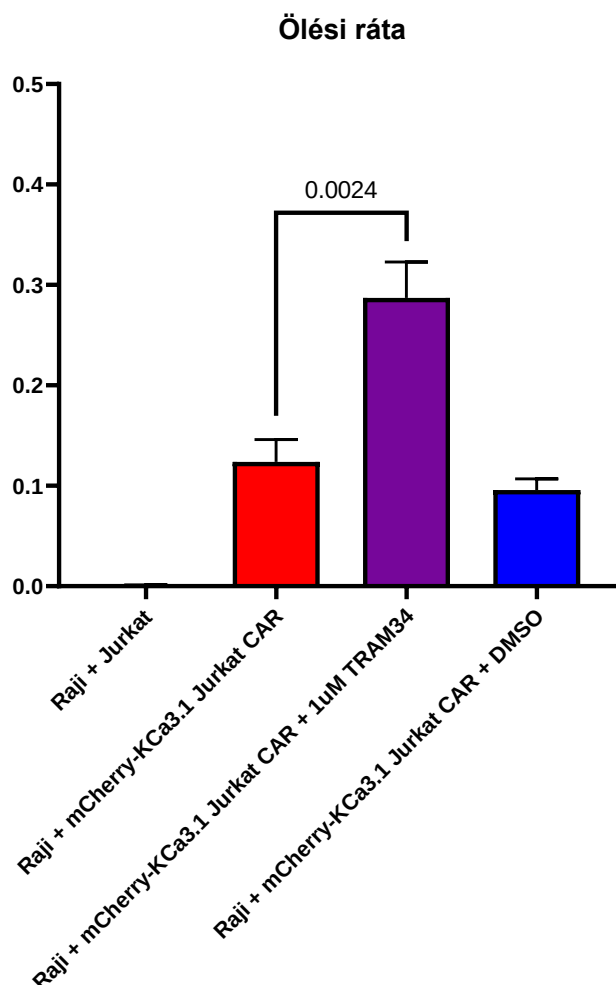
12. Ábra: Az mCherry-KCa3.1 és az sGFP-CD19-CAR ko-expressziójának konfokális mikroszkópos képe. Az ábrán látható az összes Jurkat sejt a transzmisszió esetén (Brightfield), az mCherry-KCa3.1-et expresszáló Jurkat sejtek (mCherry-KCa3.1), az sGFP-CD19-CAR-t expresszáló Jurkat sejtek (sGFP-CD19-CAR) és végezetül az mCherry konjugált KCa3.1 és sGFP-CD19-CAR-t expresszáló Jurkat sejtek együttese (Merge).

CD19 pozitivitás ellenőrzés céljából direkt immunofluoreszcens jelölést alkalmaztunk Alexa647 anti-CD19 antitest segítségével, Raji és Jurkat sejteken. Ez esetünkben azért volt szükséges, mivel az általunk előállított KCa3.1⁺ CAR-T sejtek CD19-specifikusak, ezért ennek céljából azonosítanunk kellett a CD19 sejtfelszíni marker jelenlétét az általunk választott sejteken, amelyek a további kísérletekben targetként szolgálhatnak. A CD19 marker jelenlétének azonosításához áramlási citométert alkalmaztunk, amely során a mérést APC csatornában végeztük. Sikeresen igazoltuk azt, hogy a Raji sejtek CD19 sejtfelszíni markert expresszálnak, ami megfelelő target sejtnek szolgál az általunk előállított KCa3.1⁺ Jurkat CAR effektor sejtek számára. A Jurkat sejtek negatív kontrollként szolgáltak, sikeresen validáltuk, hogy nem expresszálják a CD19 sejtfelszíni markert. Tehát Raji sejtek esetében CD19⁺, míg Jurkat sejtek esetében tehát CD19⁻ sejtekről beszélhetünk (13. Ábra).



13. Ábra: A CD19 marker pozitívításának validálása Jurkat és Raji sejteken áramlási citométerrel. Látható, hogy a Raji (CD19⁺) sejtek felszínén jelen van, míg a Jurkat (CD19⁻) limfocitákból hiányzik a CD19 sejtfelszíni marker.

Live-or-Dye alapú killing-assay-t alkalmaztunk az mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR tumorölő képességének vizsgálatának céljából TRAM34 ioncsatorna gátlószer jelenlétében (1 μ M), vagy anélkül. A target és effektor sejteket 2:1 E:T arányban 3 órán keresztül inkubáltuk, majd ezt követően Live-or-Dye 640/662 életképességi festéket adtunk a mintákhoz. Ezt követően konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. A Live-or-Dye festéket 640 nm-es lézervonallal gerjesztettük, és 662 nm-nél volt detektálható az emisszió, az mCherry esetén 561 nm-es volt a gerjesztési lézervonal, és az emissziót 610 nm-nél lehetett detektálni, az sGFP-nél 488 nm-es lézervonallal gerjesztettük és az emissziója 508 nm-nél volt detektálható. A felvételek segítségével ImageJ program által meghatároztuk az összsejtszámot, az mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejtek számát és a halott sejtek számát. Ezen sejtszámokból végezettül ölési rátát számoltunk, amely segítségével számszerűsíthetővé vált az általunk előállított CD19 specifikus, harmadik generációs mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejtek tumorölő képességének hatékonysága ioncsatorna gátlószer (TRAM34) jelenlétében. Ezen eredményeket hisztogram segítségével ábrázoltuk GraphPad Prism szoftver segítségével.



14. Ábra: A mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejtek ölési hatékonysága TRAM34 gátlószer jelenlétében és jelenléte nélkül. Látható, hogy az 1 µM TRAM34 alkalmazása szignifikánsan növelte az mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR ölési képességét.

A 14. ábra jól mutatja, hogy az mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejtek ölési hatékonysága szignifikánsan emelkedett ($p < 0,0024$) a TRAM34 (1 µM) KCa3.1 ioncsatorna inhibitor jelenlétében, a TRAM34 nélkül inkubált (Raji+mCherry-KCa.3.1 Jurkat CAR) mintához képest. A mérés során kontrollként szolgáltak a Raji és a nem transzdukált Jurkat sejtek, mely esetben nem történt antigén felismerés, ezáltal célsejt ölés sem. További kontrollként alkalmaztunk DMSO-val inkubált Raji és mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejtek ko-kultúrája is. Ez esetben a tumor ölési ráta nem változott Raji+mCherry-KCa.3.1 Jurkat CAR mintákhoz képest. Ezáltal elmondhatjuk, hogy a tumor ölés hatékonyságának növelése a TRAM34 hatása, nem az oldószer (DMSO) citotoxikus hatása.

6. Diskusszió

A T-sejtek aktivációjában, proliferációjában és a tumor-ölésében is fontos szerepet játszanak a kálium ioncsatornák, különös tekintettel a Ca^{2+} -aktivált KCa3.1 ioncsatorna. Funkciója, hogy káliumiont juttat ki a sejtől a membránpotenciál szabályozása érdekében. A T-sejtek génmanipulációjával létrehozott CAR-T sejtek képesek antigénprezentáció hiányában is a tumor felszínén található specifikus antigént felismerésére és a tumor eliminálására. Akárcsak a T-sejtek, úgy a CAR-T sejtek aktivációja esetén is szerepet játszanak a feszültségfüggő ioncsatornák. CAR-T sejt immunterápiák alkalmazása leginkább a hematológiai daganatok kezelésében ígéretes, azonban az elmúlt években a szolid tumorok elleni CAR-T terápia is a fókuszba kerültek.

A kutatás során a KCa3.1 ioncsatorna CAR-T sejtek effektor funkciójában betöltött szerepét vizsgáltuk. Live-or-Dye alapú killing-assay segítségével kimutattuk, hogy a CD19-specifikus, mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejtek felismerték a CD19 antigént a Raji (CD19⁺) sejtek felszínén és eliminálták a célsejtet. Továbbá megfigyelhető, hogy az 1 μM TRAM34, KCa3.1 inhibitorral történő gátlás szignifikánsan növelte a CAR-T sejtek tumor ölő képességét, melynek hátterében a sejten belüli Ca^{2+} -optimum változása állhat. Korábban kimutatták citotoxikus T-sejtek esetében, hogy az alacsony intracelluláris Ca^{2+} koncentráció (<300 nM) hozzájárul a célsejtekkel szembeni citotoxicitás serkentéséhez, míg a magas intracelluláris Ca^{2+} koncentráció (>300 nM) a migráció sebességét és a perzisztenciát növeli, azonban a célsejtekkel szembeni citotoxicitást csökkenti (22). Úgy véljük, hogy a KCa3.1 ioncsatornák gátlása hozzájárul ahhoz, hogy a sejten belüli Ca^{2+} -optimum a citotoxicitási tartományba tolódjon, azáltal, hogy a KCa3.1 gátlásával kevesebb Ca^{2+} jut ki az ER rendszerből, ami a mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejtek hatékonyabb daganatellenes válaszát eredményezi.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy 1) az mCherry-KCa3.1⁺ Jurkat CAR sejtek specifikusan felismerték a tumorsejtet és eliminálták azt, 2) a KCa3.1 csatornák gátlása hatékonyabb tumorölést segít elő. Következésképp elmondhatjuk, hogy ezen Ca^{2+} -függő KCa3.1 ioncsatornák működésének módosítása kulcsa lehet egy hatékonyabb CAR-T sejt immunterápiának, akár szolid tumorok kezelésében is.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozok Juszttus Vivien és Dr. Hajdu Péter Béla témavezetőimnek, hogy lehetővé tették számomra a laboratóriumi kísérletes munkába való betekintést, részvételt. Hálával tartozom továbbá Juszttus Viviennek, aki ezen dolgozat megírásához tanácsokkal, odafigyelésével és eszközeivel járult hozzá. Segítette az esetlegesen felmerülő elméleti kérdések megértését, a laboratóriumi munkák elsajátítását és a gyakorlatban felmerülő problémák megoldását.

Köszönöm továbbá a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet vezetőjének, Dr. Panyi György Professzor Úrnak, aki bizalommal fogadott a tanszéken.

Végezetül köszönöm a családomnak a türelmüket, amit tanulmányaim során nyújtottak.

9. Irodalomjegyzék

1. Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2015 Jul 1;10(7):1274–81.
2. Pabst R. The bone marrow is not only a primary lymphoid organ: The critical role for T lymphocyte migration and housing of long-term memory plasma cells. Vol. 48, *European Journal of Immunology*. Wiley-VCH Verlag; 2018. p. 1096–100.
3. Mortha A, Burrows K. Cytokine networks between innate lymphoid cells and myeloid cells. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
4. Kumar B V., Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. Vol. 48, *Immunity*. Cell Press; 2018. p. 202–13.
5. Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. Vol. 130, *Immunology*. 2010. p. 166–71.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J. Ion channels and the Electrical Properties of Membrane. *Mol Biol Cell*. 2002;
7. Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, et al. TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO Journal*. 2004 Jul 7;23(13):2684–95.
8. Teichert RW, Olivera BM. Natural products and ion channel pharmacology. Vol. 2, *Future Medicinal Chemistry*. 2010.
9. Agarwal JJ, Zhu Y, Zhang QY, Mongin AA, Hough LB. TRAM-34, a Putatively Selective Blocker of Intermediate-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels, Inhibits Cytochrome P450 Activity. *PLoS One*. 2013;8(5).
10. Lin Y, Zhao YJ, Zhang HL, Hao WJ, Zhu R Di, Wang Y, et al. Regulatory role of KCa3.1 in immune cell function and its emerging association with rheumatoid arthritis. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
11. Nicolaou SA, Neumeier L, Peng Y, Devor DC, Conforti L. The Ca²⁺-activated K channel KCa3.1 compartmentalizes in the immunological synapse of human T lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2007;292(6):1431–9. Available from: www.ajpcell.org
12. Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes. Vol. 231, *Immunological Reviews*. 2009. p. 59–87.

13. Alnefaie A, Albogami S, Asiri Y, Ahmad T, Alotaibi SS, Al-Sanea MM, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cells: An Overview of Concepts, Applications, Limitations, and Proposed Solutions. Vol. 10, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
14. Asmamaw Dejenie T, Tiruneh G/Medhin M, Dessie Terefe G, Tadele Admasu F, Wale Tesega W, Chekol Abebe E. Current updates on generations, approvals, and clinical trials of CAR T-cell therapy. Vol. 18, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Taylor and Francis Ltd.; 2022.
15. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. Vol. 11, *Blood Cancer Journal*. Springer Nature; 2021.
16. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. Vol. 17, *Cellular and Molecular Immunology*. Springer Nature; 2020. p. 807–21.
17. Simmons A, Alberola-Ila J. Retroviral transduction of T Cells and T cell precursors. In: *T-Cell Development: Methods and Protocols*. Springer New York; 2015. p. 99–108.
18. McKinnon KM. Flow cytometry: An overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Feb 1;2018:5.1.1-5.1.11.
19. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*. 2020 Mar 1;92(1).
20. Odell ID, Cook D. Immunofluorescence techniques. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013 Jan;133(1).
21. De Oliveira SN, Wang J, Ryan C, Morrison SL, Kohn DB, Hollis RP. A CD19/Fc fusion protein for detection of anti-CD19 chimeric antigen receptors. *J Transl Med*. 2013 Jan 29;11(1).
22. Zhou X, Friedmann KS, Lyrmann H, Zhou Y, Schoppmeyer R, Knörck A, et al. A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *Journal of Physiology*. 2018 Jul 15;596(14):2681–98.