**תקציר פגישת עבודה :**

מטרות המחקר: 1. לדעת לחזות אם אדם יגיב לטיפול TIL-ACT

2. לדעת איך להפוך לא-מגיב למגיב.

במחקר זה אנחנו עוסקים בחולי מלנומה, שלקחנו מהם דגימות סרטן וממנו הוצאנו את תאי מערכת החיסון – תאים שיכולים לזהות את הסרטן. את התאים האלה גידלנו והכפלנו בעזרת IL-2.

החולים מקבלים טיפול לימפודיפלציה (כימו בדרך כלל) לפני שמחדירים את תאי ה-T לגופם, כדי לאפשר לתאים הספציפיים לסרטן להיות דומיננטיים ולשרוד יותר זמן, מה שמגביר את האפקטיביות שלהם במלחמה בסרטן.   
אנחנו עשינו ריצוף סינגל-סל לתוצרים המוכנים להכנסה לחולים, אשר הוקפאו, ולאחר שראינו את תוצאת הטיפול, ידענו לקחת 4 תוצרים שהוכנסו לחולים שהגיבו לטיפול, ו4 תוצרים שהוכנסו לחולים שלא הגיבו לטיפול. כך שברשותנו ריצוף סינגל סל של תוצרי אינפוזיה של 4 מגיבים ו 4 מגיבים לטיפול.

התחלנו באינטגרציה של כל הדוגמאות לאובייקט אחד (לדעת להסביר על זה יותר), סינון תאים מתים ותאים כפולים, ונרמול של הדאטא.  
לאחר מכן, ביצענו צמצום מימדים בעזרת tSNE, אפיינו את הקלאסטרים וראינו שיש לנו אוכלוסייה מעניינת של CD4, ושני קלאסטרים חשובים של CD8 ציטוטוקסיים, שבהם יש יחסים לא מאוזנים בין מגיבים ולא מגיבים לטיפול. זה מצביע על סיכוי למצוא הבדלים משמעותיים בין התוצרים שהוכנסו למגיבים לבין אלה שהוכנסו ללא-מגיבים.  
  
הדבר הראשון הנראה לעין הוא ההבדל המשמעותי ביחס CD8/CD4 בין תוצרי המגיבים ללא-מגיבים.

בהמשך, ביצענו אנליזה ברזולוציה גבוהה יותר של אוכלוסיות ה-CD4 ו-CD8 בנפרד, כדי לאפיין כל אוכלוסייה בצורה יותר מדויקת.

לאחר מכן ביצענו אנליזה ברזולוציה גבוהה יותר של אוכלוסיית ה CD4 וה CD8 בנפרד, על מנת לאפיין בחדות הגבוהה ביותר.  
  
ראינו שבאוכלוסיית ה-CD4 יש קלאסטר שבו יש אוכלוסיית מגיבים בולטת, מה שעניין אותנו מאוד. אפיינו את הקלאסטר וראינו שהוא שייך ל-Tefm, מה שמצביע על כך שתאים במצב זה עשויים להגדיל את הסיכוי של חולה להגיב לטיפול.

באוכלוסיית ה-CD8, ראינו שהתאים בתוצרי המגיבים מבטאים מרקרים אפקטוריים באופן משמעותי יותר מאשר הלא-מגיבים.

בנוסף, ראינו שהתאים היו במצב כמו-גזע (ENTPD1 נמוך), תאים שמוכחים כקריטיים ליצירת תגובה מתמשכת לאורך זמן.

בנוסף, כשבדקנו גנים שמתבטאים באופן דיפרנציאלי בין מגיבים ללא-מגיבים, ראינו ש-CD40LG מתבטא בצורה משמעותית יותר בלא-מגיבים.

בנוסף, חתימת IFNG מתבטאת בצורה גבוהה יותר בתוצרי המגיבים באוכלוסיית ה-CD8.

השלב הבא בהעמקת האנליזה היה בבחינת דינמיקה בין תאים מקלאסטרים שונים (cell-cell interaction). השתמשנו בכלי (interflow) המאפשר הסקת אינטרקציות ליגנד-רצפטור בין קלאסטרים שונים. הקלאסטרים הכי מעניינים עבורנו הם 0 ו -2, ולכן בחנו את האינטרקציות ביניהם, וראינו כי .....

לסיכום, מצאנו מספר ממצאים מעניינים ביותר המפרידים בין תוצרי האינפוזיה של מגיבים ולא-מגיבים לטיפול.  
ראשית, יחס ה CD8/CD4 בתוצרים גבוה בהרבה במגיבים.  
שנית, תאי המגיבים היו מופעלים יותר. מרקרים כמו פרפורין, גרנזיים B, ifng.  
שלישית, הגן CD40LG התבטא משמעותית יותר בלא-מגיבים לעומת המגיבים. CD40 הוא רצפטור קו-הפעלתי, המשמש כיעד לאימונותרפיה, ובעל משמעות רבה במצב ההפעלה של תאי ה CD8 בTME.   
ישנם ממצאים נוספים אך אלה המשמעותים ביותר במחקר זה.

**English version :**

Work Meeting Summary:

Research Aims:

1. To predict whether an individual will respond to TIL-ACT therapy.

2. To determine how to convert a non-responder into a responder.

This study focuses on melanoma patients, from whom cancer samples were taken. Immune cells were isolated from these samples, meaning they are cancer-specific. These cells were cultured and expanded using IL-2.

The patients undergo lymphodepletion (usually chemotherapy) before the infusion of T cells to allow the cancer-specific T cells to become dominant in the body and survive for a longer period, enhancing their efficacy in combating the cancer.

We performed single-cell RNA sequencing on the infusion products prepared for the patients, which had been cryopreserved. After observing the treatment outcomes, we selected four infusion products that were used in patients who responded to the treatment, and four from patients who did not respond. Therefore, we have single-cell sequencing data for infusion products from four responders and four non-responders.

We began by integrating all the samples into a single object (further explanation can be provided), filtering out dead cells and doublets, and normalizing the data.

Subsequently, we performed dimensionality reduction using t-SNE, identified the clusters, and observed an interesting population of CD4 cells, along with two significant cytotoxic CD8 clusters (clusters 1 and 2), which showed an imbalanced distribution of responders and non-responders. This suggests a high likelihood of finding significant differences between the infusion products used in responders and those used in non-responders.

The most obvious difference is the significant variation in the CD8/CD4 ratio between the products of responders and non-responders.

Next, we conducted a higher-resolution analysis of the CD4 and CD8 populations separately to achieve the highest possible level of characterization.

We found that in the CD4 population, there was a cluster with a significant proportion of responders, which was of great interest to us. We characterized this cluster and identified it as Tefm, suggesting that cells in this state may increase the likelihood of a patient responding to treatment.

In the CD8 population, we observed that the cells in the infusion products from responders expressed effector markers much more significantly than those from non-responders.  
Additionally, these cells were in a stem-like state (low ENTPD1), which has been shown to be critical for sustaining a long-term immune response.  
We also found that when examining genes differentially expressed between responders and non-responders, CD40LG was expressed significantly higher in non-responders.  
Furthermore, the IFNG signature was expressed at significantly higher levels in the infusion products from responders, particularly in the CD8 population.  
  
The next phase of deepening the analysis involved examining cell dynamics between different clusters (cell-cell interaction). We used the tool Interflow to infer ligand-receptor interactions between different clusters. The most interesting clusters for us were clusters 0 and 2, so we examined the interactions between them and found that...

Conclusion:  
We identified several key findings that differentiate the infusion products of responders and non-responders.  
Firstly, the CD8/CD4 ratio was significantly higher in the infusion products from responders.  
Secondly, the responder T cells were more activated, as indicated by markers such as perforin, granzyme B, and IFNG.  
Thirdly, the gene CD40LG was expressed significantly higher in non-responders compared to responders. CD40 is a co-stimulatory receptor, a target for immunotherapy, and has great significance in the activation status of CD8 T cells in the tumor microenvironment (TME).

While there are additional findings, these are the most significant in this study.