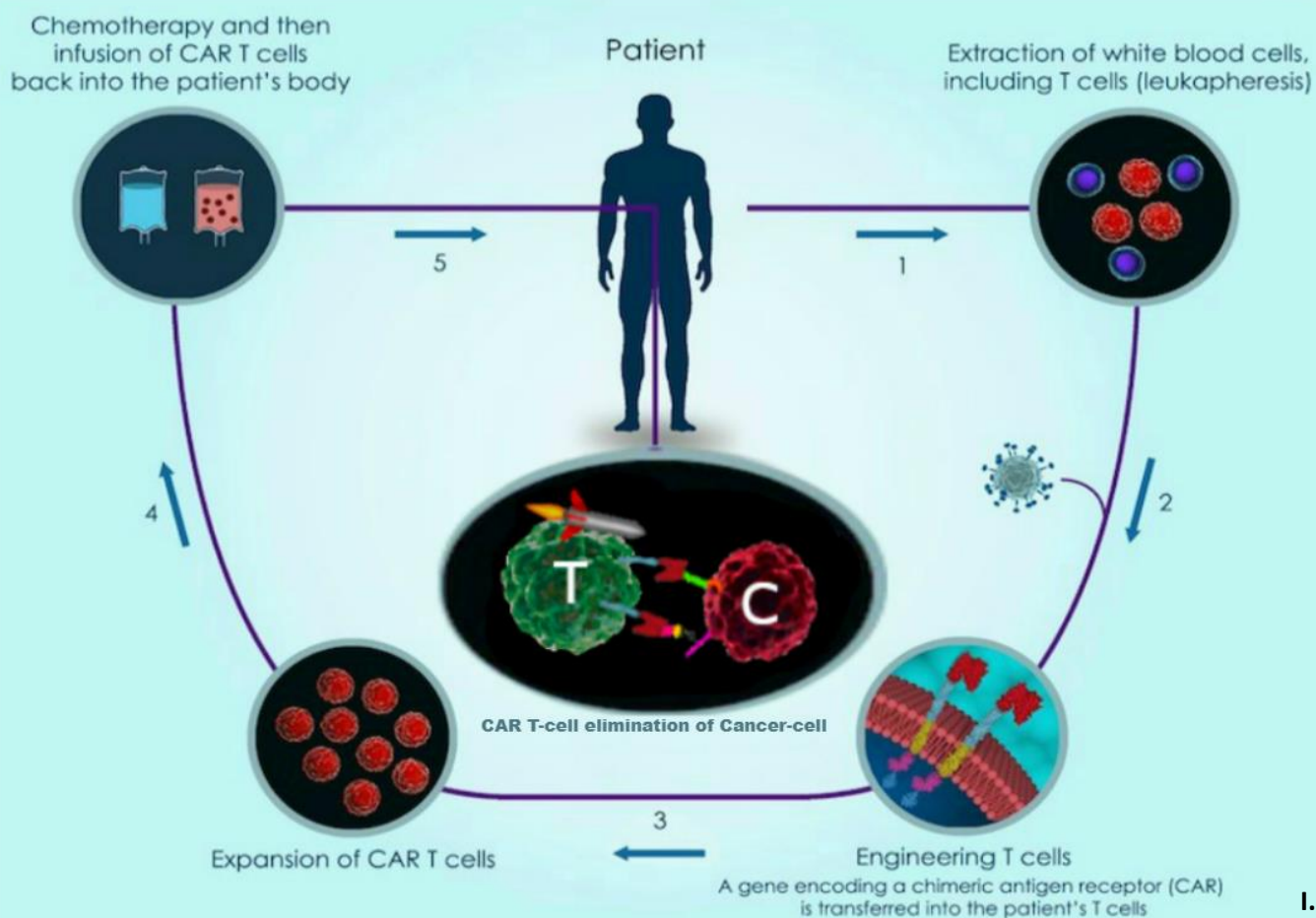


Ekstra sikkerhed til kræftmissil

Glykoproteinet Mesothelin og Glykoformen sialyl-Tn som kombineret-target for CAR T-celle terapi, i behandling af den solide kræftform Pancreatisk Adenokarcinom



Projekt Forskerspirer 2018 SUND

Max Stæhr Wraae
Middelfart Gymnasium

Forskerkontakt:
Catharina Steentoft, PhD.



Indholdsfortegnelse

Indledning	1
Afgrænsning af projekt	1
Formål og problemformulering	2
Metode og Teori	2
Immunohistokemi	2
Indirekte Immunofluorescence farvning	2
Primære-antistof	3
B1. Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	4
B2. Subcellulær co-localization ved fluorescensmikroskopi	5
B3. Mikroskopi af Tumorsnit	5
Plan	5
Forberedelse	5
Uge 1	5
Uge 2	6
Budget	7
Konklusion og perspektivering	8
Anerkendelse	8
Litteraturliste	9
Figurkilder	12
B Bilag	13
B1: Protocol 1 – Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)	13
B2: Protocol 2 – Subcellular Co-localization by Fluorescence Microscopy	14
B3: Protocol 3 – Immunofluorescence staining and Microscopy of Tumor Section	15
B4: Notes to protocols	16

Indledning

Chimeric Antigen Receptorer (CAR) er en ny teknologi der har revolutioneret behandling af kræft, ved at instruere T-celler til specifikke strukturer på overfladen af cancerceller og dermed udnytte T-cellernes fantastiske evne til at genkende, huske og eliminere skadelige celler. CAR teknologiens succes med behandling af blod canceren leukæmi^{1,2} medførte en international interesse i teknologiens potentiale i behandling af cancer. Men samme succes er endnu ikke blevet set med solide cancerformer, der har vist sig at være mere udfordrende³⁻⁷. Det skyldes især en øget cellulær heterogenitet, tumor mikroomgivelserne og mest af alt, manglende kendte cancer specifikke targets^{3,4,7-9}. Det som gør det muligt at behandle leukæmi med Car T-celler, er det cancer-associerede target CD19. CD19 er ikke kun udtrykt i leukæmi og andre hæmatologiske cancere men også på sunde B-celler. Dette medfører at CAR T-cellerne angriber både de raske B-celler og syge cancerceller, en såkaldt "on-target off-tumor" effekt. Heldigvis er B-celler undværlige ved medicinsk hjælp, og behandlingen har således reddet flere mennesker fra terminal leukæmi og er nu godkendt behandlingsform i USA. Emily, en af de første patienter der blev behandlet, modtog CAR T-celler i en alder af 6 år og er stadig i dag i en alder af 12 i live og rask med de selv samme CAR T-celler i blodet¹⁰.

Det blev hurtigt tydeligt at cancer-specifikke targets var vigtige for de potente CARs, for stor "off-tumor on-target" medførte bivirkninger som cytokine-release-syndrome (CRS) og neurotoxicitet^{11,12}. Resultatet heraf kunne blandt andet ses i 2010, hvor en patient omkom kort efter infusion af CAR T-celler til det cancer-associerede protein ErbB2⁹, hvor CAR T-cellerne angreb minimale mængder ErbB2 i lungerne. Problemet med at finde cancer-specifikke targets ligger i at cancerceller i bund og grund er vores egne celler. Det kræver at canceren har differentieret sig nok fra ens egne celler ved mutation, for at cancer-specifikke targets kan findes. Derfor er de fleste kendte targets cancer-associerede, som CD19, men CAR T-celle behandling mod cancer-associerede targets kan altså ende fatalt.

En måde at skabe mere specifikke CARs er at have mere end et target. CAR T-celler benyttet i dag er kun rettet mod et target, hvilket betyder at den enkelte CAR T-celle differentierer syge fra raske celler ud fra et antigen. Ved at have to targets i stedet for et, kan man lave en såkaldt "AND" gate, hvor begge valgte targets skal være udtrykt på cancercellen før CAR T-cellen angriber, altså et kombineret-target. Et CAR design med kombineret-target findes allerede i dag, og er designet ved at udtrykke to receptorer, der hver især ikke kan aktivere T-cellen, kun ved samtidig aktivering af receptorerne kan T-cellen aktivere, og dermed dræbe celler med begge targets udtrykt¹³.

Afgrænsning af projekt

Min forskerkontakt, Catharina, er ekspert indenfor glykoproteiner som targets for CARs rettet mod behandling af solide tumorer^{3,14}. Glykoproteiner er proteiner med påsatte sukermolekyler, der sidder på overfladen af celler. I cancer er disse sukermolekyler anderledes, ofte meget kortere end på normale celler og det gør dem til oplagte cancer targets. En af grundene til at denne atypiske glykolysering fremkommer på overfladen af cancer cellerne, er mutation af COSMC genet^{3,15}. I den solide kræftform Pankreatisk Adenokarcinom (PDAC) er en mutation af COSMC genet et tegn på at canceren fremskrider og dermed bliver mere aggressiv¹⁵⁻¹⁷, og her er specielt Tn og Sialyl-Tn (STn) O-glykan formene højt udtrykt.

Et andet target jeg faldt over da jeg undersøgte CARs, var det cancer-associerede antigen mesothelin (MSLN). MSLN er et celleoverflade glyko-fosfatidylinositol (GPI) -forankret protein¹⁸, der er stærkt udtrykt hos solide tumorer; herunder mesotheliom, PDAC, æggestok samt bryst¹⁹⁻²². MSLN er et af de mest undersøgte og benyttede tumor-associerede antigener til solide tumorer^{20,23}. MSLN findes på mesothelin celler, deraf

navnet, som dækker mange af de indre organer; herunder pleura, peritoneum og perikardium hos raske individer^{20,24-26}. I PDAC er MSLN udtrykt i ca. 71-87% af tumoren²².

Inspireret af Catharina har jeg derfor valgt at foreslå en CAR, der kræver både STn og MSLN i behandling af PDAC. STn kan være udtrykt på inflammert væv³ og MSLN ses på mesothelin celler derfor er STn og MSLN ikke sikre hver for sig som potente CARs med ét target.

Formål og problemformulering

Nærværende projekt fokuserer på at undersøge kombinerede-targets for CAR T-celle teknologien, med det formål at skabe sikre, men stadig effektive CAR T-celler. Dette er i dag ringe belyst, CAR T-celler i dag har generelt kun et target. For at rette fokus mod et kombineret-target, tages der udgangspunkt i to højt udtrykte cancer-associerede antigener, der på forhånd er undersøgt og bedømt værdig til behandling.

Formålet med dette projekt er derfor at undersøge; *"Glykoproteinet MSLN og glykoformen STn som kombineret-target for CAR T-celle terapi i behandling af den solide kræftform Pancreatisk Adenokarcinom"*

Metode og Teori

Som første skridt mod en MSLN/STn CAR T-celle skal jeg finde frem til hvorvidt celler fra PDAC-tumorer udtrykker både STn og MSLN. Hvis det viser sig at en stor del af cellerne i PDAC-tumoren udtrykker både STn og MSLN, vil det betyde at en MSLN/STn CAR T-celle vil være værd at teste. Omvendt hvis de celler der udtrykker MSLN er STn negative, eller omvendt vil det være dumt at gå videre med en MSLN/STn CAR T-celle.

Forsøget vil foregå i tre steps. Først, hvorvidt STn og MSLN udtrykkes på overfladen af de samme celler hos tre forskellige pancreas-cancercelle-linjer (*PANC-1, T3M4 og Capan-2*) ved flow cytometri. Derefter undersøges cellerne ved immunocytometri under et fluorescensmikroskop, for at bekræfte co-localization mellem de to antigener. Til sidst undersøges PDAC-tumorsnit for at forstå hvorvidt STn og MSLN er udtrykt i samme område af en reel tumor. Jeg har i samarbejde med Catharina udarbejdet tre protokoller, en til hvert step, der er tilpasset til hendes afdeling (*se bilag*).

Forsøget kræver faciliteter og apparatur til at dyrke samt analysere cancerceller. Catharina har dertil venligt ladet mig låne faciliteterne ved hendes afdeling i Mærsk Tårnet. De indeholder de tre nævnte pancreas-cancercelle-linjer, primære- og sekundære antistoffer til STn samt apparater til udførelse af eksperimentet. Der skal bestilles tumorsnit og sekundære- samt primære-antistof til MSLN.

Immunohistokemi

Teorien bag immunohistokemi (IHC) bygger på antistoffers specificitet samt affinitet og kemien bag fluorescens. Formålet med IHC er at få en given struktur på eller i celler til at fluorescere, så det senere hen kan analyseres. Indirekte Immunofluorescence farvning (IIF) er den mest benyttede metode indenfor IHC og bruges igennem hele projektet.

Indirekte Immunofluorescence farvning

Til IIF skal man først bruge et antistof der genkender den struktur, man ønsker at finde på cellen. Dette første antistof kaldes det primære-antistof og kan ikke fluorescere af sig selv. Der tilsættes derefter et sekundært antistof, der genkender det primære-antistofs Fc-region som en epitop. Dette sekundære-antistof kan fluorescere ved at være koblet til et molekyle der kan frembringe fluorescens. Molekylet der frembringer fluorescensen kaldes en fluorophore²⁷, der fluorescerer når belyst med bestemt bølgelængde af lys (se **Fig. 1**). Prøven inkuberes med hvert antistof i noget tid og ind imellem hver antistof-inkubation foretages en række vasketrin for at fjerne overskydende antistof som ikke er bundet^{28,29}.

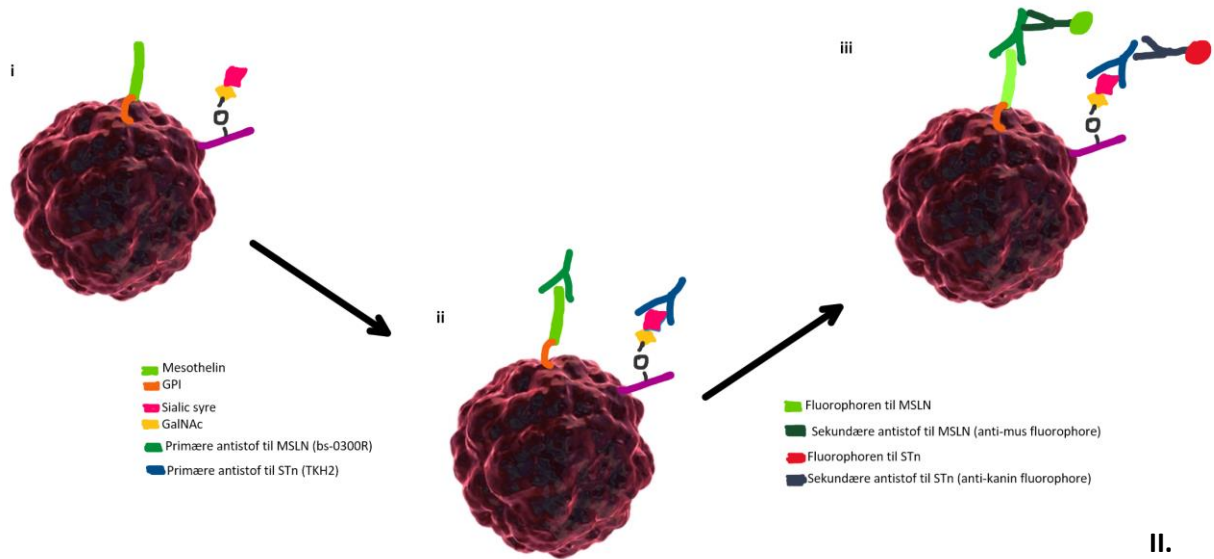


Fig. 1. Indirekte immunofluorescence farvning af PDAC-celler, med valgte primære og sekundære antistoffer. (i) PDAC-celle med MSLN og STn udtrykt på overfladen, (1) der tilsættes primære antistof til MSLN (bs-0300R) og STn (TKH2). (ii) De Primære antistoffer binder sig til MSLN og STn på overfladen af PDAC-cellen, (2) derefter tilsættes sekundære antistof til MSLN (anti-Rabbit IgG-AlexaFluor647) og til STn (anti-Mouse Ig-FITC) (iii) som til sidst binder sig til det primære antistofs Fc-region.

Primære-antistof

IIF afhænger af bindingen af de to antistoffer og kvaliteten af de valgte antistoffer er derfor kritisk for forsøget. Denne kvalitet afhænger af paratoppen, hvilket bestemmes af den variable Fab-region i spidserne af antistoffet. Det er derfor vigtigt, at antistoffets paratop genkender netop den struktur, man vil markere som en epitop.

Til IIF er Fc-regionen mindst lige så vigtig for forsøget. Det sekundære-antistof binder som sagt til det primære-antistofs konstante Fc-region. Fc-regionen er mere eller mindre ens indenfor hver art³⁰. For at kunne markere to strukturer på en gang kræver det derfor, at de primære-antistoffer er udvundet fra forskellige arter. Det primære-antistof til STn (TKH2) er udvundet fra mus og derfor har jeg valgt det primære-antistof til MSLN (bs-0300R) udvundet fra kanin for at sikre, at det sekundære-antistof til STn ikke binder sig til det primære-antistof for MSLN. De to sekundære-antistoffer fluorescens bestemmes af en fluorophore, der indeholder bestemte grupper og bindinger som kan fremmane fluorescensen når belyst med bestemt bølgelængde^{27 31}. Også her er det vigtigt ikke at vælge fluorophorer med overlappende bølgelængder.

Jeg har i samarbejde med Catharina udarbejdet tre detaljerede protokoller for forsøget som er vedlagt som Bilag 1-3. Da disse protokoller er skrevet som rigtige videnskabelige protokoller, har jeg desuden i Bilag 4 lavet en række noter, der uddyber og forklarer de trin som ofte bliver taget for givet af folk inden for feltet. Herunder beskriver jeg teorien ved de tre forskellige teknikker, jeg planlægger at benytte:

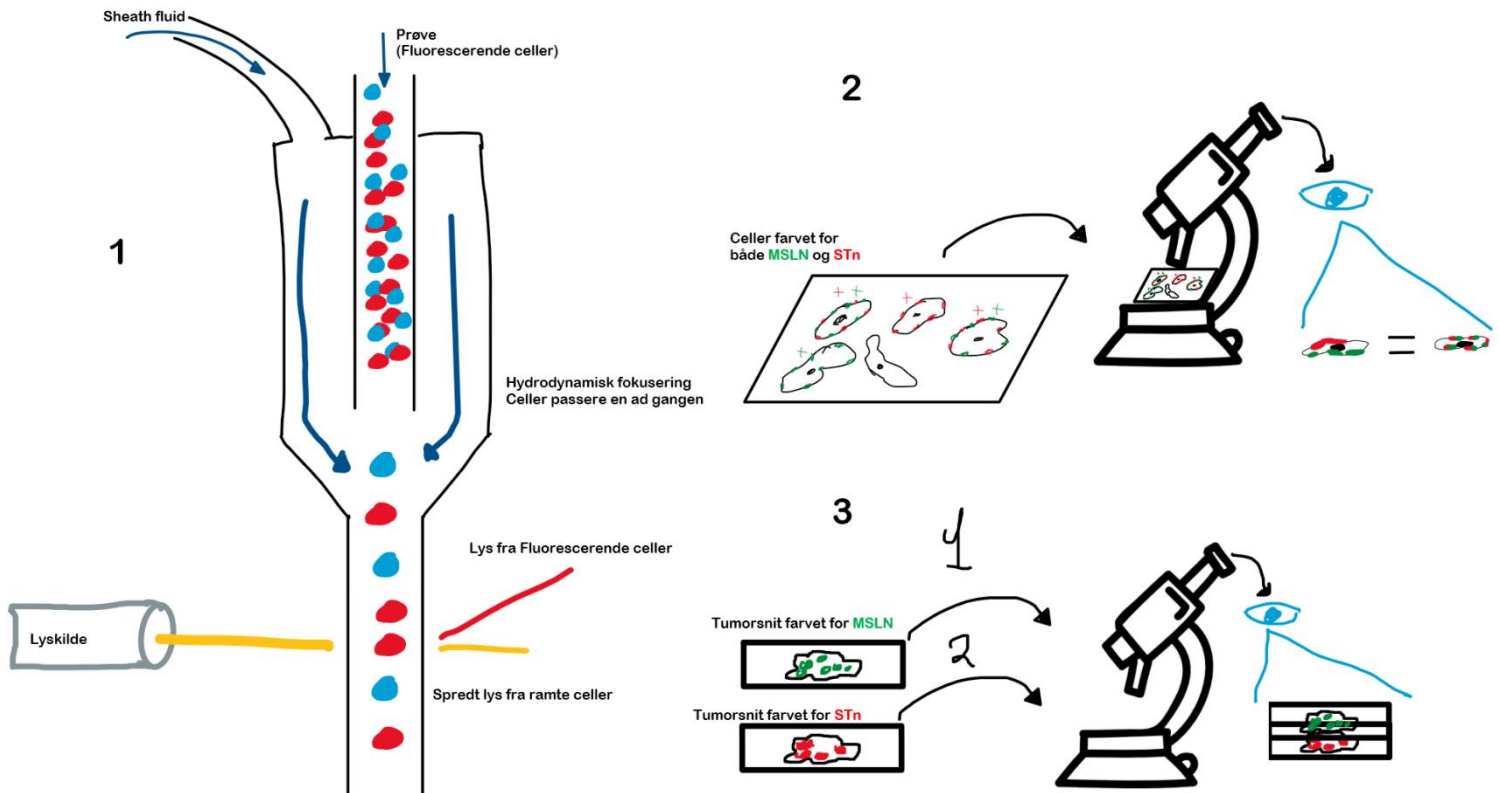


Fig. 2. (2-1) FACS, (2-2) Subcellulær co-localization ved fluorescensmikroskopi og (2-3) Mikroskopi af tumorsnit. (2-1) celle-prøven tilsættes FACS, når prøven møder sheath fluid forekommer der en hydrodynamisk fokusering der medfører at cellerne passere en og en igennem et tyndt rør. I røret vil cellerne hver især blive lyst på, lyset reflekteres tilbage af cellen samt fluorophoren som ændrer lysets bølgelængde. Reflekteret lys optages af en fotondetektor (2-2) Celler farvet for MSLN og STn optages ved fluorescensmikroskop, der viser prøvens fluorescens i hele området af hvert snit. Derfor kan der ikke skelnes om fluorescensen skyldes at STn og MSLN er udtrykt på samme områder af cellen. Her vist ved øjet der ikke ser forskel på cellen med MSLN og STn på hver sin side af cellen, og den med MSLN og STn udtrykt på samme områder af cellen (2-3) Tumorsnit farvet skiftevist med MSLN og STn optages ved fluorescensmikroskop, og resultaterne sættes sammen i rækkefølge af snittene for at skabe et 3D-billede af den farvede tumor, og se den lokale placering af de to targets MSLN og STn. Her vist med øjet som får billedet af tumorsnittene sat sammen i rækkefølge.

B1. Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

FACS detekterer og kan også separere celler i forhold til deres fluorescens, via. et instrument der hedder et flowcyto-meter (Fig. 2-1). Cellerne dyrkes og høstes således at man har en celle-suspension i væske, hvor cellerne flyder rundt enkeltvis. Denne cell-suspension tilsættes maskinen, som sætter væsken under tryk. Dermed vil cellerne føres igennem røret en efter en^{32,33}. I flowcyto-meteret vil cellerne nu blive lyst på hver især. De bliver lyst på af en eller flere lasere, og der måles på spredningen af det lys som bliver reflekteret tilbage fra cellen, heraf dens fluorescens^{2,34}. Resultaterne herfra kan til sidst ses på en computer, og således kan man analysere hvor mange celler der udtrykker STn, MSLN eller begge antigener.

B2. Subcellulær co-localization ved fluorescensmikroskopi

Her skal cellerne først dyrkes på coverslides, for at de senere kan analyseres i et fluorescensmikroskop (**Fig. 2-2**). I mikroskopet belyses hele prøven ensartet med lys på en bestemt bølgelængde. Bølgelængden matches fluorophore og bestemmes ved et filter foran lyskilden som ved diffraktion kun lader netop den bølgelængde igennem. Prøven vil dermed fluorescere når belyst og dens fluorescens optages af en fotondetektor med endnu et filter, der kun lader fluorescensens bølgelængde lyse igennem. I et standard fluorescensmikroskop vil alle dele af prøven i den optiske vej exciteres på samme tid, alt fluorescens af hele prøven optages derfor. Da celler ikke er i 2D, men 3D, og alt fluorescens fra hele prøven optages af mikroskopets fotondetektor, kan man ikke vide hvilket plan af *cellen* der forårsager den optagede fluorescens³⁵. Catharina mener dog ikke, at det er essentielt at få præcis co-localization men at metoden er tilstrækkelig til at se om MSLN og STn er udtrykt på de samme celler. Alternativt kan man udføre konfokal mikroskopi, hvor der kun optages lys fra det enkelte plan.

B3. Mikroskopi af Tumorsnit

Mikroskopi af tumorsnit giver et billede af hvordan de to markører er udtrykt lokalt i forhold til hinanden på en reel tumor (**Fig. 2-3**). Her tages tynde tumorsnit og markeres skiftevis for enten STn eller MSLN. Derefter kan de hver især ses på igennem et mikroskop, og placeringen af STn og MSLN i snittet kan ses. Ved at sammenligne de to snit kan man vurdere hvorvidt MSLN og STn er udtrykt i de samme områder af tumoren. Alternativt kan man inkubere et snit med begge antistoffer og deres respektive sekundære-antistof for at opnå et lignende resultat.

Tumorsnittene til forsøget er paraffin indstøbt, hvilket kan ændre epitopen. For at imødegå dette udføres *antigen retrieval*, hvor man koger snittene ved bestemt pH for at gøre epitopen mere synlig. Man kan også teste frysesnit, altså frossent væv som bevarer epitopen, men de snit er sværere at tilegne sig og arbejde med.

Plan

Eksperimentet kommer til at foregå over 2 uger i sommerferien 2019 (**Fig. 3**) i samarbejde med Catharina. Forsøget vil foregå på hendes afdeling: Copenhagen Center for Glycomics, Mærsk Tårnet 10. sal., 2200 København N Jeg, i mellemtiden, vil overnatte ved familie jeg har i København og omegn.

Forberedelse

Efter konkurrencen er der lang tid til at forsøget skal udføres. I mellemværende tid vil Catharina og jeg få styr på praktikaliteterne i forhold til forsøget, få bestilt tumorsnit og antistoffer til MSLN samt dyrket celle-linjer til forsøget. Ydermere teori i forhold til metoder og analyse heraf oplæses for at være sikker på, at jeg er i stand til at analysere og udføre eksperimentet.

Uge 1

Mandag skal jeg blive bekendt med omgivelserne samt klargøre vaske- og blokerings-buffer til farvning ved FACS. Tirsdag sker farvningen af cellerne og FACS-analyse af cellerne. Onsdag skal data analyseres, og forsøget justeres således at det kan gentages. Torsdag gentages analysen for at være sikker på at resultaterne er gentagelige. Fredag skal opnåede resultater analyseres, og celler dyrkes på coverslides til anden uge.

Uge 2

Uge 2 er delt op i 3 dele: De første to dage i ugen er sat af til co-localization ved fluorescensmikroskop, næste to til tumorsnit, og sidste dag til opsummering af data. Mandag skal coverslides fikseres, blokeres og primære-antistoffer tilsættes til over natten. Dagen efter tilsættes det sekundære-antistof, og der udføres mikroskopi, hvorefter resultaterne opsamles og gemmes. Onsdag afparafineres tumorsnittene primære-antistoffer tilsættes til over natten. Torsdag gentages proceduren fra tirsdag med coverslides, på tumorsnittene. Til sidst opsummeres data og en konklusion uddrages fra resultater.

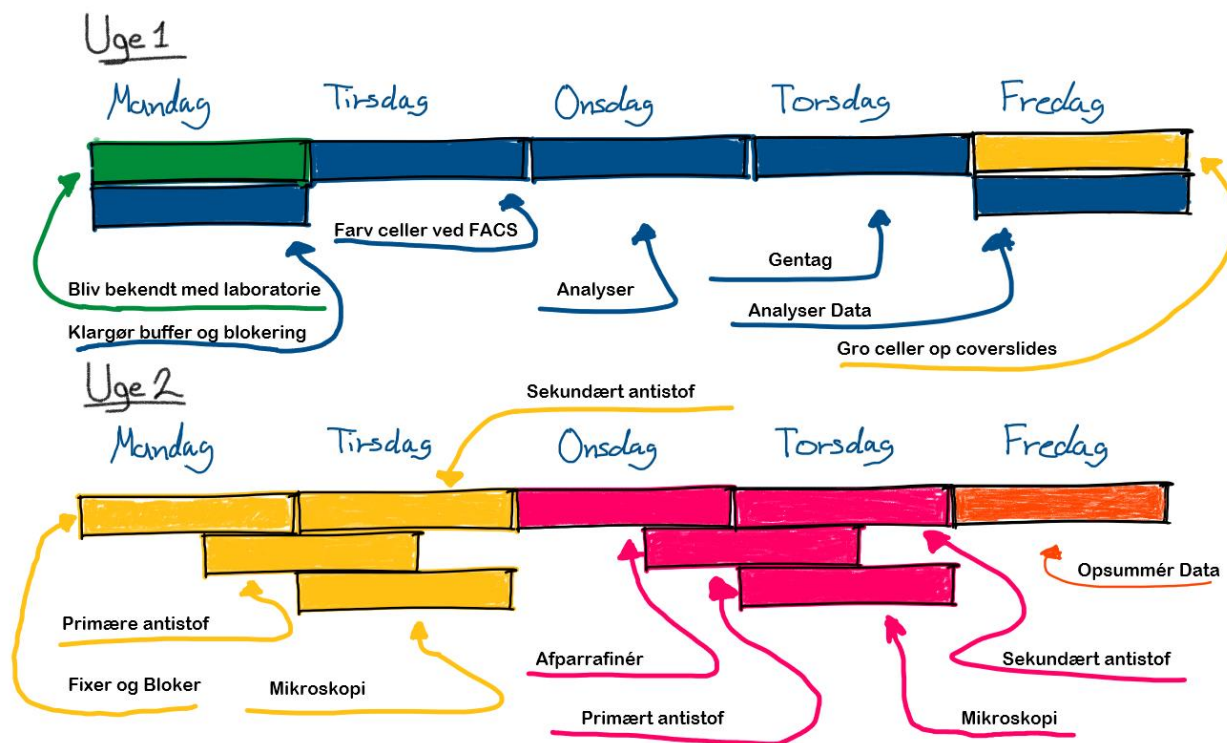


Fig. 3. Tidsplan for forsøg. Uge 1: skal jeg blive bekendt med omgivelserne (grøn) lave FACS (blå) og gro celler på coverslides til co-localization (gul). Uge 2: Co-localization (gul), tumorsnit (pink) og til sidst opsummering og analyser samt opsummering (orange)



Budget

Ved hjælp af Catharina har jeg formuleret budgettet nedenfor, hun har vurderet hvad brug af apparater og reagenser koster samt hjulpet med at finde frem til tumorsnit, primær- og sekundære-antistof til MSLN. Udover dette er transport til og fra afdelingen indregnet. Nedenstående priser er udregnet ud fra den udbetalte sum af præmiesummen på 20.000 kr., hermed menes der, at skat er fratrukket³⁶, hvilket i mit tilfælde svarer til en trækprocent på 39%.

Udgifter til eksperiment	Beskrivelse af udgiften	Kilde	Beløb (DKK)
Brug af apparater	Herunder FACS	Estimat Catharina	2500,00
Reagenser	Vaske- og Blokeringsbuffer, antistoffer til STn, monteringsmiddel osv.	Estimat Catharina	2500,00
Celle kultur	Dyrkning af celler	Estimat Catharina	2000,00
2x, Human Pancreatic Cancer Tissue Microarray, (PA242d)	Tumorsnit	³⁷	708,66*
Anti-Mesothelin Polyclonal Antibody	Primære-antistof til Mesothelin	³⁸	1797,43*
Goat Anti-Rabbit Ig, Human ads-Alexa Fluor®	Sekundære-antistof til Mesothelin	³⁹	869,72*
Levering, told og moms	Udgifter i sammenhæng med levering af tumorsnit og antistoffer til MSLN	Estimat Max	800,00
Summeret pris			11.175,81
*priser omregnet fra USD til DKK, den 16. oktober, 2018 med kurs 644,24 ⁴⁰			

Ekstra udgifter	Pris (DKK)
Rejseudgifter	1000
Skat (39% af 20.000)	7800

Resultat for forsøg	19.975,81 DKK
----------------------------	----------------------

Konklusion og perspektivering

På baggrund af resultaterne fra beskrevne eksperiment, kan det vurderes, hvorvidt en CAR T-celle der kræver både STn- og MSLN-antigener udtrykt på overfladen af cancer for aktiveringen vil være optimal i behandling af PDAC. På forhånd kan det ikke vides, hvorvidt de to targets er udtrykt på samme celler, dog forventer jeg at finde, at en stor del af cellerne i tumoren udtrykker begge targets. Resultaterne kan bruges i forbindelse med specificiteten samt designet af fremtidige CAR T-celler. Dermed kan kombinerede-targets være en alternativ løsning på højere specificitet og hermed på Off-Tumor On-Target.

Det er vigtigt at påpege, at resultaterne fra dette eksperiment kræver yderligere eksperimentel opbakning. Men håbet er, at eksperimentet vil øge interessen for højere specificitet af CAR T-celler, for det er lige meget hvor potente og udholdende CAR T-cellerne er, hvis de ikke er specifikke.

I et bredere perspektiv kan man forestille sig, at CAR T-celler med multiple targets er et lille skidt på vej mod personlig medicin, hvor man måske i fremtiden vil undersøge den enkelte patients tumor og lave special designede CARs til hver enkelt patient.

Anerkendelse

En stor tak til Catharina Steentoft for samarbejdet. Hendes vejledning har været uundværlig, og hun har altid formået at rette mig og vejlede uden at dirigere, hvilket jeg sætter meget pris på. Det har været en sjov og spændende oplevelse at få lov til at komme på afdelingen, se omgivelserne og allerede nu følge lidt med i hvordan immunohistokemi udføres i praksis. Jeg har fået en kæmpe respekt for det arbejde, hun udfører og det inspirerer mig til at gøre det samme.

Herudover vil jeg gerne sige tak til min rektor Christian Alnor, for muligheden for at deltage i dette projekt og til hjælp med rejseudgifter til og fra København.

Forskerkontakt:

Catharina Steentoft, Postdoc, Copenhagen Center for Glycomics, Københavns Universitet

Vejleder:

Christian Alnor, Rektor, Middelfart Gymnasium & HF



Litteraturliste

1. Brentjens, R. J. *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* **5**, 177ra38 (2013).
2. Im, A. & Pavletic, S. Z. Immunotherapy in hematologic malignancies: past, present, and future. *Journal of Hematology & Oncology* **10**, 94 (2017).
3. Steentoft, C. *et al.* Glycan-directed CAR-T cells. *Glycobiology* **28**, 656–669 (2018).
4. Knochelmann, H. M. *et al.* CAR T Cells in Solid Tumors: Blueprints for Building Effective Therapies. *Front Immunol* **9**, (2018).
5. Wang, Y., Luo, F., Yang, J., Zhao, C. & Chu, Y. New Chimeric Antigen Receptor Design for Solid Tumors. *Front Immunol* **8**, (2017).
6. Mirzaei, H. R., Rodriguez, A., Shepphird, J., Brown, C. E. & Badie, B. Chimeric Antigen Receptors T Cell Therapy in Solid Tumor: Challenges and Clinical Applications. *Front Immunol* **8**, (2017).
7. Li, J. *et al.* Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward. *Journal of Hematology & Oncology* **11**, 22 (2018).
8. Brudno, J. N. & Kochenderfer, J. N. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* blood-2016-04-703751 (2016). doi:10.1182/blood-2016-04-703751
9. Morgan, R. A. *et al.* Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. *Mol Ther* **18**, 843–851 (2010).
10. Five things you should know about CAR T-cell therapy \ CTCA. *CancerCenter.com* Available at: <https://www.cancercenter.com/discussions/blog/five-things-you-should-know-about-car-t-cell-therapy/>. (Accessed: 17th October 2018)
11. Bonifant, C. L., Jackson, H. J., Brentjens, R. J. & Curran, K. J. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics* **3**, 16011 (2016).



12. Teachey, D. T., Bishop, M. R., Maloney, D. G. & Grupp, S. A. Toxicity management after chimeric antigen receptor T cell therapy: one size does not fit 'ALL'. *Nature Reviews Clinical Oncology* **15**, 218 (2018).
13. Kloss, C. C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M. & Sadelain, M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol* **31**, 71–75 (2013).
14. Posey, A. D. *et al.* Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity* **44**, 1444–1454 (2016).
15. Hofmann, B. T. *et al.* COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Mol Cancer* **14**, (2015).
16. Remmers, N. *et al.* Aberrant expression of mucin core proteins and o-linked glycans associated with progression of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1981–1993 (2013).
17. Balmaña, M. *et al.* Analysis of sialyl-Lewis x on MUC5AC and MUC1 mucins in pancreatic cancer tissues. *Int. J. Biol. Macromol.* **112**, 33–45 (2018).
18. Chang, K. & Pastan, I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 136–140 (1996).
19. Lamberts, L. E. *et al.* ImmunoPET with Anti-Mesothelin Antibody in Patients with Pancreatic and Ovarian Cancer before Anti-Mesothelin Antibody-Drug Conjugate Treatment. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1642–1652 (2016).
20. Hassan, R. *et al.* Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time? *J Clin Oncol* **34**, 4171–4179 (2016).
21. biocart. What Is Mesothelin ? – Creative Biolabs CAR-T Blog.
22. Inaguma, S. *et al.* Comprehensive immunohistochemical study of mesothelin (MSLN) using different monoclonal antibodies 5B2 and MN-1 in 1562 tumors with evaluation of its prognostic value in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget* **8**, 26744–26754 (2017).



23. O'Hara, M., Stashwick, C., Haas, A. R. & Tanyi, J. L. Mesothelin as a target for chimeric antigen receptor-modified T cells as anticancer therapy. *Immunotherapy* **8**, 449–460 (2016).
24. Mutsaers, S. E. The mesothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 9–16 (2004).
25. Isaza-Restrepo, A., Martin-Saavedra, J. S., Velez-Leal, J. L., Vargas-Barato, F. & Riveros-Dueñas, R. The Peritoneum: Beyond the Tissue - A Review. *Front Physiol* **9**, 738 (2018).
26. Jaworska-Wilczynska, M., Trzaskoma, P., Szczepankiewicz, A. A. & Hryniewiecki, T. Pericardium: structure and function in health and disease. *Folia Histochem. Cytobiol.* **54**, 121–125 (2016).
27. Fluorophore. *Wikipedia* (2018).
28. Immunofluorescence: Tips for Immunostaining Cultured Cells. Available at: <https://www.ptglab.com/news/blog/immunofluorescence-tips-for-immunostaining-cultured-cells/>. (Accessed: 26th September 2018)
29. Immunolabeling - DK. Available at: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/labeling-your-samples/immunolabeling.html>. (Accessed: 26th September 2018)
30. Antibody. *Wikipedia* (2018).
31. Fluorescence. *Wikipedia* (2018).
32. Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C. & Boulanger, C. M. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* **64**, 109–130 (2012).
33. What is flow cytometry (FACS analysis)? Available at: <https://www.antibodies-online.com/resources/17/1247/what-is-flow-cytometry-facs-analysis/>. (Accessed: 5th October 2018)
34. Abbexa - Antibodies, Proteins, ELISA kits. *Abbexa* Available at: <https://www.abbexa.com/>. (Accessed: 10th October 2018)
35. Fluorescence microscope. *Wikipedia* (2018).
36. skat.dk: C.A.6.4 Gevinster og dusører. Available at: <https://skat.dk/skat.aspx?oid=1947456>. (Accessed: 23rd October 2018)



37. PA242c. *US Biomax* Available at: <https://www.biomax.us/tissue-arrays/Pancreas/PA242c>. (Accessed: 18th October 2018)
38. Mesothelin Polyclonal Antibody. *Bioss* Available at: <https://www.biossusa.com/products/bs-0300r>. (Accessed: 18th October 2018)
39. Alexa Fluor 647 Goat Anti-Rabbit Ig, Human Adsorbed | SouthernBiotech. Available at: <https://www.southernbiotech.com/?catno=4010-31&type=Polyclonal>. (Accessed: 18th October 2018)
40. Valutakurser.dk - Valutakurser, valuta, valutaomregner, valutakurs, dollar, euro, pund, yen. Available at: <https://www.valutakurser.dk/>. (Accessed: 18th October 2018)

Figurkilder

Billeder, på nær angivet, er tegnet af mig selv i Microsoft Notes.

- I. Billedet er hentet fra Shutterstock.com, og redigeret af mig selv ved hjælp af photoshop.
- II. Den røde celle fra billedet er hentet fra Shutterstock.com, resten er tegnet af mig selv ved hjælp af Microsoft Notes



B Bilag

B1: Protocol 1 – Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Procedure with notes:

1. Harvest cells by trypsin
2. Wash in Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x 5min.
3. Block in FACS buffer (2% Fetal bovine serum in PBS)
4. Add primary antibodies (IgG1 TKH2 to STn and IgG bs-0300R to MSLN) for 45 minutes on ice. In the first round three different concentrations will be tested to determine optimal concentration for double labeling
5. Wash cells 3x 5 min in FACS buffer
6. Add secondary antibodies (1 µg/ml, Goat anti-Mouse Ig-FITC and Goat anti-Rabbit IgG-Alexa Fluor647) and incubate 35 min on ice.
7. Wash cells 3x 5 min in FACS buffer
8. Analyze on Sony FACS SA3800 Spectral Analyzer

Experimental setup and expected outcome (x = positive staining), (→ = indicates what row is secondary- and primary-antibodies).

SECONDARY ↓	PRIMARY →	BS-0300R	TKH2	NEGATIVE	BS-0300R AND TKH2
ANTI MICE			X		X
ANTI RABBIT		X			X
NEGATIVE					
ANTI MICE AND RABBIT		X	X		X



B2: Protocol 2 – Subcellular Co-localization by Fluorescence Microscopy

1. Seed cells on sterile coverslips coated and cultivate 2-3 days (over the weekend).
2. Wash cells in cold phosphate buffered saline (PBS) 3x 5min
3. Fix in cold 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min. (Caution toxic!)
4. Wash in cold PBS, 3x 5min
5. Primary antibodies (IgG1 TKH2 and IgG bs-0300R) overnight 4°C in two different dilutions.
6. Wash in cold PBS, 3x 5min
7. Secondary antibodies (Goat anti-Mouse Ig-FITC and Goat anti-Rabbit IgG-Alexa Fluor647, 1µg/ml in 2.5% bovine serum albumin (BSA) /PBS is added and incubated for 45 min
8. Wash in cold PBS, 3x 5min
9. Mount with ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies).

Evaluation:

Zeiss Axioscope 2 plus with an AxioCam MRc (10x, 20x 40x) (color digital camera that at once captures actual colors i.e. green, brown, yellow).



B3: Protocol 3 – Immunofluorescence staining and Microscopy of Tumor Section

1. Deparaffinization (2x 10 min Tissue-Clear (Sakura), 1x 1/2/1 min 99% EtOH, 2x 1 min 96% EtOH, 1x 1min 70% EtOH,
2. Running distilled (DI) water 5 min
3. Antigen retrieval by microwave treatment (5 min at 600 w and 15 min at 300 w) at pH 6 (citrate buffer).

Cool for 15 minutes at room temperature (RT) then rinse in running DI water for 15 minutes.
4. Block in 10% calf serum, 20 min.
5. Incubation with primary antibodies (IgG1 TKH2 to STn and IgG bs-0300R to MSLN); at the concentration determined by coverslip staining in 0.1% BSA/PBS over night at 4°C
6. Wash in PBS 3x 5 min.
7. Incubation with secondary antibodies (concentration determined by coverslip staining (See protocol 2)) ((FITC Goat anti-Mouse IgG and Goat anti-Rabbit IgG-Alexa Fluor674) for 40 min at RT.
8. Wash in PBS 3x 5min.
9. Mounting media: Vectashield with DAPI (Vector labs, CA, USA).

Evaluation:

Zeiss Axioscope 2 plus with an AxioCam MRc (10x, 20x 40x) (color digital camera that at once captures actual colors i.e. green, brown, yellow).



B4: Notes to protocols

1. **Trypsin** is a protease (a protease breaks peptide bond), which is used in the process of “harvesting cells”. Trypsin is effective at resuspending cells adherent to the cell culture dish wall.
2. **Phosphate buffered saline (PBS)**, a balanced salt solution and buffer which stabilizes pH, ion concentration and osmolarity of sample. PBS secures the pH and osmolarity at a level necessary to maintain and keep cells healthy.
3. Washing is done to remove possible sources of noise that may obfuscate results.
4. **FACS buffer** is used to resuspend cells where extracellular structures have to be stained, here MSLN and STn.
5. Adding or keeping cells cold ensures that the targets (MSLN and STn) aren't modulated.
6. The washing is done in FACS buffer to ensure blocking and remove possible sources of noise that may obfuscate results
7. **Paraformaldehyde (PFA)** is used as a fixative, however PFA is not a fixative by itself, formaldehyde is. PFA is the polymerization product of formaldehyde. The depolymerization of PFA will be done just right before use, by diluting PFA in distilled water and heat treating it.
8. **Bovine Serum Albumin (BSA)** is used as a blocker, which binds to nonspecific binding sites and prevent that primary or secondary antigens do so.