

Poster 29 Etablierung eines stabilen Knockdowns des MACC1-Onkogens in patientenabgeleiteten Ovarialkarzinom-Organoiden

Sophia Hierlmayer¹, Liliia Hladchenko¹, Juliane Reichenbach¹, Christoph Klein², Sven Mahner¹, Fabian Trillsch¹, Mirjana Kessler¹ und Anca Chelariu Raicu¹

¹Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, LMU Klinikum München, Deutschland

²Abteilung für Pädiatrie, Dr. von Hauner Kinderspital, LMU Klinikum München, Deutschland

Das High-Grade Seröse Ovarialkarzinom (HGSOC) ist die tödlichste gynäkologische Krebserkrankung, weshalb ein tiefgehendes Verständnis der Mechanismen der Tumorprogression von entscheidender Bedeutung ist. Patientenabgeleitete 3D-Ovarialkarzinomorganoide (HGSOC PDOs) stellen ein translationales Modell dar, das die molekulare Heterogenität und das Mutationsprofil des Tumors in vitro präzise widerspiegelt. Die lentivirale Transduktion bietet ein vielversprechendes funktionelles Modell, um den Einfluss einer veränderter Genexpression auf die Tumorbiologie und potenzielle Biomarker in HGSOC PDOs patientenspezifisch zu untersuchen. Die stabile Integration genetischen Materials in die Zelle ermöglicht eine kontrollierte Expression spezifischer Zielgene. Aufgrund der variablen Effizienz der Transduktion entstehen unterschiedliche Expressionslevel, wodurch der Effekt der Gene auf den Phänotyp oder die Resistenzentwicklung in verschiedenen Linien verglichen werden kann.

In diesem Protokoll präsentieren wir ein innovatives und detailliertes Protokoll zur stabilen genetischen Modifikation von HGSOC PDOs mittels lentiviraler Transduktion. Zur Validierung des Protokolls wurde exemplarisch ein Knockdown (KD) des Onkogens *Metastasis-Associated in Colon Cancer 1* (MACC1) in zwei HGSOC PDO-Linien durchgeführt. Hierzu wurden Organoide zu Einzelzellen vereinzelt und unter drei verschiedenen Konditionen (shMACC1, shControl und Mock) über 20 Stunden mit lentiviralen Vektoren, welche eine Resistenzgen tragen, inkubiert. Nach dem Entfernen der Viren erfolgte die 3D-Kultivierung der Zellen, gefolgt von einer kurzen Erholungsphase und anschließender Selektion mit Puromycin. Der Knockdown wurde durch qPCR und Western Blot überprüft und bestätigt.

Die resultierenden MACC1-defizienten Organoid-Linien zeigten eine stabile Herunterregulation des MACC1-Gens über mindestens drei Monate in Langzeitkultur. Die langfristige Stabilität des Knockdowns wurde durch Western Blot nach zwei Monaten sowie durch wiederholte RT-qPCR nach einem, zwei und drei Monaten nach Transduktion verifiziert (KD-Effizienz $\geq 72\%$).

Dieses Protokoll beschreibt eine effiziente und leicht umsetzbare Methode zur gezielten Regulation der Genexpression in HGSOC PDOs. Es bietet eine wertvolle Möglichkeit, die Funktion einzelner Proteine in Resistenzmechanismen zu untersuchen und ergänzt andere genetische Manipulationsverfahren wie die CRISPR-Editierung.

