
AKADEMİK PERSPEKTİFTEN MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

Editör: Prof.Dr. Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI



yaz
yayınları

Akademik Perspektiften Moleküler Biyoloji ve Genetik

Editör

Prof.Dr. Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI

yaz
yayınları

2025

**Akademik Perspektiften Moleküler
Biyoloji ve Genetik**

Editör: Prof.Dr. Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI

© YAZ Yayınları

Bu kitabın her türlü yayın hakkı Yaz Yayınları'na aittir, tüm hakları saklıdır. Kitabın tamamı ya da bir kısmı 5846 sayılı Kanun'un hükümlerine göre, kitabı yayınlayan firmanın önceden izni alınmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemiyle çoğaltılamaz, yayınlanamaz, depolanamaz.

E_ISBN 978-625-5596-55-0

Haziran 2025 – Afyonkarahisar

Dizgi/Mizanpaj: YAZ Yayınları

Kapak Tasarım: YAZ Yayınları

YAZ Yayınları. Yayıncı Sertifika No: 73086

M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar/AFYONKARAHİSAR

www.yazyayinlari.com

yazyayinlari@gmail.com

info@yazyayinlari.com

İÇİNDEKİLER

Bitkilerde Bazı Metal Stresine Karşı miRNA’ların Rolü.....	1
<i>Mustafa AKÇAY</i>	
Analysis of Some miRNA’s Effects on Anoikis Resistance in Several Cancer Cells Under Suspension Conditions	19
<i>Muzaffer DÜKEL</i>	
İn Vitro Modeller: 3 Boyutlu Hücre Kültürü Tekniklerine Yaklaşımlar	43
<i>Cesur KIRMANOĞLU</i>	

"Bu kitapta yer alan bölümlerde kullanılan kaynakların, görüşlerin, bulguların, sonuçların, tablo, şekil, resim ve her türlü içeriğin sorumluluğu yazar veya yazarlarına ait olup ulusal ve uluslararası telif haklarına konu olabilecek mali ve hukuki sorumluluk da yazarlara aittir."

BİTKİLERDE BAZI METAL STRESİNE KARŞI miRNA'LARIN ROLÜ

Mustafa AKÇAY¹

1. GİRİŞ

Yaşamın dört ana makromolekülünden biri olan RNA, genlerin ifadesi ve düzenlenmesinde esastır. RNA, kodlayan ve kodlamayan olmak üzere iki gruba ayrılır. Bitkiler, 24 nükleotidlik küçük girişimci RNA'lar (siRNA) ve 21 nükleotidlik küçük kodlamayan mikroRNA'ların (miRNA), en yüksek ifade bolluğuna sahiptir. siRNA'lar ilk olarak bitkilerde keşfedilmiştir ve bitkilerde transkripsiyonel gen susturulması ve transkripsiyon sonrası gen susturulması yolağında rol oynarken, hayvanlarda ise RNA interferans yolağında rol oynamaktadır (Hamilton ve Baulcombe, 1999; Elbashir ve ark., 2001; Sijen ve ark., 2001; Pal-Bhadra ve ark., 2002). miRNA'lar ise ilk olarak 1993 yılında keşfedilmiş ve tanımlanan ilk miRNA olan lin-4, *Caenorhabditis elegans* adlı toprak solucan üzerinde yapılan bir çalışmada bulunmuştur (Lee ve ark., 1993; Stricklin ve ark., 2005). miRNA'lar, ortalama 18-24 nükleotid uzunluğuna sahip, küçük, protein kodlamayan RNA moleküllerinin kapsamlı bir sınıfıdır (Min ve Chen, 2013). Olgun miRNA'lar bitkilerde transkripsiyon, öncül işleme, metilasyon ve miRNA kaynaklı susturma kompleksinin birleştirilmesi dâhil olmak üzere çok aşamalı bir süreçle üretilir. miRNA'ların birincil görevi hedef mRNA'ların çevirisine müdahale etmek veya hedeflerinin bozunmasını teşvik etmektir (Mladinov ve ark., 2013). Bununla

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Kars Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Biyokimya Programı, mustafaakcay@kafkas.edu.tr, ORCID: 0000-0003-1747-2314.

beraber miRNA'lar, hücre farklılaşması ve çoğalması, apoptoz gibi çeşitli hücre sinyal yollarını etkileyebilen birçok ilgili genlerin ifadesini destekleme veya engelleme yeteneğine de sahiptir (Vasudevan ve ark., 2007; Budhu ve ark., 2010).

2. miRNA ve METAL STRESİ

miRNA çalışmalarının son dönemlerde artmış olması, miRNA'ların bitkilerde doku farklılaşması ve gelişiminde, fitohormon sinyalizasyonunda, ikincil metabolit üretiminde ve abiyotik ve biyotik streslere karşı yanıtta önemli derecede rollerinin olduğunu göstermektedir (Khraiweh ve ark., 2012; Shriram ve ark., 2016). miRNA'lar, aşağı veya yukarı ifadelerini düzenleyerek bitki büyüme ve gelişimi ile strese verilen yanıtın birden fazla sürecini etkilerler (Valinezhad ve ark., 2014). Örneğin; miRNA319 ile yapılan bir çalışmada miRNA319'un ifadesinin yukarı doğru düzenlenmesi ilgili domates bitkisinin yaprağının boyutu ve şeklinde önemli değişikliklerin gerçekleşmesine yol açtığı açıklanmıştır (Ori ve ark., 2007). miRNA'lar bitkilerin kök oluşumu ve çiçek gelişiminde rol oynarlar. miRNA167'nin kök oluşumunda aktif bir rol oynadığı, miRNA156 ve miRNA172'nin ise çiçek kontrolünde görev aldığı doğrulanmıştır (Zhu ve ark., 2011; Yu ve ark., 2012).

Farklı mahsul bitkilerinde (Arpa, buğday, mısır, pirinç vs.) miRNA'lar farklı abiyotik (ısı, soğuk, kuraklık, tuzluluk vs.) ve biyotik (patojenler vs.) stres faktörleri sırasında gen ekspresyonunu düzenlerler ve bitki büyümesi ve gelişimine ek olarak stres toleransı kazandırmada da önemlidirler (Manavella ve ark., 2019). Örneğin; *Arabidopsis* bitkisi ile yapılan bir çalışmada miR398'in ifadesinin artmasının hedef genlerinin *CSD1*, *CSD2* ve *CSD*'nin bakır şaperonunun (*CCD*) ifadesini olumsuz yönde düzenleyerek bitkide ısı toleransını artırdığı bildirilmiştir (Guan ve ark., 2013). Benzer şekilde pirinç (*Oryza*

sativa) ve transgenik sürünen eğrelti otu (*Agrostis stolonifera*) ile yapılan çalışmada Osa-miR319a'nın aşırı ifadesinin, TCP transkripsiyon faktörünü düzenleyerek tuz ve kuraklık stresine karşı daha yüksek tolerans gösterdiği bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2013).

miRNA ile ilgili elde edilen bulgular ağır metal düzenleyici ağlarda da miRNA gen düzenlenmesinin önemli rolünün olduğunu ortaya koymaktadır. Hardal (*Brassica juncea* L.), pirinç (*Oryza sativa* L.), arpa (*Hodeum vulgare* L.), mısır (*Zea mays* L.), yonca (*Medicago truncatula* L.), asma (*Vitis vinifera* L.) ve diğer birçok bitkide ağır metale duyarlı miRNA'lar tanımlanmıştır (Liu ve ark., 2015; Du ve ark., 2021). Birçok miRNA'nın hedef genlerinin analizi yoluyla ağır metal stresine (Al, Cd, Cu, As, Cr, Hg vs.) karşı verdiği yanıtta yer aldığı belirtilmiştir (Min ve Chen, 2013). Son dönemde ağır metal ve miRNA'lar üzerine yapılan çalışmalar artmakta ve yeni nesil dizileme gibi ileri teknolojiler kullanılarak metal stresine yanıtta bilinen çok sayıda miRNA tanımlanmıştır. Fakat bitkilerde hala metal stresi iletiminde miRNA'ların işlevleri hakkında yapılan çalışmalar belirsizliğini korumaktadır. Dolayısıyla bu bölümde bitki de bazı metal streslerine (Cd, Al, Mn, As ve Cu) karşı tanımlanan miRNA'lar ve hedef genlerin ifadesinin düzenlenmesindeki rollerine değinilmiştir.

2.1. Kadmiyum (Cd)

Kadmiyum (Cd), bitkiler için en toksik metallerden biri olup, en tehlikeli kirleticiler olarak kabul edilir (Ding ve ark., 2009; Shriram ve ark., 2016). Cd, bitkiler tarafından kolayca biriktirilir ve ROS üretimi ile oksidatif strese neden olur (Arshad ve ark., 2016). Cd, bitkide ürün verimliliğini etkileyerek, bodur büyüme, kloroz, solma, hücre ölümü, büyüme azalması ve hatta bitki ölümüne neden olabilmektedir (Rodriguez-Serrano ve ark., 2009; Rizwan ve ark., 2016). miRNA'lar ve ilgili gen

karakterizasyonu, ağır metal toleransı için bitkilerde moleküler mekanizmaların tanınmasında büyük rol oynar (Fang ve ark., 2013). Son yıllarda, ürünlerde Cd toksisitesine yanıtta yer alan çeşitli taşıyıcıları ve sinyal moleküllerini tanımlamak için çeşitli ilerlemeler kaydedildi. Kanola (*Brassica napus*) bitkisinde 84 tane korunmuş ve korunmamış farklı miRNA'lar tanımlanmış ve bunlardan miRNA156, miRNA171 ve miRNA396a'nın aşağı regüle edildiği bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2012). Aynı şekilde 80 µM Cd stresine maruz bırakılan *Brassica napus* bitkisinin köklerinde miRNA156, miRNA171, miRNA393 ve miRNA396a'nın aşağı regüle edildiği fakat miRNA399'un etkilenmediği bildirilmiştir (Xie ve ark., 2007). Cd stresine maruz bırakılan *Medicago* bitkilerinde ise farklı ifade profilleri gösterilmiştir. miRNA166'nın aşağı regüle edildiği buna karşın miRNA171, miRNA319, miRNA393 ve miRNA529'un yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2008). miRNA166'nın aşağı regüle olması CSD1/CSD2 transkriptlerini indükleyerek Cd stresine bağlı olarak oluşan hasarları hafiflettiği ve böylelikle miRNA'ların bitkide metal stresine karşı düzenlemede ne kadar önemli olduğu vurgulanmıştır. miRNA'lar bitkilerde çeşitli metabolik süreçlerde transkriptleri hedef alır. Örneğin; *Arabidopsis*'te miRNA164 oksidatif stresi düzenleyen monotiol glutaredoksinini (AtGRXS17) hedefler (Cheng ve ark., 2011). Cd stresi altında soya fasülyesinde (*Glycine max*) farklı ifadelere sahip miRNA'lar keşfedilmiş ve Cd stresine yanıt veren miRNA hedef genleri fitokelatin sentaz-1, demir ve ABC taşıyıcı proteinleri olarak bildirilmiştir (Xu ve ark., 2013). Cd stresine maruz kalan farklı bitkilerdeki bu sonuçlar, miRNA'ların Cd stresine karşı potansiyel rolünü ortaya koymakta ve stresin toksisitesini azaltma veya ortadan kaldırmada ağır metallere özgü mevcut ve yeni transkripsiyon faktörleri, enzimler ve proteinlerle çalışarak mahsul üretiminin artırılması adına ve yeni stratejilerin tasarlanmasına imkân sağlayacaktır.

2.2. Alüminyum (Al)

Toprakta farklı iyonik formlarda bulunan Alüminyum (Al) yüksek iyon (Al^{+3}) toksisitesine sahiptir. Al, asidik topraklarda (pH 5,5 veya daha düşük) ürün verimliliğini sınırlayan bir faktördür (Panda ve ark., 2009). Al^{+3} iyonları hücre bölünmesini ve kök büyümesini olumsuz yönde etkiler ve su alınınımının düzensizleşmesine neden olur. Fotosentez ve enerji üretimini engeller. ROS üretimini ve lipid peroksidasyonunu etkileyerek bazı antioksidan enzimlerin sentezini tetikler (Singh ve ark., 2017). Bu bağlamda miRNA'lar temel düzenleyiciler olarak görev yaparlar ve son yıllarda bitkilerde Al stresine yanıt olarak miRNA'ların düzenleyici rolleri ile ilgili çalışmalar yürütülmüştür. $AlCl_3$ stresine maruz bırakılan *Medicago truncatula* fidelerinde 23 miRNA tanımlanmış ve iki ana grup (hızlı ve sürekli yanıt veren) miRNA'lar olarak sınıflandırılmıştır. miRNA159, miRNA160, miRNA319, miRNA390 ve miRNA396'nın aşağı regüle edildiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2012). *Medicago truncatula* bitkisine uygulanan 50 μM Al stresıyla yapılan bir başka çalışmada ise miRNA166 ve miRNA398'in aşağı doğru düzenlendiği fakat miRNA171, miRNA319, miRNA393 ve miRNA529'un yukarı doğru düzenlendiği raporlanmıştır (Zhou ve ark., 2008). *A. thaliana*'da Al^{+3} yanıt olarak yapılan farklı bir çalışmada birkaç miRNA'nın (miRNA160, miRNA164) önemli derecede modüle edildiği ve miRNA160'ın bitkide kök gelişiminin transkripsiyonel düzenleyicileri olan ARF genlerinin ekspresyonunu azaltarak kök taç hücrelerinin oluşumunu kontrol ettiği, miRNA164'ün ise birkaç NAC alanı içeren transkripsiyon faktörünü (NAC1 ve ORE1) negatif düzenleyerek lateral kök gelişimini düzenlediği bildirilmiştir (He ve ark., 2014; Li ve ark., 2016). %1 Al_2O_3 nanopartikül maruziyetine bırakılan tütün (*Nicotiana Tabacum*) bitkisinde ise miRNA395, miRNA397, miRNA398 ve miRNA399'un ekspresyonunda önemli derecede

bir artış olduğu ve bu artışın bitkinin çevredeki Al toksisitesini tolere etme yeteneğini artırmada önemli olabileceği bildirilmiştir (Burklew ve ark., 2012). Sonuç olarak yukarıda ifade edilen miRNA örnekleri değerlendirildiğinde bitkilerin çeşitli gelişim aşamalarında miRNA'ların düzenleme görevi aldıkları ve Al stresinin etkisini azaltma ya da ortadan kaldırmada merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir.

2.3. Mangan (Mn)

Çeşitli enzimatik reaksiyonlar için önemli bir bileşen olan Mangan (Mn), inorganik bir katalizördür. Mn stresinin miRNA'larla ilişkili çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Yapılan çalışmalara bakıldığında ise fasülye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde abiyotik stres altında (Fe, Mn, P ve N) 68 miRNA'nın ifadesi analiz edilmiş ve 11 miRNA'nın 200 μ M MnCl₂'ye maruz kalan bitkinin yapraklarında veya köklerinde güçlü bir şekilde inhibe edildiği bildirilmiştir (Valdés-López ve ark., 2010).

2.4. Arsenik (As)

Arsenik (As), yer kabuğunda bol bulunan kanserojen bir elementtir. Bitkilerde toksik seviyelere kadar birikebilen As besin zinciri içinde risk oluşturmaktadır. Toksisitesinin yüksek olması ve kanserojenliği nedeniyle As'ın neden olduğu tarımsal ve çevresel kontaminasyon küresel sorun haline gelmiştir. Bitkilerde As alımı ve metabolizmasında birden fazla mekanizma yer almaktadır. As elementinin toksik formları genellikle As⁺³ ve As⁺⁵'tir (Abbas ve ark., 2018). As'a maruz kalan bitkilerde fotosentez hızında azalma, karbonhidrat metabolizmasında bozulma ve ROS üretimi gibi semptomlar görülmektedir (Zhou ve ark., 2010; Srivastava ve ark., 2012). Farklı seviyelerdeki topraklarda As stresine maruz kalan bitkilerin düzenleyici ağlardaki miRNA'larının rolleri hakkında yetersiz bilgi söz konusudur. Bu açıdan As stresi altındaki miRNA'ların düzenleyici fonksiyonlarının ortaya çıkarılması

önemli olmuştur. Pirinçte (*Oryza sativa*) As (100 μ M) stresi altında 36 farklı miRNA tanımlanmış bunlardan 14 tanesinin taşıma, sinyalleme ve metabolizmada gen ifadesinin düzenlenmesinde muhtemel görev aldıkları bildirilmiştir (Yu ve ark., 2012). Benzer şekilde bir başka çalışmada 25 μ M As stresine maruz kalan pirinç bitkisinin köklerinde 67 yeni miRNA tespit edilmiş ve 54 tanesinin aşağı, 13 tanesinin ise yukarı regüle edildiği ve bunlardan miRNA164, miRNA166, miRNA169, miRNA171 ve miRNA319'un oksidatif strese yanıtta ve fotosentetik aktivitede rol oynadığı, miRNA390, miRNA396 ve miRNA397'nin ağır metal stresine yanıtta, miRNA408 ve miRNA528'in ise büyüme düzenlemesi ile hormon sinyallesinde rol oynadıkları raporlanmıştır (Liu ve Zhang, 2012). Elde edilen bu sonuçlar yapılan diğer çalışmalar ile hardal bitkisi (*Brassica juncea* L.) doğrulanmıştır (Srivastava ve ark., 2012).

2.5. Bakır (Cu)

Bitkiler tarafından çok çeşitli fizyolojik aktiviteler için zorunlu olan bakır (Cu), yüksek konsantrasyon olması durumunda bitkiler için zararlı olabilmektedir (Paul ve ark., 2015). Yüksek konsantrasyon Cu, bitkide kök uzamasının azalması, zar bütünlüğünün bozulması, fotosentez fonksiyonunun azalması, protein metabolizması, kloroplastta aşırı ROS üretimi gibi hem fizyolojik hem de biyokimyasal özellikleri kısıtlar ve toksisite semptomlarını geliştirir (Pätsikkä ve ark., 2002; Huang ve ark., 2010). Bakırın en bol bulunan proteinleri olan bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD), plastosiyanin (PC) ve sitokrom c oksidaz (COX), fotosentez, solunum elektron taşınması ve oksidatif stresin hafifletilmesi için gerekli olan üç bakır proteinlerdir (Marschner, 1995). Cu iyonlarının fazlalığı hücrel redoks durumunda dengesizlik yaratabilir ve hedefleri esas olarak süperoksit dismutazların (Cu/Zn-SOD) ve lakkazların pozitif düzenlenmesinde rol

oynayan miRNA397, miRNA398 ve miRNA408 dâhil olmak üzere ROS temizleme işlemini tetikleyerek hücre içerisindeki mevcut Cu iyonlarını azaltır. Cu stresi altında miRNA'lar *Arabidopsis thaliana*'da ve *Triticum aestivum*'da tanımlanmıştır (Aguirre ve Pilon, 2016; Pilon, 2017; Araki ve ark., 2018). Bugüne kadar yapılan çalışmalar Cu stresiyle başa çıkmada miRNA'ların rollerini işaret etmektedir. *Arabidopsis thaliana*'da 100 μ M yüksek Cu stresinde miRNA398'in gen ifadesinin aşağı regüle olduğu ve bu durumun *CSD1* ve *CSD2* mRNA seviyelerinin indüklenmesi için önemli olabileceği bildirilmiştir (Sunkar ve ark., 2006; Yamasaki ve ark., 2007; Abdel-Ghany ve ark., 2008). *Arabidopsis thaliana* bitkisiyle yapılan bir başka çalışmada Cu kaynaklı oksidatif strese karşı yanıt olarak tanımlanan miRNA395'in yukarı regüle olduğu bildirilmiştir (Jagadeeswaran ve ark., 2014). Bir şakayık türü olan *Paeonia ostii* fidelerine uygulanan 100 μ M Cu stresinde 18 yeni ve 12 korunmuş miRNA'ların tanımlandığı bildirilmiştir (Jin ve ark., 2015). Cu eksikliğine yanıt olarak promotör bölgesindeki GTAC motifleri gereklidir. Örneğin; yeşil alg cinsi *Chlamydomonas*'ta, Cu'ya yanıt veren düzenleyici squamosa promotör bağlayıcı protein benzeri 7'nin (1SPL7) homolog bir TF'si, Cu eksikliğine tepki için zorunludur. Bu SPL7, miRNA398 promotöründe GTAC motiflerine bağlanır ve gen aktivasyonu ile sonuçlanır. Ayrıca, SPL7, Cu ile ilişkili bazı diğer miRNA'ların, örneğin; miRNA857'nin ekspresyon düzenlemesi için de gereklidir (Kropat ve ark., 2005; Yamasaki ve ark., 2009). Bu çalışmalar, miRNA398'in Cu'ya duyarlı miRNA'ların transkripsiyonel düzenlenmesinde SPL7'nin önemini göstermektedir. Aynı şekilde *Arabidopsis thaliana* ile yapılan farklı bir çalışmada miRNA408'in direkt promotörle etkileşime girerek *SPL7* ve *HY5* tarafından transkripsiyonel olarak düzenlendiği raporlanmıştır (Zhang ve ark., 2014). Sonuç olarak elde edilen bu bulgular, miRNA'ların bitkilerin Cu proteinlerinin ifadesini

ve bağlantılı gelişmeleri senkronize etmesini kolaylaştırmasına imkân sağlayabileceğini öne çıkarmaktadır.

3. SONUÇ

Farklı türlerdeki bitkilerde çeşitli metal stresine yanıtta yer alan çok sayıda miRNA'lar belirlenmiş, ancak bu miRNA'ların çoğu derinlemesine incelenmediği için belirli işlevleri hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Önceki yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular dikkate alındığında birçok miRNA'nın hedef geninin transkripsiyon faktörleri ve enzimler olduğu, bu durum da metal stres tepkisinin düzenleyici ağında miRNA'ların önemli rollerinin olduğunu göstermektedir. Bir miRNA'nın birden fazla hedef geninin olabileceği gibi bir genin de birden fazla miRNA tarafından düzenlenebileceği ve bu durum miRNA'lar ile hedef genler arasındaki ilişkinin birlikte analiz edilmesi gerektiği vurgusunu öne çıkarmaktadır. Farklı bitkilerde tüm miRNA'ların hedefleri korunmamakta ve bu nedenle farklı bitki türlerinde miRNA hedeflerinin araştırılması ve doğrulanması gerekmektedir. Ayrıca düzenleyici özelliği bulunan miRNA'ların ve mekanizmalarının iyi derecede anlaşılması bitkilerin metal stresine karşı toleransının işlevsel olarak iyileştirilmesine yardımcı olacaktır. Son olarak bitkide metal stresi tepkisini düzenlemede rol oynayan daha fazla miRNA'nın tanımlanması ve işlevlerinin araştırılması, bitkilerin metal stresine karşı direncinin iyileştirilmesine imkân sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Abbas, G., Murtaza, B., Bibi, I., Shahid, M., Niazi, N. K., Khan, M. I., ... & Natasha, N. (2018). Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: physiological, biochemical, and molecular aspects. *International journal of environmental research and public health*, 15(1), 59.
- Abdel-Ghany, S. E., & Pilon, M. (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15932-15945.
- Aguirre, G., & Pilon, M. (2016). Copper delivery to chloroplast proteins and its regulation. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1250.
- Araki, R., Mermod, M., Yamasaki, H., Kamiya, T., Fujiwara, T., & Shikanai, T. (2018). SPL7 locally regulates copper-homeostasis-related genes in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 224, 137-143.
- Arshad, M., Ali, S., Noman, A., Ali, Q., Rizwan, M., Farid, M., & Irshad, M. K. (2016). Phosphorus amendment decreased cadmium (Cd) uptake and ameliorates chlorophyll contents, gas exchange attributes, antioxidants, and mineral nutrients in wheat (*Triticum aestivum* L.) under Cd stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(4), 533-546.
- Budhu, A., Ji, J., & Wang, X. W. (2010). The clinical potential of microRNAs. *Journal of hematology & oncology*, 3, 1-7.
- Burklew, C. E., Ashlock, J., Winfrey, W. B., & Zhang, B. (2012). Effects of aluminum oxide nanoparticles on the

- growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *PloS one*, 7(5), e34783.
- Chen, L., Wang, T., Zhao, M., Tian, Q., & Zhang, W. H. (2012). Identification of aluminum-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *Planta*, 235, 375-386.
- Cheng, N. H., Liu, J. Z., Liu, X., Wu, Q., Thompson, S. M., Lin, J., ... & Hirschi, K. D. (2011). *Arabidopsis* monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20398-20406.
- Ding, D., Zhang, L., Wang, H., Liu, Z., Zhang, Z., & Zheng, Y. (2009). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of botany*, 103(1), 29-38.
- Du, Q., Guo, P., Shi, Y., Zhang, J., Zheng, D., Li, Y., ... & Zhao, W. (2021). Genome-wide identification of copper stress-regulated and novel microRNAs in mulberry leaf. *Biochemical Genetics*, 59, 589-603.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *nature*, 411(6836), 494-498.
- Fang, X., Zhao, Y., Ma, Q., Huang, Y., Wang, P., Zhang, J., ... & Yang, C. (2013). Identification and comparative analysis of cadmium tolerance-associated miRNAs and their targets in two soybean genotypes. *PloS one*, 8(12), e81471.
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y., & Zhu, J. (2013). Heat stress induction of mi R 398 triggers a regulatory loop

that is critical for thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 74(5), 840-851.

Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950-952.

He, H., He, L., & Gu, M. (2014). Role of microRNAs in aluminum stress in plants. *Plant Cell Reports*, 33, 831-836.

Huang, S. Q., Xiang, A. L., Che, L. L., Chen, S., Li, H., Song, J. B., & Yang, Z. M. (2010). A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulphate deficiency and cadmium stress. *Plant Biotechnology Journal*, 8(8), 887-899.

Jagadeeswaran, G., Li, Y. F., & Sunkar, R. (2014). Redox signaling mediates the expression of a sulfate-deprivation-inducible micro RNA 395 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 77(1), 85-96.

Jin, Q., Xue, Z., Dong, C., Wang, Y., Chu, L., & Xu, Y. (2015). Identification and characterization of microRNAs from tree peony (*Paeonia ostii*) and their response to copper stress. *PLoS One*, 10(2), e0117584.

Khraiwesh, B., Zhu, J. K., & Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137-148.

Kropat, J., Tottey, S., Birkenbihl, R. P., Depege, N., Huijser, P., & Merchant, S. (2005). A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51), 18730-18735.

- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, 75(5), 843-854.
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., & Zhang, J. Z. (2016). A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 47.
- Liu, Q., & Zhang, H. (2012). Molecular identification and analysis of arsenite stress-responsive miRNAs in rice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(26), 6524-6536.
- Liu, Q., Hu, H., Zhu, L., Li, R., Feng, Y., Zhang, L., ... & Zhang, H. (2015). Involvement of miR528 in the regulation of arsenite tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(40), 8849-8861.
- Manavella, P. A., Yang, S. W., & Palatnik, J. (2019). Keep calm and carry on: mi RNA biogenesis under stress. *The Plant Journal*, 99(5), 832-843.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press Inc., London.
- Min Yang, Z., & Chen, J. (2013). A potential role of microRNAs in plant response to metal toxicity. *Metallomics*, 5(9), 1184-1190.
- Mladinov, D., Liu, Y., Mattson, D. L., & Liang, M. (2013). MicroRNAs contribute to the maintenance of cell-type-specific physiological characteristics: miR-192 targets Na⁺/K⁺-ATPase β 1. *Nucleic acids research*, 41(2), 1273-1283.
- Ori, N., Cohen, A. R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., ... & Eshed, Y. (2007). Regulation of

- LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nature genetics*, 39(6), 787-791.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., & Birchler, J. A. (2002). RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Molecular cell*, 9(2), 315-327.
- Panda, S. K., Baluška, F., & Matsumoto, H. (2009). Aluminum stress signaling in plants. *Plant signaling & behavior*, 4(7), 592-597.
- Pätsikkä, E., Kairavuo, M., Šeršen, F., Aro, E. M., & Tyystjärvi, E. (2002). Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant physiology*, 129(3), 1359-1367.
- Paul, S., Datta, S. K., & Datta, K. (2015). miRNA regulation of nutrient homeostasis in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 232.
- Pilon, M. (2017). The copper microRNAs. *New Phytologist*, 213(3), 1030-1035.
- Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Rizvi, H., Zia-ur-Rehman, M., Hannan, F., ... & Ok, Y. S. (2016). Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 17859-17879.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Pazmino, D. M., Testillano, P. S., Risueño, M. C., Del Río, L. A., & Sandalio, L. M. (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology*, 150(1), 229-243.

- Shriram, V., Kumar, V., Devarumath, R. M., Khare, T. S., & Wani, S. H. (2016). MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 817.
- Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J. N., & Kooter, J. M. (2001). Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology*, 11(6), 436-440.
- Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., & Vaculík, M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 177-193.
- Srivastava, S., Srivastava, A. K., Suprasanna, P., & D'souza, S. F. (2013). Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in *Brassica juncea*. *Journal of experimental botany*, 64(1), 303-315.
- Srivastava, S., Suprasanna, P., & D'souza, S. F. (2012). Mechanisms of arsenic tolerance and detoxification in plants and their application in transgenic technology: a critical appraisal. *International journal of phytoremediation*, 14(5), 506-517.
- Stricklin, S. L., Griffiths-Jones, S., & Eddy, S. R. (2005). C. elegans noncoding RNA genes. *WormBook*, 25, 1-7.
- Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by down regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 18(8), 2051-2065.
- Valdés-López, O., Yang, S. S., Aparicio-Fabre, R., Graham, P. H., Reyes, J. L., Vance, C. P., & Hernández, G. (2010).

MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytologist*, 187(3), 805-818.

- Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R., & Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *International journal of genomics*, 2014(1), 970607.
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858), 1931-1934.
- Xie, F. L., Huang, S. Q., Guo, K., Xiang, A. L., Zhu, Y. Y., Nie, L., & Yang, Z. M. (2007). Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *Febs Letters*, 581(7), 1464-1474.
- Xu, F., Liu, Q., Chen, L., Kuang, J., Walk, T., Wang, J., & Liao, H. (2013). Genome-wide identification of soybean microRNAs and their targets reveals their organ-specificity and responses to phosphate starvation. *BMC genomics*, 14, 1-30.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., & Pilon, M. (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16369-16378.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., & Shikanai, T. (2009). SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(1), 347-361.

- Yu, L. J., Luo, Y. F., Liao, B., Xie, L. J., Chen, L., Xiao, S., ... & Shu, W. S. (2012). Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 195(1), 97-112.
- Yu, S., Galvão, V. C., Zhang, Y. C., Horrer, D., Zhang, T. Q., Hao, Y. H., ... & Wang, J. W. (2012). Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *The Plant Cell*, 24(8), 3320-3332.
- Zhang, H., Zhao, X., Li, J., Cai, H., Deng, X. W., & Li, L. (2014). MicroRNA408 is critical for the HY5-SPL7 gene network that mediates the coordinated response to light and copper. *The Plant Cell*, 26(12), 4933-4953.
- Zhou, J., Jiao, F., Wu, Z., Li, Y., Wang, X., He, X., ... & Wu, P. (2008). OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant physiology*, 146(4), 1673-1686.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., & Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4157-4168.
- Zhou, M., Li, D., Li, Z., Hu, Q., Yang, C., Zhu, L., & Luo, H. (2013). Constitutive expression of a miR319 gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant physiology*, 161(3), 1375-1391.
- Zhou, Z. S., Huang, S. Q., & Yang, Z. M. (2008). Bioinformatic identification and expression analysis of new

microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochemical and biophysical research communications*, 374(3), 538-542.

Zhou, Z. S., Song, J. B., & Yang, Z. M. (2012). Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *Journal of experimental botany*, 63(12), 4597-4613.

Zhu, Q. H., & Helliwell, C. A. (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *Journal of experimental botany*, 62(2), 487-495.

ANALYSIS OF SOME miRNA's EFFECTS ON ANOIKIS RESISTANCE IN SEVERAL CANCER CELLS UNDER SUSPENSION CONDITIONS

Muzaffer DÜKEL¹

1. INTRODUCTION

Anoikis resistance represents a critical mechanism that facilitates the survival of metastatic cells following detachment from the extracellular matrix (ECM) and subsequent entry into the bloodstream. Upon acquiring this capability, carcinoma cells can disseminate to distant tissues and establish secondary colonies, thereby driving metastatic progression (Gilmore, 2005; Guadamillas, Cerezo, & Del Pozo, 2011). Lung, colon, breast, and prostate cancers are the most common cancer types for both sexes worldwide, cause more than 3.5 million deaths each year (Bray et al., 2024). Numerous studies have shown that metastases in tumors are responsible for majority of cancer-related deaths (Dillekås, Rogers, & Straume, 2019). MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNA molecules that have been enormously investigated in various cancer, including colon, lung, breast, and prostate cancers, and are involved in the regulation of oncogenes and tumor suppressor genes (Y. Shi et al., 2021; Uzuner, Ulu, Gürler, & Baran, 2022). Several groups have been documented miRNAs play significant regulatory roles in carcinogenesis as both oncogenes and tumor suppressors (Ahmad et al., 2013). Additionally, miRNAs were investigated for future applications

¹ Assist. Prof., Molecular Biology and Genetics Department, Faculty of Art and Science, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, 15100, Turkey, muzafferdukel@gmail.com, mdukel@mehmetakif.edu.tr, ORCID: 0000-0002-6464-4353

in cancer therapy and as a marker for cancer diagnosis and prognosis (Schoof, Botelho, Izzotti, & Vasques, 2012). There are numerous studies on the roles of non-coding RNAs, including miRNAs, in the regulation of anoikis. These studies have demonstrated the mechanisms by which miRNAs regulate anoikis resistance and induce anoikis in various cancer cell (Lee, Son, Moeng, Choi, & Park, 2021). However, there is limited information on the changes in miRNAs during the long-term suspension growth phase of cells and their effects on colony-forming properties. In this study, the expression levels of 7 different miRNAs, that oncogenic or tumor suppressor properties have been identified in various cancers, were investigated in lung, colon, breast, ovarium and prostate cancer cells during suspension growth. Our findings indicate that miR-145 is downregulated in metastatic cancer cells during suspension growth, and restoration of miR-145 results in increased anoikis sensitivity in cancer cells.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Cell Culture and maintenance

CCD-18Co, LoVo, MDA-MB-231, MCF-10A, HOSEpiC, SK-OV-3, A459, PC-3 cell lines were kindly provided by Prof. Dr Hulya Ayar Kayali. RWPE-1 (ATCC CRL-3607), NL-20 (ATCC CRL-2503) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). LoVo, MDA-MB-231, A459, RWPE-1, and NL-20 cell lines were cultured in RPMI medium (Gibco), and CCD-18Co, SK-OV-3, MCF-10A, PC-3, and HOSEpiC were cultured in DMEM (Sigma) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Corning), 10% FBS (FCS; Life Technologies). All lines were maintained in a carbon dioxide (CO₂) incubator, with humidity set at 95% at 37 °C under sterile conditions.

2.2. Cell Viability Assay

Cell viability of studied cell lines upon anoikis was measured via Resazurin (Alfa Aesar, B21187) according to manufacturers' protocol. For Resazurin assay, approximately 2000 cells/well were seeded into normal and poly-HEMA coated 96-well plates for up to 8 days. After indicated incubation, 10 μ L of 1x Resazurin added to each well and plates were incubated at 37 °C for 3 h. Cell viability was measured by spectrophotometry at 570 nm using a Biotek Epoch microplate reader.

2.3. Anoikis Assay

To assess level of anchorage-independent growth induced cell death, we prepared 10 mg/ml polyHEMA solution in 95% ethanol. 6-well plates were coated with 0.5 mL of 10 mg/mL poly-HEMA solution and plates were allowed to dry overnight as partially covered in a laminar flow tissue culture hood. The plates were washed twice with PBS to remove residual ethanol. All cell lines were harvested and seeded into poly-Hema coated plates at a density of 1×10^5 per cm². Each cell line was cultured at both normal and low attachment plates up to 8 days in either RPMI or DMEM medium and then cells transferred to normal plates. After indicated incubation time, viable cells were counted either with cell viability assay or with trypan blue staining.

2.4. RNA Extraction and Quantification of Mature miRNAs

Total RNA from cell lines for qRT-PCR was isolated using miRVana miRNA Isolation Kit (Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized according to the manufacturer's instructions Mir-XTM miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara, JAPAN). To determine expression levels of target miRNAs, we performed real-time RT-PCR analyses performed using either SYBRTM Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) or TB

Green™ Premix Ex Taq™ II (Takara) following manufacturer's manual. Target miRNAs expressions in studied cell lines were normalized using U6 as the internal standard, and fold changes in transcript abundance were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). The relevant primer sequences are listed in Table 1. Q-PCR reactions were performed with ROCHE LIGHTCYCLER 480 II 96 , the reaction conditions were as follows: 95 °C for 30 s, 95 °C for 5 s, and 60 °C for 34 s (1 cycle), totally 40 cycles.

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

miRNAs	Sequence	Ref
has-miR-200c	ATAATACTGCCGGGTAATGATGGA	(Kim, Yoo, Lee, Choi, & Yoon, 2017)
has-miR-10a	CTGTAGATCCGAATTTGTGA	(Zheng et al., 2020)
hsa-miR-30a-5p	TGACCGATTTCTCCTGGTGTTTC	(Ye et al., 2018)
hsa-miR-145	CGGTCCAGTTTTCAGGA	(S. Yu, Wang, Zhang, Guo, & Qin, 2024)
hsa-miR-424-5p	AGCAGCAATTCATGTTTTG	(DU et al., 2025)
hsa-miR-204-5p	CGAAGTTCCTTTGTCATCCT	(Qiu, Qi, & Wang, 2022)
hsa-miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	(He, Zhao, Wang, Ren, & Han, 2025)
hsa-U6	TCGTGAAGCGTTCCATATTTTAA	(Zheng et al., 2020)

2.5. miR-145 Transfection

To target miR-145, we purchased miR-145 (miRNA mimic) or scrambled negative control from Ambion (Austin, TX, USA). Studied cell lines were trypsinized and seeded in 6-well plates at density 2×10^6 cells/well. Each cell line was then transfected with 50 nM miRNA mimic or negative control using the Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in serum free RPMI for 20 minutes. Cells were incubated at 37°C for 24 h before replacement of medium. This procedure was continuously performed to generate cells used for further experiments.

2.6. Western Blot Analysis

After suspension growth, cells were lysed using RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc.), containing proteinase and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) on ice. The lysates were centrifuged at $12,000 \times g$, for 10 min at 4°C according to the manufacturer's instructions. Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid protein (BCA) assay (Thermo Fisher Scientific, Inc.). A total of 40 µg of protein were resolved using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) electrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, USA) that were then blocked with 5% skimmed milk powder for 2 hours to block nonspecific binding. Subsequently, the blots were immunoblotted with indicated primary antibodies either at 4 °C overnight or at room temperature 1 h. The primary antibodies used in our study were listed in table 2. After washing 3 times with TBST for 15 min, the membranes were incubated with corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies at a dilution of 1:1000 for 1 h at room temperature. The protein bands were visualized using chemiluminescence imaging system. Both anti-GAPDH and anti-β-actin antibody as a protein loading control were used. All experiments were performed in triplicate, and results were quantified with ImageJ software.

2.7. Annexin V

To assess apoptosis following miR-145 restoration or knockdown, Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) staining was performed using the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioLegend, BD Biosciences,) according to the manufacturer's instructions. LoVo, CCD-18Co, MDA-MB-231 and MCF-10A cells were transfected with miR-145 mimics, inhibitors, or appropriate negative controls using Lipofectamine

RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) and incubated for up to 8 days both under attached and suspension cultured. Cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in $1\times$ Annexin V binding buffer at a concentration of 1×10^6 cells/mL. A total of 100 μ L of cell suspension was incubated with 5 μ L of Annexin V-FITC and 5 μ L of PI for 15 minutes at room temperature in the dark. Samples were then diluted with 400 μ L of binding buffer and analyzed immediately by flow cytometry. Data were analyzed using FlowJo software.

2.8. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using SPSS (version 17.0; (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and data are expressed as mean $\pm$ standard deviation of at least three biological replicas. To analyse differences between two groups for miRNA expressions, we used unpaired Student's *t*-test. Comparisons of multiple groups were analyzed using the ANOVA followed by Dunnett's test. $P<0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

3. RESULTS

3.1. Lung, Colon, Breast, Ovarian and Prostate Cancer Cells Present Different Levels Anoikis Resistance Compared to Normal Cells

In the present study, we first investigated the anoikis resistance abilities of several cancer cells comparing to normal cells. We selected five different metastatic cancer cells, such as LoVo, MDA-MB-231, SK-OV-3, A459, PC-3, that can spread from their tissue of origin to a different tissue. We also cultured CCD-18Co, MCF-10A, HOSEpiC, RWPE-1, and NL-20 normal cell lines for each cancer type. Lung, colon, breast, ovarian and prostate cancer cells cancer cells and normal cells were cultured

normal and poly-HEMA coated plates up to 8 days. After incubation times, death and living cells were counted with both trypan blue and cell viability were determined using Resazurin. Our finding showed that all metastatic cells are resistance to anoikis for 8-day anchorage independent culture. MDA-MB-231 breast cancer cell line exerts the highest survival (94%) and anoikis resistance in all studied cancer cell types. On the other hand, ovarian cancer cell line SK-OV-3 present anoikis resistance but lower survival (82%) compared to other cancer cells. As expected, CCD-18Co, MCF-10A, HOSEpiC, RWPE-1, and NL-20 normal cell lines are not resistant to anoikis. Interestingly, CCD-18Co exert highest survival rate (19%) for 8-days suspension growth. In addition, our data indicates that LoVo, A549, and PC-3 cell lines present anoikis resistance at 93, 87,4 and 88,8 % survival rate upon to 8 days under suspension (Fig. 1). We also confirmed whether suspension growth induce apoptosis via western blot analysis.

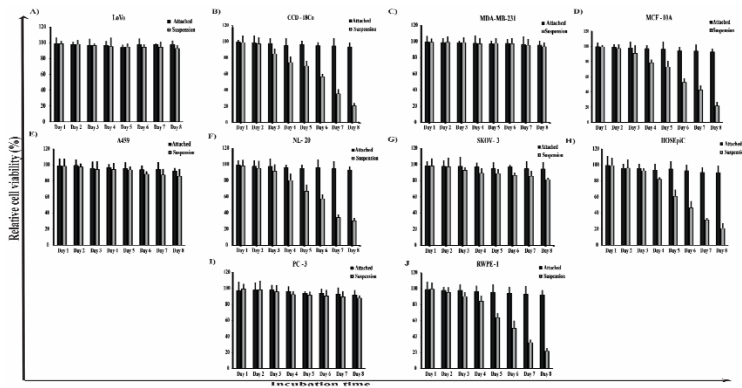


Figure 1. Cancer cells exist variable levels of anoikis resistance at time dependent manner. To test anoikis resistance, we prepared Poly-HEMA-coated plates, and all the cell lines were cultured in those plates for up to 8 days. We examined cell viability via Resazurin. A) LoVo, B) CCD-18Co, C) MDA-MB-231, D) MCF-10A, E) A459, F) NL-20, G) SKOV-3, H) HOSEpiC, I) PC-3 and J) RWPE-1 cell viability results are expressed as mean $\pm$ s.d (representative data from three independent experiments) (n=3).

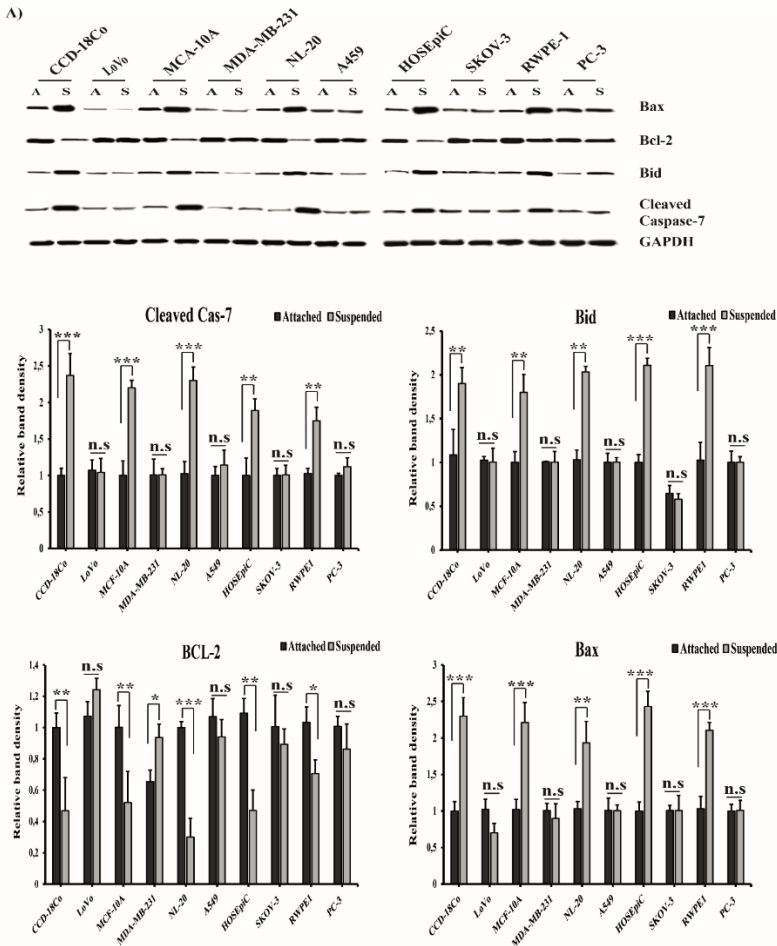


Figure 2. Apoptotic marker protein levels in studied cancer and normal cell lines during anoikis induction A) Levels of pro-apoptotic proteins were assayed by immunoblotting. Total proteins were extracted using RIPA buffer, quantified via spectrophotometric protein assay, and subjected to SDS-PAGE gel electrophoresis. Nitrocellulose membranes were probed with antibodies against Bcl-2, Bid, Bax, Cleaved Caspase-7, and GAPDH (used as a loading control). Error bars = SD. Statistical significance was determined using Student's t-test: ns = not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Immunoblot bands confirm that cancer cells exist anoikis resistance, with no important apoptotic protein alteration, while under 8-days suspension growth in normal and sensitive cell lines

induced apoptotic marker proteins such as Cleaved Caspase-7, Bax and Bid. (Fig 2).

3.2. Expression levels of listed miRNA response to anchorage independent growth in studied cell lines

Numerous studies indicated miRNA can both promote or inhibit anoikis in cancer cells such as lung, colon, breast, ovarian and prostate (Malagobadan & Nagoor, 2015; T. Shi, Zhang, & Xia, 2022). Next, we selected seven miRNA, including miR-200c, miR-10a, miR-30a-5p, miR-145, miR-424-5p, miR-204-5p, and miR-125b-5p that associated with anoikis resistance for different cancer cells and evaluated expression levels of these miRNAs response suspension growth LoVo, MDA-MB-231, SK-OV-3, A459, PC-3 and normal cell lines by qRT-PCR. Our findings show that only alteration of miRNA-145 correlates anoikis resistance and miRNA-145 is downregulated in all studied cancer cell lines compared to normal cell lines. More importantly, we observed that expression of miR-145 is downregulated response to suspension growth for all cancer cell lines, but not in normal cell lines. Of note, there was no consistent correlation between anoikis resistance and expressions levels of other studied miRNA across the cancer cells (Fig. 3A).

For example, our data demonstrated that miR-10a expression was decreased in ovarian, colon and breast cancer cells, whereas it was overexpressed lung and prostate cancer cells. In addition, miR-10a was upregulated in response to anchorage independent growth only in lung cancer cell but not other cancer cell lines examined (Fig. 3B). Furthermore, we found out that miR-30a-5p is downregulated in ovarian and lung cancer cells in response to suspension growth (~2-fold) compared to attached cells. However, no significant changes were observed in other studied cancer cells under either adherent or suspension culture conditions (Fig. 3C). Moreover, we observed that expression of

miR-200c decreased in breast and ovarian cancer cell lines compared to normal cells but miR-200c level was stable response to suspension growth compared to adherent cells for all studied cell lines (Fig. 3D).

Additionally, our results demonstrated that miR-424-5p sharply increased in prostate cancer cells (PC-3) compared to normal prostate epithelial cells (RWPE-1) and it was upregulated in response to suspension growth. Conversely, miR-424-5p was downregulated in both breast cancer and ovarian cancer cells but no statistically important alteration in both cell lines under suspension compared to adherent conditions, Moreover, we observed modest increase in colon cancer cells compared to normal cells in both adherent and suspension culture, On the other hand, miR-424-5p expression was stable for other studied cell lines in response to anchorage-independent growth (Fig. 3E).

We observed that the expression of miRNA-204-5p is reduced in colon, breast, and lung cancer cells, but remains unchanged under anchorage-independent growth conditions compared to adherent cells. In ovarian and prostate cancer cells, the expression of miRNA-204-5p has been found to increase slightly but significantly; however, the level of this miRNA in anchorage-independent cells did not differ from that in normal culture (Fig. 3F). Finally, we observed no important alteration expression of miR-125b-5p in all cancer cells under either adherent or suspension culture compared to normal cells (Fig. 3F).

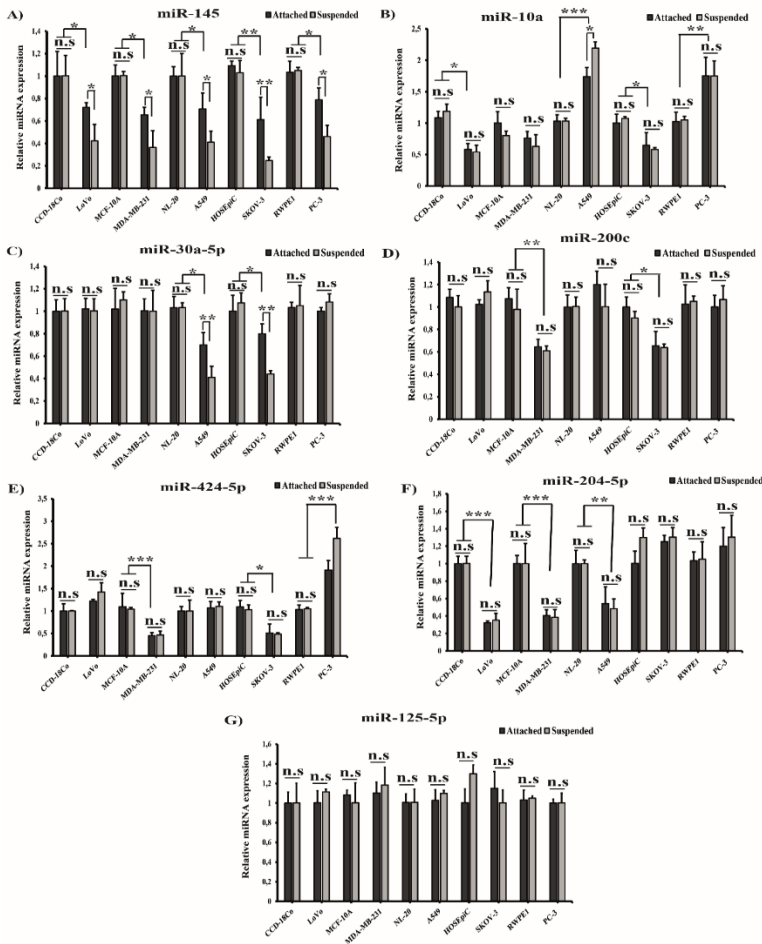


Figure 3. miRNA abundance in cancer and normal cell lines under normal and suspension culture. All cell lines were cultured under standard tissue culture conditions. For all cell lines, we counted and then harvested 1×10^6 cells. RNA was isolated from both attached and suspended culture following 8-day culture. RNA concentrations were determined by spectrophotometry. Abundance levels of A) miR-145 B) miR-10a, C) miR-30a-5p, D) miR-200c, E) miR-424-5p, F) miR-204-5p, and G) miR-125b-5p were analyzed by qRT-PCR. Error bars = SD; indicates n.s $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$ Student's t-test).**

3.3. Restoration and knockdown of miR-145 reverse Anoikis resistance in Cancer and Normal Cells

As we observed that downregulated miRNA-145 correlated anoikis resistance in cancer cells, we aimed to examine whether restoration or knockdown of miRNA-145 is related to anoikis resistance. To test this, we used miRNA-145 mimic and mimic control in anoikis resistance cancer and sensitive cell lines. First, cells were transfected with miRNA-145 mimic and mimic control, then cells were cultured in suspension for 8 days. Restoration studies were performed in MDA-MB-231 and LoVo cells. We also used miRNA-145 knockdown mimic for CCD-18Co and MF-10A cell lines. To test both restoration and knockdown of miRNA-145 using Q-PCR assays. Our findings indicate around 2-fold restoration for both LoVo and MDA-MB-231 cells. Additionally, we scored over 60% knockdown in miRNA-145 abundance for sensitive cell lines (Fig. 4A, B). We observed reduction in cell viability both MDA-MB-231 and LoVo cells both adherent and suspension culture. Importantly, our findings indicate that restoration of miRNA-145 sensitizes MDA-MB-231 and LoVo cells to anoikis under suspension culture. On the other hand, for sensitive cell lines, we found that both knockdowns of miRNA-145 induce cell viability of CCD-18Co and MF-10A under suspension conditions (Fig. 4C). In addition, Annexin V assay showed the restoration of miRNA-145 significantly induced early apoptosis in suspension growth cells, whereas no significant difference was observed within control groups cells cultured under adherent conditions (Fig 4D).

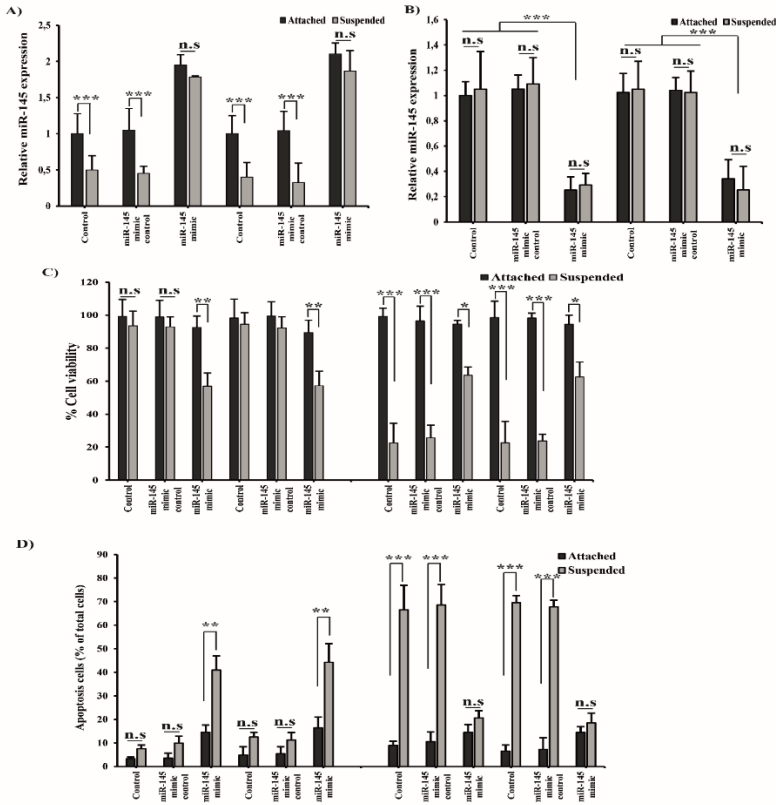


Fig 4. miR-145 reverse Anoikis resistance in Cancer and Normal Cells. CCD-18Co, LoVo, MDA-MB-231 and MCF-10A cells were transfected with miR-145 mimic (knockdown or restoration) and control, then total RNA was isolated using Trizol. miR-145 abundance for both restoration A) and knockdown B) presented as mean from three different experiments. C) Effects of restoration and knockdown of miR-145 on cell viability were measured after 8 days using a microplate reader. All cells were cultured both under suspension and attached conditions for 8 days and then cell viability were determined with resazurin. D) Early apoptotic cells were defined as Annexin V⁺/PI⁻, and late apoptotic or necrotic cells as Annexin V⁺/PI⁺. All experiments were performed in triplicate, and results were presented as the percentage of apoptotic cells relative to total cell population. Data represent mean $\pm$ SD; significance (Student's t-test): n.s $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$ as determined by Student's T-test.

4. DISCUSSION

Anoikis resistance is a vital step of carcinomas metastasis that enables cancer cells to survive in the bloodstream and spread to distant organs (Guadamillas et al., 2011). In numerous studies, investigators have demonstrated that both the over-expression and the decreased expression of miRNAs play pivotal roles in anoikis resistance and cancer metastasis (Malagobadan & Nagoor, 2015). In this study, we first investigated the expression levels of seven different miRNAs—including miR-200c, miR-10a, miR-30a-5p, miR-145, miR-424-5p, miR-204-5p, and miR-125b-5p in five different cancer cell lines under both suspension and adherent culture conditions. In the literature, there are several reports regarding the expression of the miRNAs selected in this study. For example, investigators observed that miR-10a is down regulated in breast (Ke & Lou, 2017), colon (Y. Liu et al., 2017) and ovarian (L. Liu, Sun, Yang, & Zou, 2021) but upregulated in lung (T. Yu et al., 2015), and prostate (Mu et al., 2019) cancer cells. Consistently, our findings demonstrated that expression of miR-10a was suppressed in breast and ovarian cancer cells compared to normal cells. lung and prostate cancer cells strongly express miR-10a. We have not observed any alteration on miR-10a expression in response to anchorage independent growth in any studied cell line while Liu et al. found that miR-10a suppresses anoikis in colorectal cancer cells (Y. Liu et al., 2017).

In addition, miR-30a-5p present tumor suppressor effects for lung (Yang et al., 2021), breast (W. Wang et al., 2024), prostate (Zhang et al., 2024) and colon (D. Yu et al., 2021) cancer cells but overexpressed and exist oncogenic effect in ovarian cancer cells (J. Liu et al., 2016). Our findings demonstrate that all examined cell lines, except for SKOV-3 (ovarian cancer cell line), exhibited statistically comparable expression levels of miR-30a-5p. Notably, the SKOV-3 and A459 cell lines exhibit significantly decreased miR-30a-5p expression under suspension culture

conditions, while no such difference was observed in the other cell lines. These cell lines-specific upregulation suggests a potential oncogenic role for miR-30a-5p in ovarian cancer and lung cancer. Consistent with our findings, recent reports have documented that miR-30a-5p are downregulated in both ovarian (L. Wang, Zhao, & Yu, 2019) and lung (Qin, Gu, Guo, Wang, & Pu, 2023) cancer cells.

Moreover, miR-424-5p has been shown to promote anoikis resistance in thyroid cancer (X. Liu et al., 2019). In our study, we found that miR-424-5p is significantly upregulated in suspension-grown prostate cancer cells compared to adherent cells suggesting it can stimulate anoikis resistance. In earlier reports, investigators showed that miR-200c affects anoikis resistance in both breast (Howe, Cochrane, & Richer, 2011) and endometrial (Kozak, Wdowiak, Maciejewski, & Torres, 2019) cancer cells. In contrast, subsequent research has established that miR-200c enhances anoikis sensitivity while being downregulated in breast (Howe, Cochrane, Cittelly, & Richer, 2012) and ovarian (Cittelly et al., 2012) cancer cells. In addition, Yu et al. has demonstrated that miR-200a, a member of the miR-200 family, strongly promotes anoikis resistance in breast cancer cells (S.-J. Yu et al., 2013). Interestingly, our data indicate no significant correlation in lung, colon and prostate cancer during anoikis induction. Additionally, we observed important correlation between anoikis and miR-200c expression for breast and ovarian cancer cells compared to normal cells under suspension culture.

A recently published review has suggested that miRNA-204-5p generally as a tumor suppressor Furthermore, consistent with the findings of our study, the expression of miRNA-204-5p has been shown to be reduced in colon, breast, and lung cancers (F. Yang, Bian, Xu, Sun, & Huang, 2023). In this study, we observed for the first time that the expression of miRNA-204-5p

does not change in anchorage-independent cells. Earlier reports have also confirmed that miR-204-5p inhibits metastatic characteristics for both colon (Yin et al., 2014) and breast (Hong et al., 2019) cancer.

Numerous studies have demonstrated that miR-145 is downregulated in cancer cells, including lung (Cho, Chow, & Au, 2009), breast (Moradi, Mohajerani, & Sadeghizadeh, 2022), colon (Li et al., 2022), ovarian (Dong et al., 2014), and prostate cancers (Xu, Chang, Du, & Hou, 2017). These findings suggest miR-145 as a tumor suppressor gene in these cancer types. Consistently, we observed significantly decrease in miR-145 expression in all studied cell lines. More importantly, in present study, our finding revealed that miR-145 is downregulated in lung, breast, colon, ovarian and prostate cancer cell lines and upregulated response to anchorage independent growth. Taken together, this study is the first to demonstrate that miR-145 is important for anoikis resistance in the most commonly observed cancer types, including colon, breast, ovarian, lung, and prostate cancers

REFERENCES

- Ahmad, J., Hasnain, S. E., Siddiqui, M. A., Ahamed, M., Musarrat, J., & Al-Khedhairi, A. A. (2013). MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: a new paradigm. *The Indian Journal of Medical Research*, 137(4), 680–94.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. Retrieved from <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Cho, W. C. S., Chow, A. S. C., & Au, J. S. K. (2009). Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *European Journal of Cancer*, 45(12), 2197–2206. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.04.039>
- Cittelly, D. M., Dimitrova, I., Howe, E. N., Cochrane, D. R., Jean, A., Spoelstra, N. S., ... Richer, J. K. (2012). Restoration of miR-200c to Ovarian Cancer Reduces Tumor Burden and Increases Sensitivity to Paclitaxel. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(12), 2556–2565. Retrieved from <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0463>
- Dillekås, H., Rogers, M. S., & Straume, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, 8(12), 5574–5576. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>
- Dong, R., Liu, X., Zhang, Q., Jiang, Z., Li, Y., Wei, Y., ... Kong, B. (2014). miR-145 inhibits tumor growth and metastasis by targeting metadherin in high-grade serous ovarian

- carcinoma. *Oncotarget*, 5(21), 10816–10829. Retrieved from <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2522>
- DU, J., ZHANG, Q., ZHANG, J., MAIHEMUTI, M., HE, H., & JIANG, R. (2025). Melanoma cell line-derived exosomal miR-424-5p: a key promoter of angiogenesis through LATS2 interaction. *Oncology Research*, 33(2), 357–367. Retrieved from <https://doi.org/10.32604/or.2024.050878>
- Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1473–1477. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401723>
- Guadamillas, M. C., Cerezo, A., & Del Pozo, M. A. (2011). Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 19), 3189–3197. Retrieved from <https://doi.org/10.1242/jcs.072165>
- He, W., Zhao, L., Wang, P., Ren, M., & Han, Y. (2025). MiR-125b-5p ameliorates ox-LDL-induced vascular endothelial cell dysfunction by negatively regulating TNFSF4/TLR4/NF- κ B signaling. *BMC Biotechnology*, 25(1), 11. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12896-025-00944-y>
- Hong, B. S., Ryu, H. S., Kim, N., Kim, J., Lee, E., Moon, H., ... Moon, H.-G. (2019). Tumor Suppressor miRNA-204-5p Regulates Growth, Metastasis, and Immune Microenvironment Remodeling in Breast Cancer. *Cancer Research*, 79(7), 1520–1534. Retrieved from <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0891>
- Howe, E. N., Cochrane, D. R., Cittelly, D. M., & Richer, J. K. (2012). miR-200c Targets a NF- κ B Up-Regulated TrkB/NTF3 Autocrine Signaling Loop to Enhance Anoikis Sensitivity in Triple Negative Breast Cancer.

- PLoS ONE*, 7(11), e49987. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049987>
- Howe, E. N., Cochrane, D. R., & Richer, J. K. (2011). Targets of miR-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance. *Breast Cancer Research*, 13(2), R45. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/bcr2867>
- Ke, K., & Lou, T. (2017). MicroRNA-10a suppresses breast cancer progression via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncology Letters*. Retrieved from <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6930>
- Kim, B., Yoo, H., Lee, A., Choi, K., & Yoon, S. K. (2017). Decreased expression of *VLDLR* is inversely correlated with miR-200c in human colorectal cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 56(6), 1620–1629. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/mc.22618>
- Kozak, J., Wdowiak, P., Maciejewski, R., & Torres, A. (2019). Interactions between microRNA-200 family and Sestrin proteins in endometrial cancer cell lines and their significance to anoikis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 459(1–2), 21–34. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03547-2>
- Lee, H. Y., Son, S. W., Moeng, S., Choi, S. Y., & Park, J. K. (2021). The Role of Noncoding RNAs in the Regulation of Anoikis and Anchorage-Independent Growth in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 627. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/ijms22020627>
- Li, J., Bulin Baila, Xu, T. X., Song, J., Su Rina, Wu, J., & Wang, T. (2022). Effects of hsa-mir-145-5p on the Regulation of msln Expression in Colorectal Adenocarcinoma.

- Analytical Cellular Pathology*, 2022, 1–11. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2022/5587084>
- Liu, J., Wu, X., Liu, H., Liang, Y., Gao, X., Cai, Z., ... Zhang, H. (2016). Expression of microRNA-30a-5p in drug-resistant and drug-sensitive ovarian cancer cell lines. *Oncology Letters*, 12(3), 2065–2070. Retrieved from <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4831>
- Liu, L., Sun, X., Yang, C., & Zou, X. (2021). <scp>MiR</scp> - 10a-5p restrains the aggressive phenotypes of ovarian cancer cells by inhibiting <scp>HOXA1</scp>. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 37(4), 276–285. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/kjm2.12335>
- Liu, X., Fu, Y., Zhang, G., Zhang, D., Liang, N., Li, F., ... Sun, H. (2019). miR-424-5p Promotes Anoikis Resistance and Lung Metastasis by Inactivating Hippo Signaling in Thyroid Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 15, 248–260. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.10.008>
- Liu, Y., Zhang, Y., Wu, H., Li, Y., Zhang, Y., Liu, M., ... Tang, H. (2017). miR-10a suppresses colorectal cancer metastasis by modulating the epithelial-to-mesenchymal transition and anoikis. *Cell Death & Disease*, 8(4), e2739–e2739. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.61>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. Retrieved from <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Malagobadan, S., & Nagoor, N. H. (2015). Evaluation of MicroRNAs Regulating Anoikis Pathways and Its Therapeutic Potential. *BioMed Research International*,

- 2015, 1–10. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2015/716816>
- Moradi, F., Mohajerani, F., & Sadeghizadeh, M. (2022). CCAT2 knockdown inhibits cell growth, and migration and promotes apoptosis through regulating the hsa-mir-145-5p/AKT3/mTOR axis in tamoxifen-resistant MCF7 cells. *Life Sciences*, 311, 121183. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121183>
- Mu, H., Xiang, L., Li, S., Rao, D., Wang, S., & Yu, K. (2019). MiR-10a functions as a tumor suppressor in prostate cancer via targeting KDM4A. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(4), 4987–4997. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/jcb.27774>
- Qin, E., Gu, S., Guo, Y., Wang, L., & Pu, G. (2023). MiRNA-30a-5p/VCAN Arrests Tumor Metastasis via Modulating the Adhesion of Lung Adenocarcinoma Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(12), 7568–7582. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04444-7>
- Qiu, B., Qi, X., & Wang, J. (2022). CircTLK1 Downregulation Attenuates High Glucose-Induced Human Mesangial Cell Injury by Blocking the AKT/NF-κB Pathway Through Sponging miR-126-5p/miR-204-5p. *Biochemical Genetics*, 60(5), 1471–1487. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10528-021-10146-8>
- Schoof, C. R. G., Botelho, E. L. da S., Izzotti, A., & Vasques, L. D. R. (2012). MicroRNAs in cancer treatment and prognosis. *American Journal of Cancer Research*, 2(4), 414–33.
- Shi, T., Zhang, C., & Xia, S. (2022). The potential roles and mechanisms of non-coding RNAs in cancer anoikis

- resistance. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 477(5), 1371–1380. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04384-6>
- Shi, Y., Liu, Z., Lin, Q., Luo, Q., Cen, Y., Li, J., ... Gong, C. (2021). MiRNAs and Cancer: Key Link in Diagnosis and Therapy. *Genes*, 12(8), 1289. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/genes12081289>
- Uzuner, E., Ulu, G. T., Gürler, S. B., & Baran, Y. (2022). The Role of MiRNA in Cancer: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment (pp. 375–422). Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8_18
- Wang, L., Zhao, S., & Yu, M. (2019). Mechanism of Low Expression of *miR-30a-5p* on Epithelial–Mesenchymal Transition and Metastasis in Ovarian Cancer. *DNA and Cell Biology*, 38(4), 341–351. Retrieved from <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4396>
- Wang, W., Zhang, Y., Huang, X., Li, D., Lin, Q., Zhuang, H., & Li, H. (2024). The role of the miR-30a-5p/BCL2L11 pathway in rosmarinic acid-induced apoptosis in MDA-MB-231-derived breast cancer stem-like cells. *Frontiers in Pharmacology*, 15. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1445034>
- Xu, W., Chang, J., Du, X., & Hou, J. (2017). Long non-coding RNA PCAT-1 contributes to tumorigenesis by regulating FSCN1 via miR-145-5p in prostate cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1112–1118. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.019>
- Yang, F., Bian, Z., Xu, P., Sun, S., & Huang, Z. (2023). *MicroRNA-204-5p*: A pivotal tumor suppressor. *Cancer Medicine*, 12(3), 3185–3200. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/cam4.5077>

- Yang, J., Rao, S., Cao, R., Xiao, S., Cui, X., & Ye, L. (2021). miR-30a-5p suppresses lung squamous cell carcinoma via ATG5 - mediated autophagy. *Aging*, 13(13), 17462–17472. Retrieved from <https://doi.org/10.18632/aging.203235>
- Ye, Y.-Y., Mei, J.-W., Xiang, S.-S., Li, H.-F., Ma, Q., Song, X.-L., ... Liu, Y.-B. (2018). MicroRNA-30a-5p inhibits gallbladder cancer cell proliferation, migration and metastasis by targeting E2F7. *Cell Death & Disease*, 9(3), 410. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0444-x>
- Yin, Y., Zhang, B., Wang, W., Fei, B., Quan, C., Zhang, J., ... Huang, Z. (2014). miR-204-5p Inhibits Proliferation and Invasion and Enhances Chemotherapeutic Sensitivity of Colorectal Cancer Cells by Downregulating RAB22A. *Clinical Cancer Research*, 20(23), 6187–6199. Retrieved from <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1030>
- Yu, D., Liu, H., Qin, J., Huangfu, M., Guan, X., Li, X., ... Chen, X. (2021). Curcumol inhibits the viability and invasion of colorectal cancer cells via miR-30a-5p and Hippo signaling pathway. *Oncology Letters*, 21(4), 299. Retrieved from <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12560>
- Yu, S., Wang, M., Zhang, H., Guo, X., & Qin, R. (2024). Resistance to gemcitabine is mediated by the circ_0036627/ <scp>miR</scp> -145/ <scp>S100A16</scp> axis in pancreatic cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 28(12). Retrieved from <https://doi.org/10.1111/jcmm.18444>
- Yu, S.-J., Hu, J.-Y., Kuang, X.-Y., Luo, J.-M., Hou, Y.-F., Di, G.-H., ... Shao, Z.-M. (2013). MicroRNA-200a Promotes Anoikis Resistance and Metastasis by Targeting YAP1 in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(6),

1389–1399. Retrieved from
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1959>

Yu, T., Liu, L., Li, J., Yan, M., Lin, H., Liu, Y., ... Yao, M. (2015). MiRNA-10a is upregulated in NSCLC and may promote cancer by targeting PTEN. *Oncotarget*, 6(30), 30239–30250. Retrieved from
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4972>

Zhang, Y., Shao, Y., Ren, J., Fang, Y., Yang, B., Lu, S., & Liu, P. (2024). NCAPD3 exerts tumor-promoting effects in prostatic cancer via dual impact on miR-30a-5p by STAT3-MALAT1 and MYC. *Cell Death Discovery*, 10(1), 159. Retrieved from
<https://doi.org/10.1038/s41420-024-01930-7>

Zheng, G., Qiu, G., Ge, M., Meng, J., Zhang, G., Wang, J., ... Xu, J. (2020). miR-10a in Peripheral Blood Mononuclear Cells Is a Biomarker for Sepsis and Has Anti-Inflammatory Function. *Mediators of Inflammation*, 2020, 1–10. Retrieved from
<https://doi.org/10.1155/2020/4370983>

İN VİTRO MODELLER: 3 BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİNE YAKLAŞIMLAR

Cesur KIRMANOĞLU¹

1. GİRİŞ

Hücre kültürü; doku ve organları bir araya getiren hücrelerin biyomoleküler sistemlerinin nasıl çalıştığı ve bu sistemlerin hastalıklara nasıl evrildiğini araştırılmasında vazgeçilmez bir yöntemdir(Duval et al., 2017). Hücre kültürü ilk kez 20. Yüzyılda hayvan hücrelerine uygulanmış bir tekniktir, bu teknik in vitro da hücrelerin davranışını gözlemlemek amacıyla geliştirilmiştir(Thorpe, 2007). Hücre kültürü tekniği ilk olarak hayvan hücrelerinde tavuk embriyosunu kısa süreli korumak amacıyla oluşturulan ılık salin kullanılması ile geliştirilen, doku kültürü prensibine dayanan bir tekniktir(Hudu, 2016). Hücre kültürü çalışmaları değişik hücre hatlarının kültüre edilip geliştirilmesi ile hücrelerdeki büyüme faktörleri, gelişim süreçleri, farklı hücre tiplerinin normal çalışma mekanizmaları, hücresel farklılaşma, hücre- hücre, hücre- matriks ilişkisi, oluşturulan hastalık modellerinde ilaç etken maddelerinin moleküler etkileri gibi birçok çalışmaya katkı sunmaktadır(Koçancı, Ad, & Ad, 2019). Hücre kültürü spesifik bir alanda değil endüstri, rejeneratif tıp, mühendislik gibi birçok alanda uygulamaları kullanılmaktadır(Duval et al., 2017). Hücre ve doku düzenlemeleri ile ilgili çalışmalar, in vivo hücresel mikro çevrelerini oluşturamayan 2 Boyutlu (2B) hücre kültürü ile

¹ Öğr. Gör., Ordu Üniversitesi, Akkuş Meslek Yüksekokulu, Ormanlık Bölümü, cesurkrmnoglu@gmail.com ORCID: 0000-0002-5378-8570.

oluşturulan hücre modelleri araştırmalarına dayanmaktadır(Huh, Hamilton, & Ingber, 2011).

2B hücre kültürü in vitro'da hücreleri geliştirmek, büyütmek, sürdürülebilir olarak uygulanan yaygın bir tekniktir. Hücrelerin yaşamını sürdürmesi ve büyümesi için besin açısından zengin, gerekli metabolitleri içeren bir besi yeri ile kontrol edilebilen ortamlardır. Çalışılmak istenen hücre hatlarının durumuna bağlı olarak, uygulanacak parametreler ve büyüme faktörleri hücre tipine göre değişkenlik gösterir. 2B hücre kültürü yara iyileşmesi (çizik) trans-well migrasyon tahlilleri hücre işleyişi hakkında önemli katkılar sağlamaktadır(Feng et al., 2025). Dokuların işlevini, oluşumunu ve patofizyolojilerini tamamen anlamak için, hücrelerin ve dokuların, 3 Boyutlu (3B) yapıları, mekanik ve biyokimyasal özellikleri mikro çevrelerindeki davranışlarını incelemek önemlidir. 2B kültürlerde hücrelerde farklılaşmalar olabilir ve bu farklılaşmış yapıları işlevsel olarak devamlılığı sağlayamazlar. 2B hücre kültürü modellerindeki sınırlamaları ve sorunların üstesinden gelmek için, hücre dışı matris (ECM) jelleri kullanılarak 3B hücre kültürü modellerinin geliştirilmesine yol açmıştır(Huh et al., 2011). Petersen ve Bissell 1992 yılında ilk defa 3B hücre kültürü modelini normal meme hücrelerinde ve kanserli meme hücrelerini taklit ederek organo tipik 3B hücre modelleri uygulanmıştır. Bu 3B hücre kültürü modelleri dokuların ve sistemlerin fizyolojik birçok özelliklerini ve yaşam koşullarını taklit etmesine ek olarak; ilerleyen yıllarda klinikte yeni tedavi teknikleri geliştirilmesine katkı sunacaktır(Habanjar, Diab-Assaf, Caldefie-Chezet, & Delort, 2021). Tümör hücrelerinin 3B ortamını yapısal ve işlevsel olarak 2B hücre kültürleri doğru temsil etmez. 2B hücre kültürleri 3B hücre kültürleri ile yapısı ve organizasyonu farklıdır, bu fark hücrelerin davranış, ilaç tepkilerini değiştirebilir. Bu karmaşık değişken durumu laboratuvar ortamında oluşturarak, farklı kanser hücre hatlarının

3B hücre kültürü modelleri (in vitro) kanser araştırmalarında ve ilaç uygulamalarında önemli bilgiler sunmaktadır.(Abuwatfa, Pitt, & Hussein, 2024) Tümör oluşumu mikro çevredeki değişikliklerle doğrudan ilişkilidir. Bu değişiklikler tümör hücresinde etkileri incelemek için 3B hücre kültürü tekniği ile incelemek gerçeğe yakın bir sonuç verecektir(Debnath & Brugge, 2005). 2B modeller, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini incelemek için yetersiz kalırken, 3B kültürler bu etkileşimleri daha iyi taklit eder ve kanser ilacı keşfinde önemli bir rol oynar. Kültürlerde testlerde, kanser ilaçlarının etkinliği genellikle 2B kültürlerde test edilir, ancak bu ilaçlar in vivo da uygulandığında tutarsız sonuçlar ortaya çıkabilir. Bu tutarsız durum, tümörlerin 3B doğasını taklit eden in vitro modellerin eksikliğinden kaynaklanabilir. Bu nedenle, kanser hücrelerinin 3B büyümesini destekleyen polimerik mikro yapılar geliştirilmiştir(Horning et al., 2008). Klinik öncesi araştırmalar, translasyonel kanser araştırmalarında yaygın olarak 2B hücre kültürleri ve hayvan modellemelerine dayanır. Bu teknikler, erişilebilirlikleri, uygun maliyetleri ve yüksek verimli toksisite ve ilaç tarama testleri için uygun olmaları nedeniyle tercih edilir. Ancak, 2B hücre kültürleri, in vivo hücresel mimari ve etkileşimleri tam yansıtmaz. Hasta kaynaklı tümör ksenogreftleri (PDX), tümörlerin hücresel karmaşıklığını ve heterojenliğini koruyabilir, fakat zayıf implantasyon oranları, uzun bağışıklık yeniden yapılandırma süreçleri, yüksek maliyet ve uzun üretim süreleri gibi dezavantajlara sahiptir(Nayak, Bentivoglio, Varani, & Signore, 2023). Tümör mikro çevresi (TME), deki değişimler tümör oluşumunda ana kriterlerden biridir. Bu değişimler kanser hücresinde sinyallerin modülünü belirlemek için, tasarlanan 3B kültürler kullanılabilmektedir(Fischbach et al., 2009). TME, tümör büyümesi ve ilerlemesi için kritik değerdedir. TME' nin biyokimyasal ve fiziksel özellikleri, kanser hücrelerinin çoğalması, metastazı ve istilası için gereklidir. Bu nedenle, kötü huylu hücrelerin endotel hücreleri, bağışıklık hücreleri,

makrofajlar ve fibroblastlar gibi tümörle ilişkili destekleyici hücrelerle nasıl etkileşime girdiğini anlamak önemlidir(Nayak et al., 2023). İlaçların hastalıklar üzerine etkisi ve toksik durumlarının belirlenmesi hastalığı tedavi etmede ve yeni ilaçların keşfinde ve gelişiminde önemlidir. İnsanlarda en doğrusu test yapmaktır fakat teknik ve etik kısıtlamalar vardır(Park, Huh, & Kang, 2021). Hücre kültürü çalışmalarında potansiyel yeni ilaçların maliyeti uygun olması ve kanser gibi sürenin önemli olduğu birçok hastalığın tedavisinin verimli önemlidir. Klinik çalışmalara giren ilaçların yalnızca %12' sinin insan kullanımına onay verilmektedir. Hücre kültürü çalışmalarının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Paul et al., 2010)(Prestwich, 2008).

2. 3 BOYUTLU (3B) HÜCRE KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ

3B hücre kültürleri iki ana sınıfta kategorize edilir. İskele tabanlı 3B hücre kültürleri (hidrojeller), iskele bazlı olmayan 3B kültürleridir(Costa et al., 2016). Tümör özelinde tek katmanlı hücre kültürler, tümör mikro çevresinde bulunan yapıları ve 3B organizasyon yapısını sağlayamaz ve ilaç direncini taklit edemez. Bu yönüyle terapötiklerin biyolojik performansının yanlış değerlendirmesi nedeniyle araştırmacılar in vivo da tümör özelliklerine yakın preklinik aşamada yeni tedavilerin gelişimine olanak sunan in vitro 3B hücre kültür sistemleri geliştirmektedirler(Breslin & O'Driscoll, 2013) (Tredan, Galmarini, Patel, & Tannock, 2007) (Costa et al., 2016).

2.1. Organoidler

Organoidler; hayvansal organların yapılarını taklit eder ve 3B kültürlerin organlara benzer yapıları ve işlevlerini gösteren kendi kendine farklılaşabilen hücrelerdir. Organoidler karmaşık yapıdadırlar, in vitro' da organların gelişimini temsil ettiği için

kalıtım ve patolojik çalışmalarda faydalı sonuçlar vermektedir. Organoidler, mide, karaciğer ve mesane gibi organa özgü hücrelerin karmaşık kümeleridir(McCauley & Wells, 2017) (Spence et al., 2011) (Lee, Koo, Hwang, & Lee, 2023). Organoidler, pluripotent, doku hücrelerinden (embriyonik, yetişkin) sağlıklı, tümör gibi hastalıklı dokulardan elde edilen progenitör ve farklılaşmış hücrelerden türetilir(Zhao et al., 2022). Doku benzeri yapıların ilk kez in vitro' da keratinositler ve 3T3 fibroblastlarında oluşturulan bir ko-kültür sisteminden gözlenmiştir(Yi, Zhang, Rathnam, Pongkulapa, & Lee, 2021). Organoid vaskülarizasyon tekniği, fizyolojik olarak gerçek muadillerine yakın olan mikro ortamları somutlaştırmak için tasarlanmıştır. Bu mikro ortamlar Mikroakışkan sistemleri, endotel hücre kaplı modüller ve vasküler endotelyal büyüme faktörü taşıyıcı sistemler organoidlerin iç kütlesine oksijen veya besin taşınmasını kolaylaştırabilen in vitro vaskülatür sistemlerdir(Golden & Tien, 2007) (McGuigan & Sefton, 2006).

2.2. Sferoid Kültür

Üç Boyutlu (3B) sferoid kültür modeller, in vivo tümörlerin stromal ortamını ve çok hücreli yapısını simüle ederek, kanser ilerlemesinin arkasındaki karmaşık mekanizmaları keşfetmek için yaygın olarak kullanılır. 2B sistemler ve hayvan modellerine kıyasla, 3B sferoid modeller, tümör özellikleri, ilaç keşfi, hücre-hücre etkileşimleri ve kanser hücrelerinin metabolik profili hakkında daha doğru bilgiler sağlar(Nayak et al., 2023). Sferoid kültürler hücrelerin kendiliğinden toplanması ve hücre yüzeyi integrinlerin ECM' ye bağlanmasıyla oluşur. Hücrenin ilk temasından sonra, hücre yüzeyi E-Kaderini yukarı regüle eder ve E-Kaderin etkileşim yoluyla kompakt bir yapın halini alır. Bu süreci oksijen, besin ve büyüme faktörleri gibi çeşitli faktörler etkiler(Gunti, Hoke, Vu, & London, 2021). Sferoid kültürler kullanım alanlarına göre ECM desteği ile ya da ECM olmadan

kültüre edilebilirler, iskele tabanlı yöntemler uzun süreli ve maliyetli olması nedeniyle iskele desteği olmayan sferoid kültürler daha yaygındır(Bosnakovski et al., 2004). Ankraj bağımlı ve bağımsız tümör sferoid üretim teknikleri vardır. Sferoid kültürlerin oluşturma yöntemine örnek liquid overlay tekniği olan hücre üretim kaplarına (6-12-24 well) hücrelerin 3B yapılarının kazanmalarını sağlamak adına welllerin yüzeyine tek katlı yapışmalarını engellemek için agar kullanarak kuyucukların yüzeyi agarla kaplanır ve hücreler birbirine yapışması sağlanır. Birbirine yapışan hücreler Multisellüler Tümör Sferoid(MTS) oluşturur. 1-4 gün arasında sferoid 3B hücre kültürlerin oluşumu başlar(Sant & Johnston, 2017) (Ahışhalı & Bilir, 2002) (Zıps, Howard D, & Michael, 2005).

2.3. Hidrojeller, İskele

Hidrojeller esnek yapısı ve mekanik özellikleri istenilen biyofonksiyona göre tasarlanması mümkün kıldığı için 3B kültürlerin kullanımda popüler bir hale gelmiştir. 3B hidrojeller doku mühendisliği, ilaç iletim sistemleri, sitotoksikite testi, ilaç taraması gibi birçok uygulama alanında kullanımı vardır(Ruedinger, Lavrentieva, Blume, Pepelanova, & Scheper, 2015). Hidrojeller hücre dışı matrisleri doğal hücrelere yakın benzerlik gösterdiği için 3B hücre kültür uygulamalarında kabul gören bir tekniktir. Hidrojeller sentetik olarak oluşturun birçok tipi vardır, ancak doğal hidrojel polimerleri kullanımı çalışmalarda *in vivo*’ ya daha yakın sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Doğal hidrojellerden en yaygın kullanılanları aljinat, kitosan, kolajendir(Andersen, Auk-Emblem, & Dornish, 2015). 3B hidrojellerin en önemli özelliği besin maddeleri, atık ürünler ve gazları iskele boyunca difüzyon yoluyla taşıma kapasitesidir(Li, Altreuter, & Gentile, 1996). Hidrojellerin oluşturulması, genel olarak malzeme içinde (sentetik, doğal) canlı hücrelerin kapsüllenmesini veya hücrelerin ekildiği kalıplar kullanılarak substratların üretilmesi prensibine dayanır. Hidrojel

bileşenlerini birleştirmek için fiziksel ve kimyasal çapraz bağlar kullanılarak sıvı çözeltinin içine katı malzemelerin geçişi sağlanır(Aggeli et al., 1997). İlaç taraması için model olarak hidrojeller kullanılarak yapılan çalışmalarda, sert kolajence zengin substratlar üzerinde yetiştirilen hücreler daha yumuşak substratlar üzerindeki hücrelere göre kemoterapilere daha dirençli oldukları tespit edilmiştir. Bu durumda hidrojeller hücrenin doğal ortamına benzer substratların oluşturulmasının, ilaç taraması gibi çalışmalara doğru sonuçlar vereceği açıktır(Caliari & Burdick, 2016).

2.4. Biyoyazıcılar

3B biyoyazıcı sistemler dokuların kendi arasında ve diğer doku hücreleri arasındaki ilişkilerinin daha hassas bir yaklaşım sergiler. Biyoyazıcı modeli 3B sferoid modeller ECM ile, ana ECM'ler arasında iletişim zayıftır. Bu iletişimi, hücrenin büyüme faktörleri, sinyal molekülleri gibi molekül katkı sağlar(Kim et al., 2019). Kök hücre ve kanser hücrelerinin fonksiyonunun kontrolünde etkin rol oynayan ECM'ler arası etkileşimlerin incelenmesi için gerekli substratların kullanımı sınırlıdır. Biyoyazıcı biyomürekkepleri hücreli/hücretsiz olarak kullanılarak hidrojellerde, organoidlerin büyümesi gözlemlenebilir(Bruno, Reid, & Sachs, 2019). 3B biyoyazıcılar karaciğer, böbrek, kalp gibi birçok organın yazımında, 3B yazım teknolojisi günümüzde Tıpta, protez alanında kullanılmaktadır. Organların birçoğunun yapay olarak üretimi ve in vivo' da uygulaması yakın gelecekte yaygın olarak yapılan bir teknik haline geleceği düşünülmekte olup, teknoloji yeterli olduğu taktirde bu alanda yapılan araştırmaların insan hayal gücü sınırlarını aşacağı tahmin edilmektedir(Mielczarek et al., 2015).

2.5. Çip Organlar, Mikroakışkan Sistemler

Çip organlar özel dizayn edilmiş polistiren ve cam malzemeden üretilmiş kanallara organların yapısal özelliklerine

benzeyen 3B hücrelerin kanallara yerleştirilerek gözlemlenmesini sağlayan sistemlerdir(Koçancı et al., 2019). Mikroakışkan sistemler genel olarak laboratuvar ortamında yapay olarak oluşturulan kontrollü akış sağlayan minyatür kanal sistemleridir. Mikroakışkan kanallar küçük miktarda sıvıyı işleyen yapılar olup, Kanal ağları sistemi özel olarak kalıplama ve oyma şeklinde oluşturulmakta ve kanal ağları sayesinde makro çevreyle bağlantı sağlamaktadır(BOŞGELMEZ, İÇÖZ, & YİĞİT, 2020). Hücre kültür çalışmalarında mikroakışkan sistemler in vivo benzer kılmak amacıyla tasarlanan bir sistem olup, in vivo çalışmalara göre doku metabolizmasını daha iyi anlamamızı sağlar(Turgut et al., 2022). Günümüzde kullanılan organ çip sistemleri gelecekte insan çip sistemine geçeceği öngörülmektedir. İnsan çip sistemi kan akışı ve damarlar vasıtasıyla kanın dağılımını ve doku, organlardaki yoğunluğunu fizyolojisi yorumlayabileceği ön görülmektedir. Bu sistem uygulanacak ilacın insan metabolizması üzerine etkisini, toksisitesi ve terapötik yapısını belirlerken, aynı zamanda kişiye özel ilaç tarama modeli olarak kullanılabilecektir(Perestrelo, Águas, Rainer, & Forte, 2015)(Mahler, Esch, Stokol, Hickman, & Shuler, 2016)(Zheng et al., 2016).

3. SONUÇ

3B kültürler, 2B kültürlerle göre daha doğal bir fenotipe sahiptir. 3B hücre kültürü sistemlerinin, doku yapısına benzerlik yeteneği, 2B kültürlerden daha gelişmiş bir özelliktir. Hücre-hücre iletişimi ve hücre farklılaşması 3B kültürlerde çok daha önemlidir. 3B kültürlerin ilaç tedavi etkinliğini tahmin etmedeki etkisi in vivo' ya yakındır ve in vitro ilaç etkisi ile in vivo ilaç etkisi arasında çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. 3B kültür sistemleri tümör biyolojisine ilginin artması ile tümör modelleme çalışmaları ön plana çıkmıştır. İn vivo araştırmalarda tümör

mikroçevresinin önemli olduğu, 3B kültür sistemlerinde çevre etkileşimlerinin önemi vurgulanmıştır. 3B hücre kültürü teknolojisinin geliştirilmesi ile, doku morfolojisi, hipoksinin önemi, ilaç keşfi, hücre bazlı tahliller ve azaltılmış hayvan kullanımı fizyolojik olarak daha öngörücü yaklaşımlar gibi pozitif yaklaşımlar sunmaktadır. 3B hücre kültürü çalışmaları kişiselleştirilmiş tıp alanında özelleşmiş ilaç uygulamalarında bizlere önemli bilgiler sunmaktadır, Tümörlü dokuların her bir hastada farklı molekül yapıda bulunması ve kişisel bağışıklık sistemi gibi mekanizmalar sonucunda ilaç etkisi kişiden, kişiye farklılık gösterebilir, bu nedenlerden 3B kültür çalışmalar kişiselleştirilmiş tıp alanında önemidir. 3B kültür sistemlerini rejeneratif tıp alanında, enfarktüs sonrası kardiyak fonksiyonun desteklenmesi ve iyileştirilmesi, osteoartritik kıkırdak bozulmasının düzeltilmesi ve in vitro çalışmaları için yapay cilt sağlanması 3B kültürün yeni ürünler ve fikirler getirebileceği alanlar arasındadır. İlerleyen yıllarda 3B hücre kültür tekniklerine teknolojik gelişimlerle beraber yeni teknikler eklenerek ve mevcut tekniklerle özellikle 3B biyoyazıcılar kullanılarak özelleşmiş kök hücreler modelleri kullanılarak doku ve organların tasarlanarak organ nakli ve kanserleşmiş dokuların tedavisinde daha etkin kullanılacağını ön görmekteyim.

KAYNAKÇA

- Abuwatfa, W. H., Pitt, W. G., & Hussein, G. A. (2024). Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *Journal of Biomedical Science*, 31(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-00994-y>
- Aggeli, A., Bell, M., Boden, N., Keen, J. N., Knowles, P. F., McLeish, T. C. B., ... Radford, S. E. (1997). Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric β -sheet tapes. *Nature*, 386(6622), 259–262. <https://doi.org/10.1038/386259a0>
- Ahışhalı, B., & Bilir, A. (2002). Tümör Hücrelerinin Multiselüler Tümör Sferoid Modelinde Üretilmesi. *İst. Tıp Fak. Mecmuası*, 65(1).
- Andersen, T., Auk-Emblem, P., & Dornish, M. (2015). 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays*, 4(2), 133–161. <https://doi.org/10.3390/microarrays4020133>
- Boşgelmez, İ. İ., İçöz, K., & Yiğit, F. E. (2020). Microfluidic Devices: A New Paradigm in Toxicity Studies. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 48(3), 245–263. <https://doi.org/10.15671/hjbc.610448>
- Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Ishiguro, T., Okumura, M., Iwanaga, T., ... Fujinaga, T. (2004). Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Experimental Hematology*, 32(5), 502–509. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.02.009>
- Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5–6), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>

- Bruno, R. D., Reid, J., & Sachs, P. C. (2019). The revolution will be open-source: how 3D bioprinting can change 3D cell culture. *Oncotarget*, 10(46), 4724–4726. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27099>
- Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*, 13(5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
- Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1427–1441. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>
- Debnath, J., & Brugge, J. S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature Reviews Cancer*, 5(9), 675–688. <https://doi.org/10.1038/nrc1695>
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, 32(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Feng, L., Pan, R., Ning, K., Sun, W., Chen, Y., Xie, Y., ... Yu, L. (2025). The impact of 3D tumor spheroid maturity on cell migration and invasion dynamics. *Biochemical Engineering Journal*, 213, 109567. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109567>
- Fischbach, C., Kong, H. J., Hsiong, S. X., Evangelista, M. B., Yuen, W., & Mooney, D. J. (2009). Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2), 399–404. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808932106>

- Golden, A. P., & Tien, J. (2007). Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element. *Lab on a Chip*, 7(6), 720. <https://doi.org/10.1039/b618409j>
- Gunti, S., Hoke, A. T. K., Vu, K. P., & London, N. R. (2021). Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers*, 13(4), 874. <https://doi.org/10.3390/cancers13040874>
- Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2021). 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12200. <https://doi.org/10.3390/ijms222212200>
- Horning, J. L., Sahoo, S. K., Vijayaraghavalu, S., Dimitrijevic, S., Vasir, J. K., Jain, T. K., ... Labhasetwar, V. (2008). 3-D Tumor Model for In Vitro Evaluation of Anticancer Drugs. *Molecular Pharmaceutics*, 5(5), 849–862. <https://doi.org/10.1021/mp800047v>
- Hudu, S. A. (2016). Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15837.7460>
- Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*, 21(12), 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>
- Kim, M. J., Chi, B. H., Yoo, J. J., Ju, Y. M., Whang, Y. M., & Chang, I. H. (2019). Structure establishment of three-dimensional (3D) cell culture printing model for bladder cancer. *PLOS ONE*, 14(10), e0223689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223689>

- Koçancı, F. G., Ad, B., & Ad, B. (2019). *Üç Boyutlu Hücre Kültürü Modelleri ve Uygulamaları*. 8–14.
- Lee, S.-Y., Koo, I.-S., Hwang, H. J., & Lee, D. W. (2023). In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discovery*, 28(4), 119–137. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2023.03.006>
- Li, R. H., Altreuter, D. H., & Gentile, F. T. (1996). Transport characterization of hydrogel matrices for cell encapsulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(4), 365–373. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960520\)50:4<365::AID-BIT3>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960520)50:4<365::AID-BIT3>3.0.CO;2-J)
- Mahler, G. J., Esch, M. B., Stokol, T., Hickman, J. J., & Shuler, M. L. (2016). Body-on-a-Chip Systems for Animal-free Toxicity Testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, 44(5), 469–478. <https://doi.org/10.1177/026119291604400508>
- McCauley, H. A., & Wells, J. M. (2017). Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development*, 144(6), 958–962. <https://doi.org/10.1242/dev.140731>
- McGuigan, A. P., & Sefton, M. V. (2006). Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31), 11461–11466. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602740103>
- Mielczarek, J., Gazdowicz, G., Kramarz, J., Łątka, P., Krzykawski, M., Miroszewski, A., ... Wróbel, S. (2015). A Prototype of a 3D Bioprinter. *Solid State Phenomena*, 237, 221–226. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.237.221>

- Nayak, P., Bentivoglio, V., Varani, M., & Signore, A. (2023). Three-Dimensional In Vitro Tumor Spheroid Models for Evaluation of Anticancer Therapy: Recent Updates. *Cancers*, 15(19), 4846. <https://doi.org/10.3390/cancers15194846>
- Park, Y., Huh, K. M., & Kang, S.-W. (2021). Applications of Biomaterials in 3D Cell Culture and Contributions of 3D Cell Culture to Drug Development and Basic Biomedical Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2491. <https://doi.org/10.3390/ijms22052491>
- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., & Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), 203–214. <https://doi.org/10.1038/nrd3078>
- Perestrelo, A., Águas, A., Rainer, A., & Forte, G. (2015). Microfluidic Organ/Body-on-a-Chip Devices at the Convergence of Biology and Microengineering. *Sensors*, 15(12), 31142–31170. <https://doi.org/10.3390/s151229848>
- Prestwich, G. D. (2008). Evaluating Drug Efficacy and Toxicology in Three Dimensions: Using Synthetic Extracellular Matrices in Drug Discovery. *Accounts of Chemical Research*, 41(1), 139–148. <https://doi.org/10.1021/ar7000827>
- Ruedinger, F., Lavrentieva, A., Blume, C., Pepelanova, I., & Scheper, T. (2015). Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2), 623–636. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6253-y>

- Sant, S., & Johnston, P. A. (2017). The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*, 23, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>
- Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., ... Wells, J. M. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470(7332), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature09691>
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Tredan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., & Tannock, I. F. (2007). Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), 1441–1454. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>
- Turgut, M., Üniversitesi, Ö., Myo, Y., Ve, E., Bölümü, O., Cihaz Teknolojisi, B., & Malatya, T. (2022). Mikroakışkan sistemlerde biyomedikal uygulamalar ve gelişmeler Biomedical applications and advances in microfluidic systems Zülfü Tüylek. *Derleme / Review Article Journal of Medical Topics & Updates (Journal of MTU)*, 1(2), 93–104. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6989655>
- Yi, S. A., Zhang, Y., Rathnam, C., Pongkulapa, T., & Lee, K. (2021). Bioengineering Approaches for the Advanced Organoid Research. *Advanced Materials*, 33(45). <https://doi.org/10.1002/adma.202007949>
- Zhao, Z., Chen, X., Dowbaj, A. M., Sljukic, A., Bratlie, K., Lin, L., ... Yu, H. (2022). Organoids. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1), 94. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00174-y>

- Zheng, F., Fu, F., Cheng, Y., Wang, C., Zhao, Y., & Gu, Z. (2016). Organ-on-a-Chip Systems: Microengineering to Biomimic Living Systems. *Small*, 12(17), 2253–2282. <https://doi.org/10.1002/sml.201503208>
- Zips, D., Howard D, T., & Michael, B. (2005). New Anticancer Agents: In Vitro and In Vivo Evaluation. *In Vivo*, 19(1–8).

**AKADEMİK PERSPEKTİFTEN MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE
GENETİK**

yaz
yayınları

YAZ Yayınları
M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar / AFYONKARAHİSAR
Tel : (0 531) 880 92 99
yazyayinlari@gmail.com • www.yazyayinlari.com