

ROCK inhibitora Y-27632 ietekme uz krūts vēža un fibroblastu atsauces šūnu līnijām

*Linda Feldmane, Inese Čakstiņa, Valdis Pirsko,
Rasma Dortāne, Agnese Ezerta,
Zanda Daneberga*

Inese.Cakstina@rsu.lv
Rīgas Stradiņa universitāte,
Onkoloģijas institūts, Molekulārās ģenētikas laboratorija, Latvija

Kopsavilkums

Ievads. Krūts vēzi veido heterogēna šūnu populācija, tāpēc optimālas šūnu augšanas panākšanai *in vitro* kultivēšanas barotnei jāpievieno dažādi hormoni un augšanas faktori. Pievienojot barotnei ar Rho proteīnu saistīto kināžu (angļu val. *Rho-associated protein kinase*, ROCK) inhibitoru Y-27632, tiek veicināta šūnu proliferācija un kavēta apoptoze.

Darba mērķis. Pētījumā tiek skatīta Y-27632 ietekme uz krūts vēža šūnu līniju MCF-7 un dermālo fibroblastu līniju HDFa.

Materiāls un metodes. Šūnu līnijas tika kultivētas barotnēs ar Y-27632, salīdzināta šūnu morfoloģiskā aina, populācijas dubultošanās laiks (PDL), dzīvotspēja un galveno krūts vēzi raksturojošo receptoru un proliferācijas marķiera gēnu ekspresijas izmaiņas.

Rezultāti. Y-27632 pievienošana barotnei samazina MCF-7 starpšūnu adhēziju, bet barotnēs ar samazinātu seruma daudzumu tas palielina populācijas dubultošanās laiku un dzīvotspēju. Barotnē ar Y-27632 ietekmē samazinātu glikozes un seruma daudzumu HDFa ir izmaiņas morfoloģiskajā ainā, pastiprināta proliferācija un lielāka dzīvotspēja.

Secinājumi. Krūts vēža atsauces šūnās (MCF-7) Y-27632 ietekmē pastiprinājās *ESR2*, *PGR* un *MKI67* gēnu ekspresija, bet fibroblastos (HDFa) tika novērota paaugstināta *ESR1*, *PGR* un *MKI67* gēnu ekspresija.

Atslēgvārdi: krūts vēzis, ROCK, Y-27632, populācijas dubultošanās laiks, šūnu dzīvotspēja.

Ievads

Ar Rho (Ras homologu) saistītās kināzes (ROCK) ir serīna / treonīna kināzes. Tām ir divas izoformas: ROCK I un ROCK II. Šīm izoformām kopīgi ir 65 % no aminoskābju sekvences, visaugstākā līdzība ir tieši piesaistes domēnos – 95 % (*Nakagawa et al.*, 1996). ROCK tiek aktivizētas, kad tām piesaistās Rho, kas ir GTF (guanozīntrifosfāta) saistītā formā (*Ishizaki et al.*, 1996). ROCK regulē citoskeletu un kontrolē šūnu kontrakcijas procesus, kas saistīti arī ar šūnu migrāciju. Tas veicina MDA-MB-231 krūts vēža atsauces šūnu migrāciju (*Pille et al.*, 2005). Papildus tas stimulē šūnu adhēziju pie substrāta (*Tominaga and Barber*, 1998) un starpšūnu kontaktu veidošanu (*Walsh et al.*, 2001). ROCK ir nepieciešamas CR3 vadītai fagocitozei (*Caron and Hall*, 1998) un apoptozei (*Mills et al.*, 1998).

Viens no ROCK inhibitoriem ir Y-27632. Tas inhibē ROCK, piesaistoties kināzes katalītiskajā centrā (Narumiya et al., 2000) un kavējot gludo muskuļu kontrakcijas. ROCK inhibīcija samazina krūts vēža metastāžu veidošanos (Liu et al., 2009). Embrionālās cilmes šūnas bieži salīdzina ar vēža šūnām, jo abi šūnu veidi var neierobežoti dalīties. Y-27632 veicina cilvēka embrionālo cilmes šūnu proliferāciju (Watanabe et al., 2007), tātad tas varētu līdzīgi ietekmēt vēža šūnas. Y-27632 var inhibēt ne tikai ROCK, bet arī vairākas citas proteīnu kināzes (Davies et al., 2000).

Y-27632 var pievienot šūnu kultivēšanas barotnēm, lai panāktu optimālu šūnu augšanu. Inhibējot ROCK, tiek nomākta šūnu apoptoze. Tas nesamazina šūnu spēju dalīties, jo, neraugoties uz ROCK inhibīciju, netiek traucēta citu citokinēzei nepieciešamu proteīnu darbība (Sahai et al., 1999). Y-27632 ietekme palielina MCF-7 šūnu proliferāciju (Yang and Kim, 2014).

Krūts vēzi var iedalīt sešos molekulāros apakštīpos: luminālais A, luminālais B, HER2 pārekspresijas, bazālais, normāla tipa un krūts vēzis ar vāju kļaudina ekspresiju. Lai gan šāds iedalījums sniedz daudz plašāku informāciju par audzēju, tas vēl netiek izmantots klīniskajā praksē, jo nav pietiekami standartizēts. Balstoties uz šo iedalījumu, visizplatītākais krūts vēža apakštīps ir luminālais A, un tas vislabāk padodas ārstēšanai. Vissliktāk ārstēšanai padodas bazālais, HER2 pārekspresijas un apakštīps ar vāju kļaudina ekspresiju (Eroles et al., 2012).

Darbā izmantotā krūts vēža šūnu līnija MCF-7 ir invazīvas, duktālas karcinomas šūnu līnija, kas iegūta no izsvīduma pleirā. MCF-7 piemīt dažas iezīmes, kas norāda uz krūts epitēlija šūnām, piemēram, spēja veidot ciešus sakopojumus, kā arī epitēliālajām šūnām raksturīgais fenotips (Soule et al., 1972). Tai ir raksturīga estrogēna receptoru (ESR) un progesterona receptoru (PGR) proteīnu pārekspresija, bet HER2 proteīna ekspresija ir pazemināta (Lacroix and Leclercq, 2004). MCF-7 ir lumināla A krūts vēža šūnu līnija (Carey et al., 2006).

Zidītājiem fibroblasti ir ļoti heterogēni. Tiem ir raksturīgas vārpstveida formas (Chang et al. 2002). Fibroblasti ne tikai nodrošina mikrovidi saistaudos, bet arī regulē diferenciāciju un nodrošina homeostāzi blakus esošajām epitēlija šūnām (Simian et al., 2001). Tie piedalās ārpusšūnas matricsa sadalīšanās procesos, regulē tuvējo epitēlija šūnu diferenciāciju, modulē imūnās atbildes un kontrolē homeostāzi. Turklāt fibroblasti var veicināt audzēja attīstību un metastāžu veidošanos (Olaso et al., 1997).

Darba mērķis

Darba mērķis bija noskaidrot, kāda ir ROCK inhibitora Y-27632 ietekme uz krūts vēža un fibroblastu atsauces šūnu līnijām.

Metodes

Šūnu kultivēšana. Šūnas tika izsētas sešu lauciņu CellPlus platē (Starsted) un kultivētas trīs kontroles barotnēs (bez Y-27632):

- 1) **A10** (DMEM F : 12 (1 : 1), 10 % fetālais liellopa serums (FBS), 1 % 1x penicilīns / streptomicīns (100 U/ml penicilīns un 0,1 mg/ml streptomicīns), 2,5 µg/ml B amfotericīns (visi no Sigma-Aldrich), 0,002 mM L-glutamīns (Thermo Fisher Scientific));
- 2) **A5+** (DMEM F : 12 (1 : 1), 5 % FBS, 1 % 1x penicilīns / streptomicīns (100 U/ml penicilīns un 0,1 mg/ml streptomicīns), 2,5 µg/ml B amfotericīns, 10 µg/ml epidermālais augšanas faktors (EGF), 100 ng/ml holēras toksīns (Ct), 1 µg/ml hidroksokortizons (Hc), 5 µg/ml insulīns (I), 10 µM trijodtironīns (T) (visi no Sigma-Aldrich), 0,002 mM L-glutamīns (Thermo Fisher Scientific), 1 % HEPES, 5 µg/ml apotransferīns (ApoT) (abi no AppliChem) un 0,01 µM estradiols (E2) (Cayman Chemical Company));
- 3) **B5+** (M199 (Sigma Aldrich), 5 % FBS, 1 % 1x penicilīns / streptomicīns (100 U/ml penicilīns un 0,1 mg/ml streptomicīns), 2,5 µg/ml B amfotericīns, 1 % HEPES, 10 µg/ml EGF, 5 µg/ml ApoT, 100 ng/ml Ct, 0,01 µM E2, 1 µg/ml Hc, 5 µg/ml I un 10 µM T)).

Šūnas tika kultivētas 37 °C 5 % CO₂ līdz 80 % konfluencī. Tad tās tika sadalītas divās daļās, vienu daļu turpināja kultivēt kontroles barotnēs, bet otru – barotnēs, kam pievienots 10 μM Y-27632 (*Sigma-Aldrich*). Šūnas tika monitorētas reizi 2–3 dienās. Pēc 80 % konfluences sasniegšanas šūnas tika tripsinīzētas un skaitītas, izmantojot Neibauera hemocitometru (*Hausser Scientific*) un tripānzilo (*Sigma-Aldrich*).

Populācijas dubultošanās laiks (PDL) tika aprēķināts pēc formulas:

$$PDL = L/\log_2(N1/N0),$$

kur L – kultivēšanas laiks stundās, N1 – šūnu skaits kultivēšanas beigās, N0 – šūnu skaits kultivēšanas sākumā (*Li et al., 2013*).

Šūnu dzīvotspēja tika aprēķināta pēc formulas:

$$Dzīvotspēja (\%) = (M \times 100)/Kop,$$

kur M – mirušo šūnu skaits, Kop – kopējais šūnu skaits.

Komplementārās DNS (kDNS) sintēze. Pēc šūnu tripsinīzēšanas tās tika lizētas, izmantojot *QIAzol* (*Qiagen*). 500–1000 ng kopējās RNS tika izmantota kDNS sintēzei (*RevertAid H Minus* kDNS sintēzes komplekts, *Thermo Scientific*), kuras kvalitāte tika pārbaudīta, izmantojot trīs pastāvīgi ekspresētos gēnus – *ACTB1*, *GAPDH* un *PGK1*.

Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija (PĶR). Gēnu ekspresijas izmaiņas tika noteiktas ar reālā laika PĶR (*ViiA7, Applied Biosystems*). Reakcijas maisījumam tika izmantots 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (*Solis BioDyne*). Iekšējai kontrolei tika izmantoti *ACTB1* un *GAPDH*. Rezultāti tika analizēti, izmantojot $\Delta\Delta C_T$ metodi (*Winer et al., 1999*). Ja vērtība ir pozitīva, tad attiecīgā gēna ekspresija ir palielinājusies, ja negatīva, tad samazinājusies. Par būtisku tika uzskatīta tāda relatīvā izmaiņa, kuras vērtība bija > 1.

Rezultāti

Šūnu morfoloģija. Pēc 15 dienu MCF-7 kultivēšanas kontroles barotnēs būtiskas atšķirības šūnu morfoloģijā netika novērotas (sk. 1. att.). Savukārt šūnas, kas tika pakļautas Y-27632 ietekmei, neveidoja tik ciešus sakopojumus kā šūnas kontroles barotnēs, kas varētu liecināt par vājākiem starpšūnu kontaktiem. Šis efekts bija izteiktāks tām šūnām, kas kultivētas barotnēs ar samazinātu seruma daudzumu.

Fibroblastu līnijā HDFa būtiska atšķirība bija vērojama tikai šūnām, kas kultivētas B5+ Y+ barotnē (sk. 2. F att.). Tām vairs nebija fibroblastiem raksturīgās vārpstveida formas.

Populācijas dubultošanās laiks (PDL). MCF-7 PDL kontroles barotnēs A10, A5+ un B5+ (visas bez Y-27632) bija attiecīgi 127, 175 un 208 stundas. Barotnē A10 Y+ PDL bija palielinājies, un tas bija 200 stundas, bet abās pārējās barotnēs – A5+ Y+ un B5+ Y+ – PDL samazinājās un bija attiecīgi 75 un 94 stundas (sk. 3. A att.).

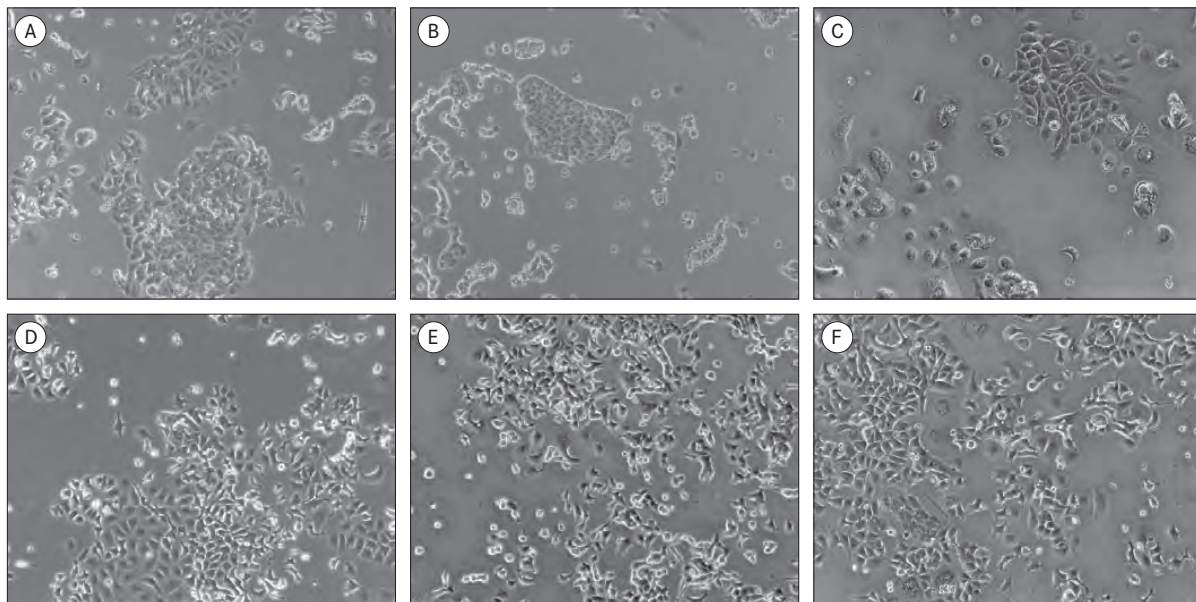
Šūnu līnijas HDFa barotnē A10 PDL bija 63 stundas, A5+ – 47 stundas, B5+ – 405 stundas. Barotnēs A10 Y+ un A5+ Y+ PDL bija palielinājies, un tas bija attiecīgi 86 un 54 stundas. Barotnē B5+ Y+ PDL bija samazinājies nedaudz vairāk nekā četras reizes un bija 97 stundas (sk. 3. B att.).

Šūnu dzīvotspēja. Šūnu līnijas MCF-7 dzīvotspēja A10 barotnē ir 91 %, bet A10 Y+ barotnē tā bija samazinājusies par 7,1 %. Turpretī abās pārējās barotnēs dzīvotspēja palielinājās, ja tajās bija pievienots Y-27632. A5+ Y+ barotnē dzīvotspēja bija palielinājusies par 13,4 %, bet B5+ Y+ barotnē – par 7,7 % (sk. 4. A att.).

Šūnu līnijas HDFa dzīvotspēja A10 Y+ barotnē bija tikai par 2,6 % lielāka nekā A10 barotnē. Arī B5+ Y+ barotnē HDFa dzīvotspēja bija lielāka nekā barotnē bez Y-27632, šajā gadījumā par 12,3 %. A5+ barotnē dzīvotspēja bija par 9,3 % lielāka nekā barotnē A5+ Y+ (sk. 4. B att.).

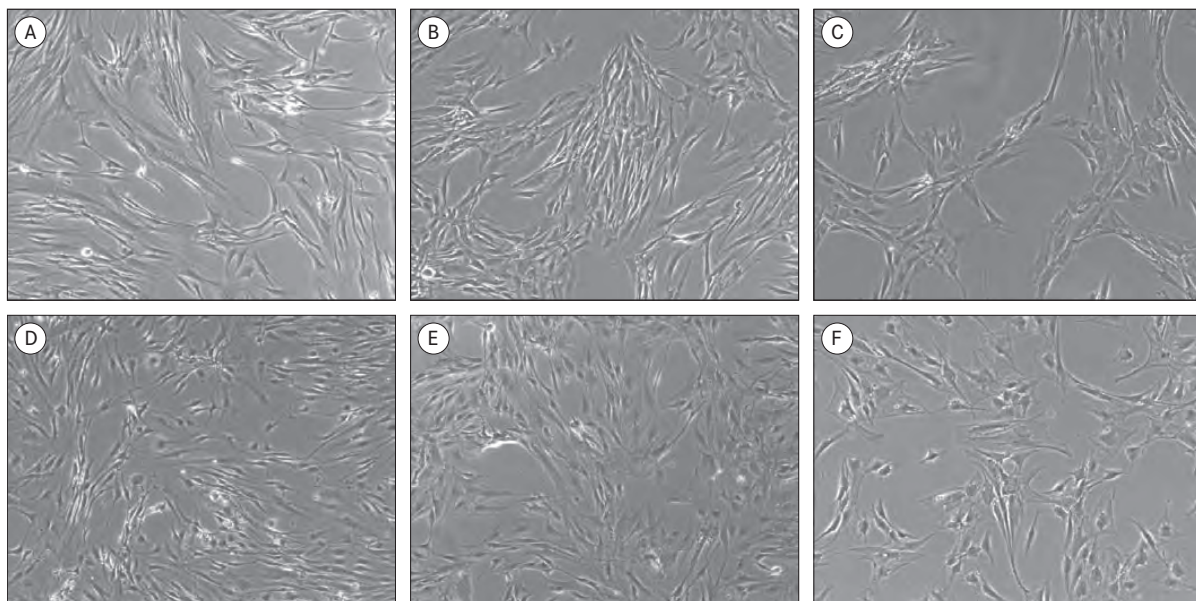
1. attēls. Šūnu līnija MCF-7 dažādās kultivēšanas barotnēs 15. dienā: barotnēs A10 (A), A5+ (B), B5+ (C), A10 ar Y-27532 (D), A5+ ar Y-27632 (E) un B5+ ar Y-7632 (F)

Cell line MCF-7 in different media, day 15th, cultivated in media A10 (A), A5+ (B), B5+ (C), A10 with Y-27632 (D), A5+ with Y-27632 (E) and B5+ with Y-27632 (F)

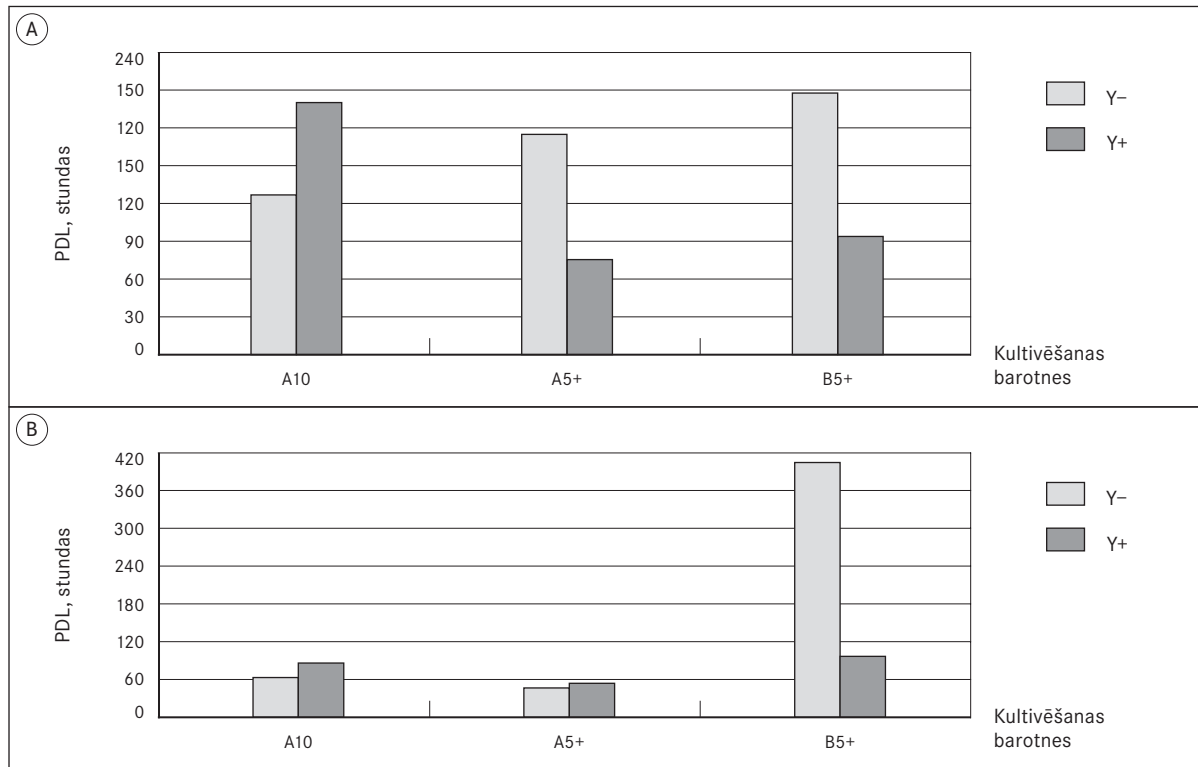


2. attēls. Šūnu līnija HDFa dažādās kultivēšanas barotnēs 7. dienā: barotnēs A10 (A), A5+ (B), B5+ (C), A10 ar Y-27532 (D), A5+ ar Y-27632 (E) un B5+ ar Y-7632 (F)

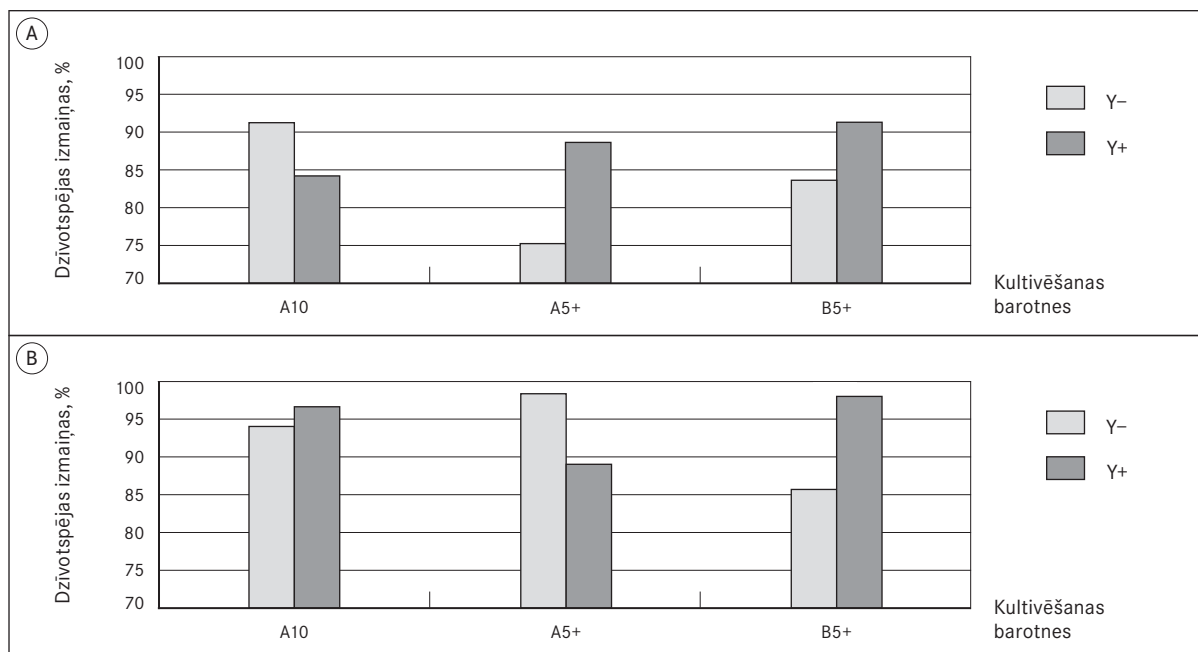
Cell line HDFa in different media, day 7th, cultivated in media A10 (A), A5+ (B), B5+ (C), A10 with Y-27632 (D), A5+ with Y-27632 (E) and B5+ with Y-27632 (F)



3. attēls. MCF-7 (A) un HDFa (B) populācijas dubultošanās laika (PDL) izmaiņas dažādās barotnēs
Changes of MCF-7 (A) and HDFa (B) population doubling time (PDT) in different media



4. attēls. MCF-7 (A) un HDFa (B) dzīvotspējas izmaiņas dažādās kultivēšanas barotnēs
Changes of viability in MCF-7 (A) and HDFa (B) in different media

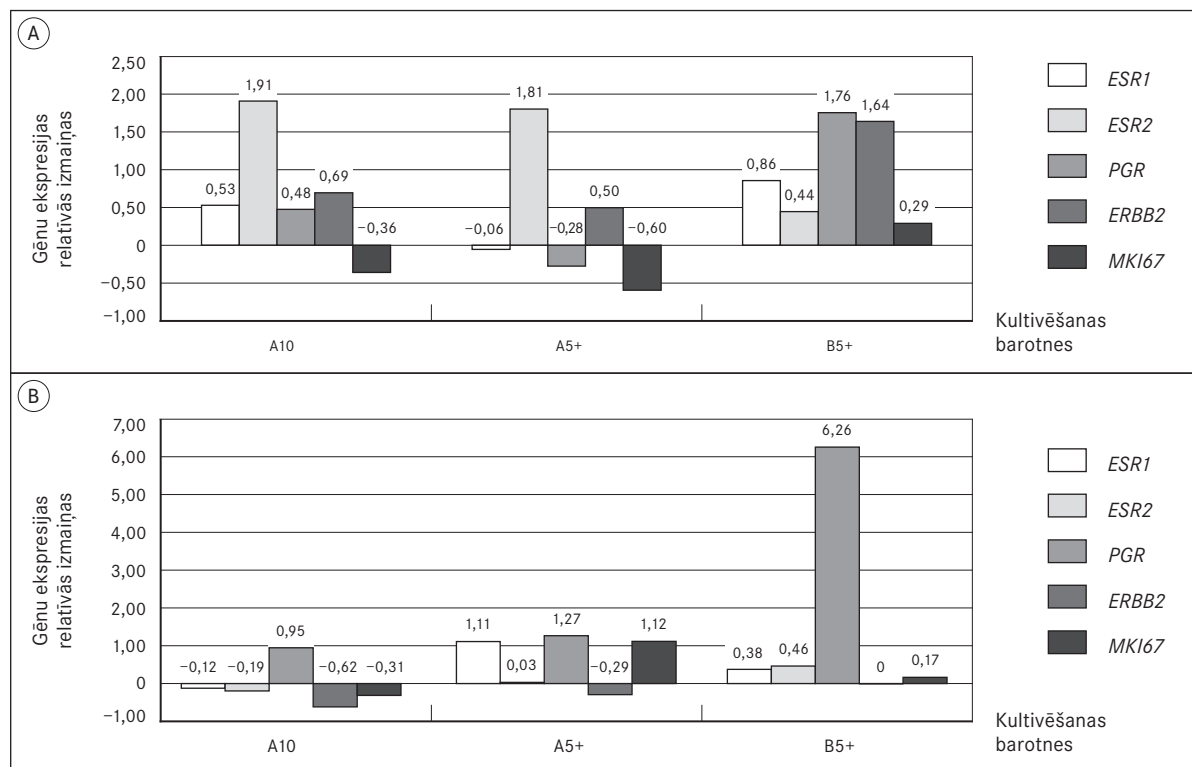


Gēnu ekspresijas relatīvās izmaiņas. Šūnu līnijā MCF-7 gēna *ESR1* ekspresija nebija būtiski izmainījusies, bet gēna *ESR2* ekspresija bija būtiski izmainījusies barotnēs A10 (1,91) un A5+ (1,81) (sk. 5. A att.). Gēnu *PGR* un *ERBB2* ekspresijas MCF-7 šūnās bija būtiski izmainījušās tikai B5+ barotnē (attiecīgi 1,76 un 1,64). *MKI67* ekspresija pārbaudītajās barotnēs nebija būtiski izmainījusies.

Šūnu līnijā HDFa gēna *ESR1* ekspresija bija būtiski izmainījusies tikai barotnē A5+ (1,11) (sk. 5. B att.), bet *ESR2* un *ERBB2* ekspresija pārbaudītajās barotnēs nebija būtiski izmainījusies. *PGR* ekspresija bija būtiski palielinājusies barotnēs A5+ (1,27) un B5+ (6,26). Gēna *MKI67* ekspresija bija būtiski izmainījusies barotnē A5+ (1,12).

5. attēls. Gēnu ekspresijas relatīvās izmaiņas šūnu līnijās MCF-7 (A) un HDFa (B) atkarībā no barotnes veida. (Grafikā ir attēlots, kā šūnu kultūru, kas kultivētas barotnēs ar Y-27632, gēnu ekspresija atšķiras no tām, kas kultivētas bez Y-27632)

Gene expression fold change depending on medium in cell lines MCF-7 (A) and HDFa (B).
(Gene expression changes depending on whether Y-27632 is in the medium)



Diskusija

MCF-7 šūnu līnija tika izmantota, lai noteiktu Y-27632 ietekmi tieši uz krūts vēža šūnām. Lai gan pētījumos bieži izmanto šo atsauces šūnu līniju, pēc tās var spriest tikai par vienu no vairākiem krūts vēža apakštīpiem (*Eroles et al., 2012*). Otrā darbā izmantotā atsauces šūnu līnija bija cilvēka dermālo fibroblastu līnija jeb HDFa, un tā tika izmantota kā kontroles šūnu līnija.

Šūnu līnijai MCF-7 barotnēs, kurās tika pievienots Y-27632, bija vājāka starpšūnu adhēzija, kaut gan šai šūnu līnijai ir raksturīga šūnu sakopojumu veidošana (*Soule et al., 1972*). Citā pētījumā, kas veikts ar MCF-7 šūnām, ir iegūti līdzīgi rezultāti. Kultivējot šūnas barotnē, kurā pievienots Y-27632, tām samazinājās starpšūnu adhēzija (*Yang and Kim, 2014*). Šo efektu varētu skaidrot ar to, ka viena no ROCK funkcijām ir starpšūnu adhēzijas veidošana, bet Y-27632 to inhibē (*Walsh et al., 2001*). Šis efekts bija izteiktāks barotnēs ar samazinātu seruma koncentrāciju.

Tāpat kā iepriekš aprakstīts literatūrā (*Yang and Kim, 2014*), Y-27632 ietekmē MCF-7 šūnu proliferācija uzlabojās un dzīvotspēja palielinājās. Tas vislabāk novērojams barotnēs ar samazinātu FBS koncentrāciju, tajās populācijas dubultošanās laiks bija samazinājies vairāk nekā divas reizes, kas liecina par intensīvāku proliferāciju. Šajās barotnēs tika novērota arī lielāka šūnu dzīvotspēja. Barotnē A10 Y+ populācijas dubultošanās laiks bija nedaudz palielinājies un dzīvotspēja samazinājusies. Diemžēl nav literatūras datu par Y-27632 un seruma vai pētījumā izmantoto barotņu piedevu mijiedarbību.

Šūnu līnijai MCF-7 būtiski izmainījušās trīs gēnu ekspresijas: *ESR2* barotnēs A10 un A5+, bet barotnē B5+ – *PGR* un *ERBB2*. *PGR* ir nepieciešams normālu krūts audu attīstībai, tomēr pastiprināta tā ekspresija krūts vēža šūnās veicina proliferāciju un kavē apoptozi (*Knutson and Lange, 2014*), kas sakrīt arī ar šajā darbā iegūtajiem datiem – B5+ Y+ barotnē ir intensīvāka proliferācija un lielāka dzīvotspēja. MCF-7 ir raksturīga pazemināta *ERBB2* ekspresija (*Lacroix and Leclercq, 2004*), tātad, barotnei B5+ pievienojot Y-27632, tiek izmainīta viena no krūts vēža šūnu raksturojošajām īpašībām.

A10 barotnē Y-27632 ietekme uz HDFa nebija liela. Šūnas nebija morfoloģiski atšķirīgas. Populācijas dubultošanās laiks un dzīvotspēja bija nedaudz palielinājusies, bet neviens no pārbaudītajiem gēniem nebija būtiski izmainījies. To varētu skaidrot ar lielāku seruma koncentrāciju, kas fibroblastiem ir vispiemērotākā.

A5+ barotnē Y-27632 nebija būtiskas ietekmes uz HDFa morfoloģisko ainu. Populācijas dubultošanās laiks gandrīz nemainījās, bet dzīvotspēja ir samazinājusies. Šajā barotnē bija nedaudz palielinājusies *ESR1*, *PGR* un *MKI67* gēnu ekspresija, tomēr šīs izmaiņas bija nelielas.

Vislielākās HDFa izmaiņas tika novērotas B5+ Y+ barotnē. Šajā barotnē fibroblastiem bija citāds fenotips un tiem vairs nevarēja novērot raksturīgo vārpstveida formu. Rezultātus varētu skaidrot ar to, ka, inhibējot ROCK, fibroblastiem vairs nevar novērot centrālās stresa šķiedras, bet pie šūnu malām tās saglabājas (*Katoh et al., 2001*). B5+ barotnē Y-27632 ietekmē populācijas dubultošanās laiks bija samazinājies vairāk nekā četras reizes. Tomēr, lai šīs lielās izmaiņas apstiprinātu, eksperimentu vajadzētu atkārtot. B5+ Y+ barotnē bija palielinājusies dzīvotspēja. Šajā barotnē vienīgā nozīmīgā ekspresijas izmaiņa (> 6) bija *PGR* gēnam. Šos rezultātus varētu skaidrot ar to, ka barotnes sastāva ietekmē (samazināts glikozes un seruma daudzums, barotnes piedevas) šūnas ir izmainījušās un Y-27632 šo šūnu veidu ietekmē vairāk. Tomēr detalizētākai izpētei būtu nepieciešams eksperimentus atkārtot.

Secinājumi

Y-27632 pievienošana barotnei samazina MCF-7 starpšūnu adhēziju, bet barotnēs ar samazinātu seruma daudzumu tas palielina populācijas dubultošanās laiku un dzīvotspēju. Y-27632 ietekmē barotnē ar samazinātu glikozes un seruma daudzumu mainījās HDFa, bija izmaiņas šūnu morfoloģiskajā ainā, samazinājās populācijas dubultošanās laiks un palielinājās dzīvotspēja. Krūts vēža atsauces šūnās (MCF-7) Y-27632 ietekmē pastiprinājās *ESR2*, *PGR* un *MKI67* gēna ekspresija, bet fibroblastu šūnās (HDFa) tika novērota pastiprināta *ESR1*, *PGR* un *MKI67* gēna ekspresija.

Pateicība

Pētījums izstrādāts projekta “Krūts vēža ģenētiskās rekonstrukcijas, balstoties uz proteomiku vēža šūnu kultūrās” ietvaros.



Influence of ROCK Inhibitor Y-27632 on Breast Cancer and Fibroblast Reference Cell Lines

Abstract

Breast cancer consists of heterogeneous cell population. For most efficient cell growth, *in vitro*, diverse hormones and growth factors must be added to the cultivation medium. It is stated in literature that addition of ROCK inhibitor Y-27632 increases proliferation and delays apoptosis of cells. In this study, we looked at the influence of Y-27632 on MCF-7 breast cancer cell line and on HDFa dermal fibroblast line.

Reference cell lines were cultivated with addition of Y-27632 and their morphology, population doubling time (PDT), viability and the main breast cancer characterising receptors and proliferation marker expression differences were analysed.

Addition of Y-27632 decreases MCF-7 cell-to-cell adhesion and, in mediums with decreased serum volume, PDT and viability of cells is improved. In the mediums with decreased glucose and serum volume, addition of Y27632 influenced the morphology of HDFa cells, decreased PDT and increased viability.

In cell line MCF-7, addition of Y-27632 increased *ESR2*, *PGR* and *MKI67* expression, but in cell line HDFa it increased *ESR1*, *PGR* and *MKI67* expression.

Keywords: breast cancer, ROCK, Y-27632, population doubling time, viability.

Literatūra

- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 2006, 295(21), 2495–2502.
- Caron, E. and Hall, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*. 1998, 282(5394), 1717–1721.
- Chang, H. Y., Chi, J., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., and Brown, P. O. Diversity, topographic differentiation and positional memory in human fibroblasts. *PNAS*. 2002, 99(20), 12877–12882.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biomedical Journal*. 2000, 351(1), 95–105.
- Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J. A., and Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Reviews*. 2012, 38(6), 698–707.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., et al. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *The EMBO Journal*. 1996, 15(8), 1885–1893.
- Katoh, K., Kano Y., Amano, M., Kaibuchi, K., and Fujiwara, K. Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2001, 280(6), 1669–1679.
- Knutson, T. P. and Lange, C. A. Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014, 142(1), 114–125.
- Lacroix, M. and Leclercq, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: An Update. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004, 83(3), 249–289.
- Li, X., Zhang, Y., and Qi, G. Evaluation of isolation methods and culture conditions for rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. 2003, 65, 323–334.
- Liu, S., Goldstein, R. H., Scepanisky, E. M., and Rosenblatt, M. Inhibition of Rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. *Molecular Biology, Pathobiology and Genetics*. 2009, 69(22), 8742–8751.
- Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J., and Pittman R. N. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *JBC*. 1998, 140(3), 627–636.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K., and Narumiya, S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters*. 1996, 392(2), 189–193.
- Narumiya, S., Ishizaki, T., and Ufhata, M. Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods in Enzymology*. 2000, 325, 273–284.

15. Olaso, E., Santisteban, A., Bidaurrezaga, J., Gressner, A. M., Rosenbaum, J., and Vidal-Vanaclocha, F. Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate during experimental melanoma metastasis. *Hepatology*. 1997, 26(3), 634-642.
16. Pille, J. L., Denoyelle, C., Varet, J., Bertrand, J. R., Soria, J., Opolon, P., et al. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Therapy*. 2005, 11, 267-274.
17. Sahai, E., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Treisman, R. Transformation mediated by RhoA requires activity of ROCK kinases. *Current Biology*. 1999, 9(3), 136-145.
18. Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., and Bissell, M. J. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development*. 2001, 128, 3117-3131.
19. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M. A Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1972, 51(5), 1409-1516.
20. Tominaga, T. and Barber, T. L. Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Molecular Biology of the Cell*. 1998, 9 (8), 2287-2303.
21. Walsh, V. S., Hopkins, A. M., Chen, J., Narumiya, S., Parkos, C. A., and Nusrat, A. Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. *Gastroenterology*. 2001, 121(3), 566-579.
22. Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., and Sasai, Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 2007, 25, 681-686.
23. Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I., and Williams, P. M. Development and validation of quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Analytical Biochemistry*. 1999, 270, 41-49.
24. Yang, S., and Kim, H. M. ROCK inhibition activates MCF-7 cells. *PLoS ONE*. 2014, 9(2).