

## 研究报告

### Research Report

# Exo70 二聚化的关键序列及其在乳腺癌细胞迁移过程中的作用

陈雄<sup>1</sup> 侯积环<sup>1</sup> 占艳艳<sup>1</sup> 卢钟磊<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 厦门大学医学院抗癌研究中心, 厦门, 361102; <sup>2</sup> 福州大学生物科学与工程学院, 福州, 350116

\* 通讯作者, zhonglei.lu@fzu.edu.cn

**摘要** Exo70 是胞外分泌复合体 Exocyst 的关键亚基, 可通过参与 Exocyst 复合体或自身聚合促进细胞迁移。我们在研究中发现, Exo70 自身形成二聚体的能力显著强于与 Exocyst 其它 7 个亚基的结合, 提示 Exo70 二聚化的重要作用。进一步构建 Exo70 缺失突变体, 并通过一系列免疫共沉淀实验确定了 Exo70 形成二聚体的关键位置是位于氨基酸 31~35 与 505~509 的两段同样的序列 SLEKS。进而利用这两个序列的缺失突变体, 通过 transwell 迁移实验, 证实这两段 SLEKS 序列在 Exo70 二聚化及乳腺癌细胞迁移过程中的关键作用。以上结果为 Exo70 独立于 Exocyst 复合体功能之外的新功能研究提供了依据, 也为乳腺癌及其转移的治疗提供潜在的靶点。

**关键词** Exo70 蛋白, 二聚化序列, 乳腺癌, 迁移

## Research on the Dimerization Sequence of Exo70 and Its Role in Breast Cancer Cell Metastasis

Chen Xiong<sup>1</sup> Hou Jihuang<sup>1</sup> Zhan Yanyan<sup>1</sup> Lu Zhonglei<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen, 361102; <sup>2</sup> College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, 350116

\* Corresponding author, zhonglei.lu@fzu.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.035.002533

**Abstract** Exo70, the key subunit of Exocyst protein complex, promotes cell metastasis by self-dimerization or by involving in the Exocyst complex formation. In this research, we found that Exo70 was dramatically more capable of forming self-dimerization than binding to the other subunits of exocyst complex, and indicative of the important roles of its self-dimerization. Then we constructed a set of truncation mutants of Exo70 in order to determine the core sequence for its dimerization. With co-immunoprecipitation analysis, we identified two identical protein sequences "SLEKS" located at amino acid 31~35 and 505~509 as critical sequences for the dimerization of Exo70. By "cell transwell" assay, we further found that the full length Exo70 significantly promotes breast cancer metastasis, while the two truncation mutants of Exo70 ( $\Delta 31\sim 35$  and  $\Delta 505\sim 509$ ) don't possess such ability, indicating that these two "SLEKS" sequences play pivotal role in breast cancer cell metastasis and invasion. Together, these results provide fundamental basis for researches on novel functions of Exo70 besides its well-known role in Exocyst complex formation and provide potential drug target for treating breast cancer and its metastasis.

**Keywords** Exo70 protein, Dimerization sequence, Breast cancer, Metastasis

据国际癌症研究机构统计, 乳腺癌是全球及中国女性发病率最高的恶性肿瘤, 也是导致世界女性癌症死亡的首因(Ferlay et al., 2015)。近年我国乳腺癌发病率剧增, 每年新发数量和死亡数量分别占全球的 12.2%和 9.6%, 发病年龄日趋年轻化(Fan et al.,

2014)。远处转移和复发是乳腺癌患者死亡的主要原因。乳腺切除术后发生远处转移的患者五年生存率仅 24.5%, 半数生存期仅 31 个月(Ruiterkamp et al., 2009)。因此, 研究乳腺癌转移的调控机制, 以指导抗乳腺癌转移药物的研发, 对提高乳腺癌患者生存率

基金项目: 本研究由国家自然科学基金青年项目(31300970)和福州大学科研启动项目(510402)共同资助

意义重大。

胞外分泌复合体 exocyst 由 Sec3、Sec5、Sec6、Sec8、Sec10、Sec15、Exo70 和 Exo84 8 个亚基组成 (Lipschutz and Mostov, 2009), 在胞外分泌、肿瘤细胞迁移和侵袭等过程中发挥重要的调控作用 (Zuo et al., 2006; He and Guo, 2009; Liu et al., 2009; Bodemann et al., 2011; Liu and Guo, 2012; Ren and Guo, 2012)。其中, Exo70 是 exocyst 的关键亚基, 通过与其它多个亚基结合促进 exocyst 复合体的形成, 并通过与小 G 蛋白相互作用介导转运囊泡与细胞质膜的融合。Exo70 与肌动蛋白关键成分 Arp2/3 的结合可增强 Arp2/3 与促成核因子家族成员 WAVE2 的结合, 影响细胞板状和丝状伪足的形成, 促进细胞迁移 (Zuo et al., 2006)。在人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中, 抑制内源 Exo70 蛋白的表达, 不仅减少其侵袭样伪足的形成, 还会下调基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 分泌, 从而削弱其侵袭能力 (Liu et al., 2009)。最近研究发现, 除了作为 exocyst 的亚基发挥作用, Exo70 自身还可以形成寡聚体, 并通过与磷脂的结合, 诱导不依赖肌动蛋白的细胞膜突触形成, 从而促进细胞迁移; 其中, 1~75 位氨基酸对 Exo70 的寡聚化至关重要 (Zhao et al., 2013)。

尽管这一研究首次阐述了 Exo70 独立于复合体以外的生物学功能, 但仍有许多问题有待进一步阐明和确证。例如, Exo70 自身寡聚与参与形成 exocyst 复合体相比, 是辅助作用还是同样重要? 此外, 1~99 位氨基酸还介导了 Exo70 与小 G 蛋白 TC10 的结合 (Inoue et al., 2003), 那么, Exo70 1~75 位氨基酸的缺失无法诱导细胞膜突触形成, 是否由于丧失了与其它蛋白的结合能力? 结晶和结构解析实验发现 Exo70 以二聚体形式形成晶体, 且在 N 端和 C 端都存在结合 (Hamburger et al., 2006)。因此, 有必要对 Exo70 二聚化形成的关键结构域进行进一步的细化, 进而确证 Exo70 二聚化在乳腺癌细胞迁移过程中作用。

本研究中研究者通过免疫共沉淀实验证实了 Exo70 蛋白的二聚化, 且首次发现 Exo70 与其自身的结合能力明显强于与其他 7 个 Exocyst 亚基的结合能力, 提示该 Exo70 自身二聚化的重要的作用。进一步构建系列 Exo70 缺失突变体, 通过免疫共沉淀实验确定了 Exo70 形成二聚体的关键位置是位于氨基酸 31~35 与 505~509 的两段同样的序列 SLEKS。进而利用这两个区段的缺失突变体, 通过 transwell 迁移实验, 发现抑制该二聚体的形成能够抑制乳腺癌细胞的迁移能力。本研究为 Exo70 独立于 exocyst

复合体功能的相关研究提供了基础, 也为以 Exo70 为靶点的抗癌研究提供理论依据。

## 1 结果与分析

### 1.1 Exo70 自身结合强于与其它亚基的结合

为了确定 Exo70 自身寡聚与参与形成 exocyst 复合体相比, 是辅助作用还是同样重要, 我们用免疫共沉淀技术比较分析 Exo70 与 Exo70 本身以及其他 exocyst 亚基的结合情况。在 293T 细胞中共转染 Exo70-Flag 及 HA-Exo70 或其它带 HA 标签的 exocyst 亚基表达质粒, 24 h 后用 HA 抗体进行免疫共沉淀实验。Exo70 与 exocyst 的 8 个亚基均有不同程度的结合 (图 1), 与 Exo70 自身结合能力最强, 与 Sec8、Sec10 及 Sec15 的结合次之, 与 Sec6 和 Exo84 的结合最弱。这一结果提示, Exo70 自身聚合可能具有重要的作用, 并不亚于作为 exocyst 亚基的作用。

### 1.2 Exo70 二聚化的关键区段

我们进一步确定 Exo70 自身聚合的精确区段。首先初步确定二聚化发生在 N 端还是 C 端。为此, 我们构建了几个 Exo70 缺失突变体, 包括 1~450、451~653 及 51~653。因之前文献报道 1~75 位氨基酸对 Exo70 的寡聚至关重要 (Zhao et al., 2013), 我们也构建了缺失突变体 76~653 作为对照。在 293T 细胞中共转染 HA-Exo70 及带 Flag 标签的全长 Exo70 或缺失突变体表达质粒, 24 h 后用 Flag 抗体进行免疫共沉淀实验。1~450 及 451~653 片段与 Exo70 结合的能力均明显较全长 (1~653) 弱 (图 2), 表明 Exo70 的 N 端和 C 端都是其发生二聚化所必需的。此外, 51~653 与 76~653 及 451~653, 三者与 Exo70 的结合能力相当, 表明 Exo70 二聚化的区段位于 N 端的 1~50 及 C 端的 451~653。

我们进一步确定 1~50 位氨基酸中 Exo70 二聚化的精确位点。为此, 以 10 个氨基酸为单位构建一

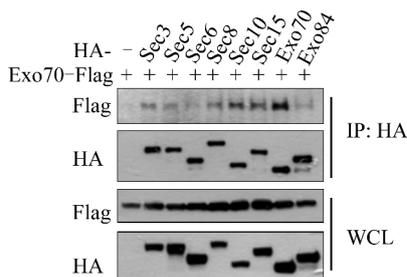


图 1 Exo70 与 exocyst 复合体各亚基的结合情况

Figure 1 Binding ability of Exo70 with the subunits of Exocyst

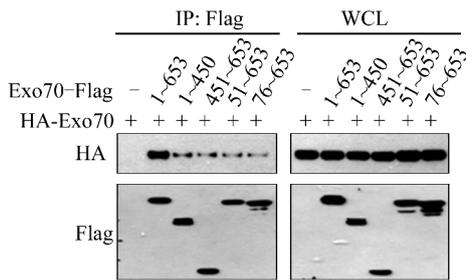


图2 N端及C端为Exo70二聚化所需

Figure 2 Both the N-terminal and C-terminal are required for Exo70 dimerization

系列N端缺失突变体,包括11~653、21~653、31~653和41~653。然后在293T细胞中共转染HA-Exo70及带Flag标签的全长Exo70或缺失突变体表达质粒,24h后收获细胞以Flag抗体进行免疫共沉淀实验。31~653片段与全长Exo70相比,二者与Exo70的结合能力相当(图3);而41~653与Exo70结合的能力明显较全长(1~653)弱,但又与51~653相当,表明Exo70二聚化的N端区段位于31~40位氨基酸。

同样的,为了确定451~653位氨基酸中Exo70二聚化的精确位点,构建了一系列C端缺失突变体,包括1~500、1~520、1~540、1~560、1~580和1~640。然后在293T细胞中共转染HA-Exo70及带Flag标签的全长Exo70或缺失突变体表达质粒,24h后收获细胞以Flag抗体进行免疫共沉淀实验。1~520片段与全长Exo70相比,二者与Exo70的结合能力相当(图4),而1~500与Exo70结合的能力明显较全长(1~653)弱,但又与1~450相当,表明Exo70二聚化的C端区段位于500~520位氨基酸。

经过序列分析,我们发现,Exo70的31~35区段及505~509区段存在一段相同序列,即SLEKS(图5)。我们因此推测,SLEKS是否可能是Exo70形成二聚体的关键序列。

我们进而构建31~35及505~509区段分别和同

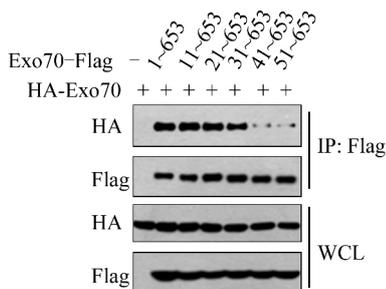


图3 N端31~40位氨基酸为Exo70二聚化所需

Figure 3 The aa 31~40 in N-terminal is required for Exo70 dimerization

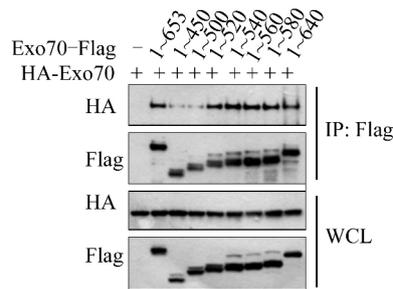


图4 C端501~520位氨基酸为Exo70二聚化所需

Figure 4 The aa 501~520 in C-terminal is required for Exo70 dimerization

时缺失的突变体,即 $\Delta 31\sim 35$ 、 $\Delta 505\sim 509$ 和 $\Delta 31\sim 35/\Delta 505\sim 509$ ,并用免疫共沉淀进行验证。 $\Delta 31\sim 35$ 与41~653片段与Exo70的结合能力接近,但均明显弱于全长Exo70(1~653)(图6);同时 $\Delta 505\sim 509$ 与1~500片段与Exo70的结合能力相当,也明显较全长Exo70(1~653)弱,两个片段同时缺失的突变体 $\Delta 31\sim 35/\Delta 505\sim 509$ 与Exo70结合的能力则比单独缺失突变体 $\Delta 31\sim 35$ 或 $\Delta 505\sim 509$ 更弱,进一步确定了Exo70二聚化的精确区段为位于31~35及505~509的SLEKS序列。

### 1.3 Exo70二聚化对乳腺癌细胞迁移能力的影响

基于以上研究,进而利用缺失突变体 $\Delta 31\sim 35/\Delta 505\sim 509$ ,通过transwell迁移实验,验证Exo70二聚化在乳腺癌细胞迁移过程中的作用。结果显示,在

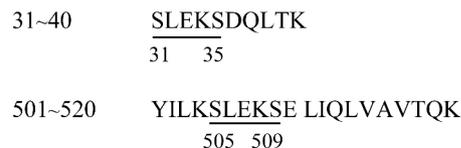


图5 Exo70 31~40和501~520区段氨基酸序列分析

Figure 5 Sequence analysis of the aa31~40 and aa501~520 of Exo70

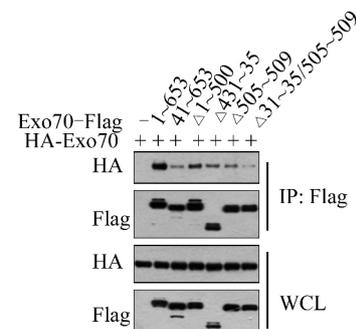


图6 位于31~35及505~509的SLEKS序列为Exo70二聚化所需

Figure 6 Two SLEKS sequences at aa 31~35 and aa 505~509 are required for Exo70 dimerization

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中过表达全长 Exo70 能显著促进其迁移能力(图 7,  $p < 0.01$ ) 而当过表达缺失突变体  $\Delta 31\sim 35/\Delta 505\sim 509$ , 则对其迁移能力没有显著影响(图 7,  $p > 0.05$ )。这些结果证实了位于 31~35 和 505~509 的两段 SLEKS 序列在 Exo70 二聚化及乳腺癌细胞迁移过程中的关键作用。

## 2 讨论

本研究中研究者首次发现 Exo70 与其自身的结合能力明显强于与其它 7 个 Exocyst 亚基的结合能力, 提示该 Exo70 自身二聚化具有重要的作用。进一步构建系列 Exo70 缺失突变体, 通过免疫共沉淀实验确定了 Exo70 形成二聚体的关键位置是位于氨基酸 31~35 与 505~509 的两段 SLEKS 序列。进而利用该缺失突变体, 通过 transwell 迁移实验, 证实这两段 SLEKS 序列在 Exo70 二聚化及乳腺癌细胞迁移过程中的关键作用, 提示靶向这两段序列的小分子化合物可能作为抑制乳腺癌迁移的潜在药物。本研究为 Exo70 独立于 exocyst 复合体功能的相关研究提供了基础, 也为以 Exo70 为靶点的抗癌研究提供理论依据。

## 3 材料与与方法

### 3.1 材料与试剂

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、人胚肾 HEK-293T 细胞购自中科院上海细胞库; 细胞培养液、胎牛血清、青霉素 / 链霉素购自美国 Gibco 公司; 大鼠源 Exo70 质粒由美国宾夕法尼亚大学郭巍教授惠赠; 其余 exocyst 亚基质粒购自美国 Addgene 公司; pCMV5-HA 与 p3xflag-CMV-14 质粒分别购自美国 Clontech 与

Sigma-Aldrich 公司; 鼠抗 Flag 抗体、鼠抗 HA 抗体及 HRP 标记羊抗鼠二抗购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 蛋白 A/G 珠购自 Santa Cruz 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司; ECL 高敏化学发光试剂盒购自美国 Millipore 公司; 化学试剂(分析纯)购自上海生工生物工程有

### 3.2 仪器与设备

高速台式冷冻离心机, 德国 Hettich 公司; 移液器, 德国 Eppendorf 公司; 生物安全柜, 美国 Baker 公司; 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司; 倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; Orion pH 计, 美国 Thermo 公司; 电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; 蛋白电泳转印系统, 美国 Bio-Rad 公司。

### 3.3 试验方法

#### 3.3.1 细胞培养

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞用 L-15 培养液, 置 37°C、无 CO<sub>2</sub> 培养箱; 人胚肾 HEK-293T 细胞用 DMEM 培养液, 置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。所有培养液均含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素。传代时以 PBS 洗 1 次, 然后加适量胰酶消化液, 静置数分钟, 显微镜下观察细胞变圆时移去消化液, 加少量培养液用移液器吹成单细胞悬液, 1 300 r/min 离心 2 min 后以培养液重悬细胞, 并分盘培养。

#### 3.3.2 质粒构建及提取

以获赠或购买的 Exocyst 亚基为模板, 稀释成 0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  进行 PCR 反应, 反应体系: 正向引物 2  $\mu\text{L}$ 、反向引物 2  $\mu\text{L}$ 、DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 、H<sub>2</sub>O 5  $\mu\text{L}$ 、Dream Taq™ Green PCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ ; PCR 反应条件: 94°C 变性 30 s、58°C 退火 3 s、72°C 延伸 2 min, 循环数 28, 最后 72°C 延伸 10 min。

PCR 结束后, 通过琼脂糖凝胶电泳回收目的片段, 与空载体(pCMV5-HA 或 p3xflag-CMV-14)用同样的两个限制性内切酶酶切 3 h (如 Exo70 用 *Hind* 和 *Bam*H ) ; 纯化酶切产物, 用 T4 连接酶将目的片段和空载体进行连接, 连接体系: 目的片段 6  $\mu\text{L}$ 、空载体 2  $\mu\text{L}$ 、水 5  $\mu\text{L}$ 、T4 连接酶 0.5  $\mu\text{L}$ 、T4 连接酶缓冲液 1.5  $\mu\text{L}$ ; 于 20°C 水浴连接 1 h; 连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌, 涂布氨苄青霉素抗性平板, 37°C 培育 16 h 后挑取单克隆, 菌液送 Invitrogen 公司(上海)测序。选取测序正确的单克隆菌液, 扩大培养后

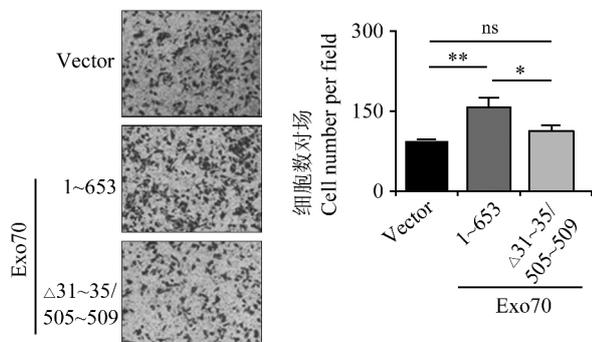


图 7 31~35 及 505~509 的 SLEKS 序列在 Exo70 二聚化及乳腺癌细胞迁移过程中的关键作用

Figure 7 Two SLEKS sequences at aa 31~35 and aa 505~509 are critical for Exo70 dimerization and cell migration of MDA-MB-231

至 50~100 mL 菌液, 采用质粒抽提试剂盒(QIAGEN Plasmid Maxi Kit)抽提质粒。测质粒浓度后取 10  $\mu$ L 质粒送公司验证测序, 确认出所得质粒目的片段无碱基突变, 并能正确表达, 此时质粒构建完成。

### 3.3.3 细胞转染

HEK-293T 细胞采用磷酸钙转染法。细胞接种于直径 6 cm 的培养盘, 24 h 后转染。转染前细胞换新鲜培养液。取 1.5 mL 离心管, 依次加入水 180  $\mu$ L, 相应质粒 2.5 mol/L CaCl<sub>2</sub> 20  $\mu$ L, HBS 200  $\mu$ L, 轻柔混匀后于室温静置 20 min。之后缓慢滴加到培养液中, 轻晃培养盘, 使其分布均匀。转染 36 h 后细胞用于后续实验。HBS 溶液配方: 280 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mmol/L Glucose, 50 mmol/L HEPES, pH 7.05。

MDA-MB-231 细胞采用脂质体转染。转染前细胞换成不含血清及抗生素的 Opti-MEM 培养液。分别配置以下两种溶液: (1) 稀释 2  $\mu$ g DNA 于 100  $\mu$ L 无血清 Opti-MEM 中; (2) 稀释 4  $\mu$ L Lipofectamine 2000 于 100  $\mu$ L 无血清 Opti-MEM 中, 在室温中放置 5 min。混合两种溶液, 室温放置 15~30 min, 使 DNA-脂质体复合物形成, 再次混匀, 然后缓慢均匀加到培养液。4~6 h 后, 更换新鲜的完全培养液, 24 h 后细胞用于后续实验。

### 3.3.4 免疫共沉淀及免疫印迹

常规收集细胞, 加入适量裂解液 ELB (50 mmol/L Tris (pH 7.6), 140 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, 100 mmol/L NaF, 临用前加 1 mmol/L PMSF 和罗氏蛋白酶抑制剂 cocktail) 于冰上超声破碎细胞, 4 $^{\circ}$ C 离心后取上清液, 每个样品加入 5  $\mu$ L 蛋白 A/G 珠和相应抗体于静音混合器上 4 $^{\circ}$ C 孵育 3 h。随后 3 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 2 min, 吸弃上清。珠子以 ELB 洗涤 3 次后弃净上清, 加入 40  $\mu$ L 2 $\times$ SDS 缓冲液重悬, 95 $^{\circ}$ C 煮 5 min 后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 用含封闭液(含 0.5%奶粉的 PBST)封闭。与相应一抗及二抗孵育后, 用 ECL 试剂盒曝光显影。

### 3.3.5 慢病毒介导的 RNA 干扰技术

HEK-293T 细胞接板, 密度达 70%~80% 以磷酸钙转染法转染。48 h 后收集上清, 离心后用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤上清液, 再超滤浓缩病毒, 测定滴度后即用或保存于 -80 $^{\circ}$ C。MDA-MB-231 细胞接板, 密度达 30%~40% 加入适量慢病毒浓缩液, 培养 48 h 后更换培养液, 感染 96 h 后观察报告基因绿色荧光蛋白表达情况。

### 3.3.6 Transwell 迁移实验

取对数期细胞消化, 无血清培养基重悬成 10<sup>5</sup> 个/mL 单细胞悬液。将小室放置于 24 孔板, 下室添加 500  $\mu$ L 含 15% 牛血清的培养基, 去除气泡。取细胞悬液 100~200  $\mu$ L 加入小室上室, 常规培养 16~24 h。

### 作者贡献

陈雄和侯积环是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 陈雄、占艳艳及卢钟磊完成数据分析, 论文初稿的写作; 占艳艳和卢钟磊是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家自然科学基金青年项目(31300970)和福州大学科研启动项目(510402)共同资助。

### 参考文献

- Bodemann B.O., Orvedahl A., Cheng T., Ram R.R., Ou Y.H., Formstecher E., Maiti M., Hazelett C.C., Wauson E.M., Balakireva M., Camonis J.H., Yeaman C., Levine B., and White M.A., 2011, RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly, *Cell*, 144: 253-267
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., and Bray F., 2015, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International Journal of Cancer*, 136(5): E359-386
- Fan L., Strasser-Weippl K., Li J.J., St Louis J., Finkelstein D.M., Yu K.D., Chen W.Q., Shao Z.M., and Goss P.E., 2014, Breast cancer in China, *The Lancet Oncology*, 15(7): e279-289
- Hamburger Z.A., Hamburger A.E., West A.P., Jr., and Weis W.I., 2006, Crystal structure of the *S. cerevisiae* exocyst component Exo70p, *Journal of Molecular Biology*, 356(1): 9-21
- He B., and Guo W., 2009, The exocyst complex in polarized exocytosis, *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4): 537-542
- Inoue M., Chang L., Hwang J., Chiang S.H., and Saltiel A.R., 2003, The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin, *Nature*, 422 (6932): 629-633
- Lipschutz J.H., and Mostov K.E., 2002, Exocytosis: the many masters of the exocyst, *Current Biology*, 12(6): pp.R212-214
- Liu J.L., and Guo W., 2012, The exocyst complex in exocytosis and cell migration, *Protoplasma*, 249(3): 587-597
- Liu J.L., Yue P., Artym V.V., Mueller S., and Guo W., 2009, The

- role of the exocyst in matrix metalloproteinase secretion and actin dynamics during tumor cell invadopodia formation, *Molecular Biology of the Cell*, 20(16): 3763-3771
- Ren J.Q., and Guo W., 2012, ERK1/2 regulate exocytosis through direct phosphorylation of the exocyst component Exo70, *Developmental Cell*, 22(5): 967-978
- Ruiterkamp J., Ernst M.F., Van de Poll-Franse L.V., Bosscha K., Tjan-Heijnen V.C.G., and Voogd A.C., 2009, Surgical resection of the primary tumour is associated with improved survival in patients with distant metastatic breast cancer at diagnosis, *European Journal of Surgical Oncology: the Journal of Cancer Surgery*, 35: 1146-1151
- Zhao Y.T., Liu J.L., Yang C.S., Capraro B.R., Baumgart T., Bradley R.P., Ramakrishnan N., Xu X.W., Radhakrishnan R., Svitkina T., and Guo W., 2013, Exo70 generates membrane curvature for morphogenesis and cell migration, *Developmental Cell*, 26: 266-278
- Zuo X.F., Zhang J., Zhang Y., Hsu S.C., Zhou D.G., and Guo W., 2006, Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration, *Nature Cell Biology*, 8(12): 1383-1388

---

## Molecular Entomology



Molecular Entomology (ISSN 1925-198X) is an international, open access, peer reviewed journal, committed to publishing and disseminating significant original achievements pertaining to molecular entomology. All papers chosen for publication should be innovative research work in the related field, including genome structure of insects, gene expression and their function analysis, molecular evolution, molecular ecology, molecular genetics, insect physiology and biochemistry. Meanwhile we also publish the articles related to basic research, such as anatomy, morphology and taxonomy, which are fundamental to molecular technique's innovation and development.

Email: [edit@me.biopublisher.ca](mailto:edit@me.biopublisher.ca)

Web: <http://me.biopublisher.ca>