

综 述

神经轴突导向分子Slit的功能及其分子作用机制研究进展

于 奇, 周启升, 赵 晓, 刘庆信*

山东农业大学发育遗传学研究室, 泰安 271018

摘 要: 神经轴突导向分子Slit是一种在进化上高度保守的分泌型糖蛋白, Slit对神经轴突导向、神经细胞迁移、神经细胞形态分化、肿瘤转移、血管生成、心脏形态发生等多种生命活动具有调节作用。Slit功能的实现主要是通过其LRR-2结构域与受体Roundabout (Robo)的Ig1结构域相结合而实现的, 另外硫酸肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)、GTP酶激活蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)、酪氨酸激酶Abelson、Ca²⁺、MicroRNA-218和其它轴突导向分子等多种信号分子也参与了Slit功能的实现。*slit*基因受到Single-minded、Irx4和Midline等转录因子的调控, 另外, 转录后水平的选择性剪接使*slit*基因存在多种亚型。Slit导向机制的研究有助于揭示生物神经发育和再生过程中神经网络形成的内在分子基础, 同时, 也将为预防和治疗人类神经疾病、抑制癌细胞转移等提供理论参考。

关键词: *slit*基因; *robo*基因; 神经轴突导向; 细胞迁移; 分子作用机制; 基因表达调控

中图分类号: Q71

Current progress in functions of axon guidance molecule Slit and underlying molecular mechanism

YU Qi, ZHOU Qi-Sheng, ZHAO Xiao, LIU Qing-Xin*

Laboratory of Developmental Genetics, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

Abstract: The axon guidance molecule Slit is a secreted glucoprotein which is conserved during evolution. Slit has been implicated in regulating a variety of life activities, such as axon guidance, neuronal migration, neuronal morphological differentiation, tumor metastasis, angiogenesis and heart morphogenesis. Slit function mainly depends on the binding of its LRR-2 domain to the Ig1 domain of Roundabout (Robo) receptor, meanwhile Slit function is also mediated by a range of signaling molecules, including the heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), GTPase-activating proteins (GAPs), tyrosine kinase Abelson, calcium ions, MicroRNA-218 and other axon guidance molecules. Several transcription factors, including Single-minded, Irx and Midline, were shown to regulate *slit* expression. In addition, multiple Slit isoforms exist as a consequence of alternative spliced transcripts. The research on guidance mechanism of Slit will facilitate the understanding of molecular mechanism underlying neural networks formation in the process of neural development and regeneration. Meanwhile, the studying of Slit guidance mechanism could promote the prevention and treatment of human neurological diseases and cancer metastasis.

Key words: *slit*; *robo*; axon guidance; cell migration; molecular mechanism; gene regulation

生物神经系统发育是一个复杂有序的过程, 可以分为神经发生、神经迁移、突触生长和突触形成四个主要阶段, 在这些过程中, 神经细胞受到遗传和环境等因素的影响, 其中神经轴突导向分子对神

Received 2011-10-05 Accepted 2011-12-09

This review was supported by the National Basic Research Development Program (973) of China (No. 2012CB114603), and Special Fund of Shandong Province for High Level Overseas Talents, China (No. 72019).

*Corresponding author. Tel: +86-538-8246398; E-mail: liuqingxin@sdau.edu.cn

经网络的形成起到了重要的作用,目前已发现的重要神经轴突导向分子有 Ephrin 家族、Semaphorin 家族、Netrin 家族和 Slit 家族^[1]。

1984 年, Nüsslein-Volhard 等在筛选影响黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 幼虫表皮型式发生的基因时首次发现了 *slit* 基因^[2]。Rothberg 等在 1988 年克隆了果蝇的 *slit* 基因, 该基因在与生长中的轴突邻接的 6 个中线胶质细胞中高水平表达, 在果蝇 *slit* 突变体中, 穿过和不穿过中线的轴突以同样的方式进入中线并停留在中线, 说明 *slit* 基因在中枢神经系统的形成中发挥作用^[3]。多项研究表明, Slit 蛋白是作为 Roundabout (Robo) 的配体发挥作用的, Slit 是多功能的导向分子, 它不仅具有调节神经轴突生长方向、引导神经细胞迁移、影响神经细胞形态分化的功能, 近年来的研究发现 Slit 在血管生成、心脏形态发生、肿瘤细胞迁移等多种生理过程中也发挥作用, Slit 功能的研究已成为国内外非常热门的研究领域之一^[4-9]。研究 Slit 的导向机制对于揭示生物神经发育和再生过程中神经网络形成的内在分子基础具有重要意义, 同时, 也将为人类神经疾病、肿瘤等的预防和治疗提供理论基础。本文对 Slit 蛋白的结构与功能、*slit* 基因的表达调控以及 Slit 的分子作用机制等方面的研究进展进行了归纳总结。

1 Slit蛋白的结构

slit 基因家族已在果蝇、线虫 (*Caenorhabditis elegans*)^[10]、小鼠 (*Mus musculus*)^[11]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[12] 和人 (*Homo sapiens*)^[13] 等至少 30 多种动物中被发现或预测。在无脊椎动物中只有 1 种 *slit* 基因, 而在脊椎动物中存在 3 种 *slit* 基因, 即 *slit1*、*slit2* 和 *slit3*。*slit* 基因在各种生物组织中广泛表达, 例如在底板 (floor plate)、菱唇 (rhombic lip)、面运动神经核 (facial motor nucleus, FMN) 等多种神经组织^[14, 15] 和肌肉、血管、心脏等多种非神经组织^[7, 16, 17] 中都有 *slit* 基因的表达。

Slit 蛋白是相对分子质量约为 200 kDa 的细胞外基质糖蛋白, 由五个区域组成: 1 个 N-末端信号肽 (ss)、4 个亮氨酸丰富区 (leucine-rich repeat, LRR)、几个表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 样重复序列、1 个 ALPS (Agrin-Laminin-Perlecan-Slit) 结构域和 1 个 C-末端富含半胱氨酸序列 (cysteine knot)。*slit* 基因在不同物种中是高度保守的, 线虫

Slit 与果蝇 Slit 的序列同源性为 41%, 脊椎动物的 3 个 Slit 与果蝇和线虫 Slit 的序列同源性分别为 41%~44% 和 39%~41%, 果蝇和人类的 Slit 分别包含 7 个和 9 个 EGF 样序列 (图 1)^[4]。人类 *slit2* 基因含有 37 个外显子, 其蛋白 LRR-1 至 LRR-4 结构域的氨基酸残基范围分别为 27~258、271~479、505~713 和 726~908, 与果蝇 Slit 相比, 人类 Slit2 的 LRR-3 结构域较大^[18]。

2 Slit的主要功能

2.1 对神经轴突生长方向的排斥导向作用

在神经元发育中, 轴突导向是一个基本的过程, 神经元迁移到最终的靶区以后, 轴突由环境中的信号分子精确引导而达到其靶位, 从而形成突触连接。在双侧对称的生物中, 中线是发育中的神经系统的组织中心, 大多数的轴突在投射到对侧的突触靶标前越过中线, 中线穿越的过程在精确的时空调节下, 在无脊椎动物和脊椎动物的神经系统中, 控制中线处轴突路径选择的分子和机制是保守的, Slit 作为一种对轴突生长方向起排斥作用的信号分子在其中发挥重要作用^[4, 11, 19]。

视觉信号通路已被证明是研究轴突导向分子机制最有效的模型系统之一。在果蝇的视觉系统发育中, 在视神经叶胶质细胞中表达的 Slit 通过在感光神经元 (photoreceptor neuron) R8 生长锥表达的 Robo3 对 R8 轴突从眼睛到大脑的投射起到排斥作用^[20]。小鼠视网膜内的轴突导向包括三个不同的过程: 视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 轴突向位于视网膜内表面的视觉纤维层 (optic fibre layer, OFL) 生长, 进而向视神经盘 (optic disc) 定向延伸和轴突离开眼睛^[21]。在小鼠的视网膜内, *slit1* 或 *slit2* 缺失的小鼠几乎没有表现出轴突导向缺陷, 但是在 *slit1* 和 *slit2* 双突变小鼠中, 在真正神经交叉前面出现了一个额外的神经交叉, 许多视网膜神经轴突投射到对侧的视神经, 许多从背部和侧部异位地延伸到视交叉, 这些结果说明在体内 Slit1 和 Slit2 共同作用排斥视网膜神经轴突^[22]。小鼠的 RGC 仅表达 Robo1 和 Robo2, 缺乏 *robo1* 时视网膜内轴突导向正常, 然而缺乏 *robo2* 时出现与 *slit* 突变体相同的表型, 因此证明 Robo2 是控制小鼠视网膜内轴突导向的主要受体^[23]。

Slit 不仅能够排斥视觉系统轴突生长方向, 在多种神经组织的轴突生长中也都表现为排斥导向作

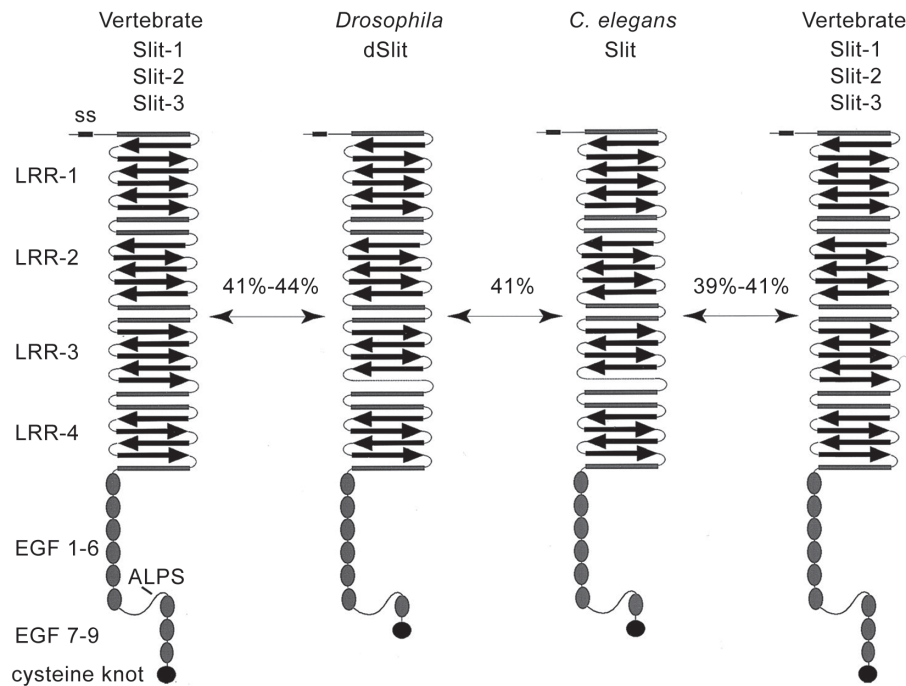


图 1. Slit家族成员的结构

Fig. 1. Domain structures of Slit family members. All identified Slit proteins contain signal peptide (ss), four tandem leucine-rich repeats (LRR), epidermal growth factor (EGF) repeats, a conserved ALPS (Agrin-Laminin-Perlecan-Slit) spacer, and a cysteine knot. Both *Drosophila* Slit and *C. elegans* Slit contain seven EGF repeats compared to nine EGF repeats in the mammalian proteins. All mammalian Slit proteins share a common domain structure and high sequence homology with *Drosophila* Slit (41%–44%), and the sequence homology is 41% between *C. elegans* Slit and *Drosophila* Slit and 39%–41% between *C. elegans* Slit and vertebrate Slit, respectively. Adopted with permission from Brose *et al.* (1999) [4].

用。在脊椎动物中，纵向轴突传递大脑和脊髓之间的所有信号，Slit-Robo 信号在引导鸡和小鼠胚胎脑干的先驱纵向轴突的生长方向中起关键作用，*slit1* 和 *slit2* 双突变体的纵向轴突路径出现严重的错误，表现为轴突中线穿越和非平行的纵向轴突路径，说明 Slit 对纵向轴突生长具有排斥作用 [24]；在小鼠的嗅觉系统中，Robo2 作为 Slit 的受体，控制犁鼻器感觉神经元 (vomeronasal sensory neurons, VSN) 轴突到副嗅球 (accessory olfactory bulb, AOB) 后部区域的投射，而 Robo1 不是必需的 [25]；在体外，Slit2 排斥来源于人类胚胎干细胞的多巴胺能神经轴突 [26]；此外，大鼠丘脑下部分泌的 Slit2 对丘脑皮层轴突向腹侧端脑的生长也起到排斥导向作用 [27]。

2.2 控制细胞迁移

Slit 能够排斥神经细胞的迁移，也调节肌肉细胞、白细胞、肿瘤细胞和滑膜成纤维细胞 (synovial fibroblast) 等非神经细胞的迁移。

在神经系统的发育过程中，未发育成熟的神

经细胞迁移到准确的、合适的位置后才能分化形成成熟的神经元。在小鼠前脑 (forebrain) 发育中，产生于皮层脑室区 (ventricular zone, VZ) 和脑室下区 (subventricular zone, SVZ) 的大脑皮层神经元迁移到皮层板 (cortical plate)，并且嗅觉中间神经元前体 (olfactory interneuron precursor) 从 SVZ 迁移到嗅球 (olfactory bulb)，小鼠前脑脉络丛 (choroid plexus) 和隔膜 (septum) 分泌的 Slit2 排斥这两种来自 VZ 和 SVZ 的神经母细胞的迁移 [5]。在小鼠后脑发育中，脑桥神经元 (pontine neurons, PN) 是投射到小脑的苔藓状纤维 (mossy fiber) 的主要来源，Slit-Robo 信号能够排斥小鼠 PN 的迁移 [15]。另外，在鸡和小鼠胚胎的从丘脑 (thalamus) 到大脑皮层的投射路线中，Slit2 对起到通道作用的路标神经元 (guidepost neuron) 的迁移起到短距离排斥作用 [28]。在成年小鼠大脑中，未成熟的迁移神经细胞能够通过 Slit-Robo 信号控制它们自己的迁移路线，Slit-Robo 信号通过神经细胞与神经胶质细胞的相互作用，引起星形胶

质细胞隧道的形成和保持,从而促进这些神经元在成年大脑中快速、定向迁移^[29]。

在肌肉细胞的迁移过程中,Slit对果蝇胚胎腹侧中线处肌肉细胞的迁移起排斥作用^[16],Slit2-N在体外能够抑制大鼠气道平滑肌(airway smooth muscle)细胞的迁移^[30]。

在免疫系统中,Slit2能够抑制白细胞(leukocyte)向趋化因子SDF-1(stromal cell-derived factor-1)和fMLP(f-Met-Leu-Phe)的迁移以及中性白细胞(neutrophil)向趋化因子fMLP、C5a和IL-8的迁移,该机制为治疗涉及白细胞迁移和趋化因子的疾病以及有效抗炎症药物的研制提供了新的理论依据和方法^[31,32];此外,Slit3在体外能够通过Robo1增强自然和化学吸引信号引起的单核白细胞(monocyte)的迁移,而单核白细胞的定向迁移是其到达炎症渗入位点的一个基本步骤^[33]。

肿瘤细胞的迁移也受Slit信号的调控。Slit2能够抑制神经胶质瘤、纤维肉瘤、乳腺癌、口腔鳞癌细胞的迁移^[9,34-36],Slit3能够抑制恶性黑色素瘤细胞的迁移^[37],而Slit2也能够促进乳腺癌和结直肠癌细胞的转移^[38,39]。Slit信号对肿瘤细胞迁移起促进还是抑制作用目前还没有定论,其作用机制还有待进一步研究。

对于风湿性关节炎病人,体外实验显示在发病早期用Slit3处理能够抑制风湿性关节炎滑膜成纤维细胞的迁移^[40]。

2.3 影响神经细胞的分裂和形态分化

Slit能够影响神经细胞的分裂。Andrews等发现 $slit1^{-/-}/slit2^{-/-}$ 双重突变或 $robo1^{-/-}$ 突变小鼠的皮层中间神经元数量增多,并且小鼠Slit3的存在能够抑制神经节突起(ganglionic eminence, GE)中细胞的增殖,这些结果说明Slit-Robo信号能够影响神经细胞的分裂^[41]。

神经轴突和树突通常都是有分支的,有的从一个共同的神经突形成两个子分支,有的从一个主轴长出多数侧突,有的常常在神经末梢存在成百上千个分支,这些分支结构是在发育过程中形成的^[42]。发育中的神经元在到达靶区后,轴突开始形成分支和突触。在体外,异常的Slit2能够增加处于伸长时期的鼠脑干中央三叉神经感觉神经元轴突的分支,说明Slit2具有促进感觉神经元轴突分支的作用^[6]。在体内,在 $slit2$ 、 $slit3$ 双突变体或 $slit1$ 、 $slit2$ 、 $slit3$ 三重突变体小鼠中,眼睛上方的三叉神经感觉

神经元轴突的外周分支减少,说明Slit对小鼠三叉神经感觉神经元轴突的外周分支具有促进作用^[42]。另外,在体外,Slit1能促进小鼠皮层神经元轴突的伸长^[43]。尽管大量的研究表明Slit能促进轴突分支,但也有相反的报道,Campbell等研究发现,在中枢神经系统中,Slit1a抑制斑马鱼视网膜神经节细胞的轴突分支和突触形成^[44]。 $slit1^{-/-}/slit2^{+/+}$ 单突变小鼠的皮层中间神经元的形态没有改变,而 $slit1^{-/-}/slit2^{-/-}$ 双突变小鼠皮层中间神经元的突起长度、突起及其分支数量都有明显的增长, $robo^{-/-}$ 突变小鼠也出现相似的结果^[41]。

Slit在树突发生中也起作用。在果蝇中枢神经系统, $slit$ 缺失导致前角细胞(anterior corner cell, aCC)运动神经元不能形成树突^[45];在果蝇胚胎外周神经系统,Slit或Robo功能缺失会导致IV型md-da(class IV multi-dendritic dendrite-arborization)神经元快速的伸长和较少的树突分支,该结果说明Slit通过Robo调节空间填充神经元的生长率和分支水平从而使其适当地覆盖目标区域^[46]。体外实验显示Slit1能促进小鼠皮层神经元树突的生长和分支^[43]以及成年大鼠背根神经节神经元再生神经突的生长^[47],说明Slit能够促进神经树突的生长。

2.4 对血管和心脏形成的作用

$slit$ 是一个多功能基因,除了上述功能外,Slit对其它的生物学过程也有重要影响。

首先,Slit在血管生成中具有多种作用。在鼠胚胎血管新生中,Slit3除了对血管内皮细胞迁移有影响外,Slit3在体外还能促进血管内皮细胞的增殖和加快内皮细胞血管网络的形成,并且促进体外新血管的发芽和促进体内新血管的生长^[7];在视网膜、脉络膜和角膜血管疾病中,Slit2通过与Robo1、Robo4的相互作用能够抑制血管生成的过程,因此,Slit2作用机制的研究将能为该类疾病的治疗提供新的方案^[48,49]。此外,依赖Robo4的Slit信号能够钝化(blunt)宿主血管系统对炎症细胞因子的反应和增强血管系统的稳定能力,并能增强小鼠败血症模型和感染禽流感模型的存活率^[50]。

其次,Slit能够调节心脏的形成,Slit和Robo2在果蝇心脏共同表达,在 $slit$ 突变体中,心脏细胞的排列、极性和迁移出现异常,Slit控制果蝇心脏细胞的形态发生和心脏管腔的形成^[8];斑马鱼心脏管的形成也需要Slit信号成分^[51];而Slit3能够调节小鼠心脏腔室的形态发生^[17]。

3 Slit的分子作用机制

3.1 Slit通过结合Robo受体发挥作用

Slit的主要受体是Roundabout (Robo), *robo* 基因是 Seeger 等在研究影响果蝇轴突定向的突变体过程中首次发现的^[52], 1999年, Tessier-Lavigne、Rao 和 Goodman 实验组几乎同时证明了 Robo 是 Slit 的受体^[4, 11, 16]。Robo 是保守的跨膜蛋白, 果蝇的 Robo 家族有 3 个成员, Robo1、Robo2、Robo3, 典型的 Robo 蛋白的胞外域包括 5 个免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 样序列和 3 个纤连蛋白 III 型重复序列, 其胞内域包括 CC0~CC3 共 4 个短的保守序列 (图

2)^[53, 54]。线虫中存在一个 Robo, 即 SAX-3^[10]。哺乳动物中 Robo 家族成员有 4 个, 即 Robo1~Robo4。

Slit 功能的实现主要是通过其与受体 Robo 相结合而实现的 (图 2)。Howitt 等^[55]对果蝇 Slit 的 LRR 结构域进行了分析, 发现 3 个 Robo 受体共同竞争 Slit 的同一个活性部位——LRR-2 结构域。Fukuhara 等^[56]采用对果蝇 Robo Ig1~5 结构域进行结构突变的方法确定 Slit 结合 Robo Ig1 的 Thr-74、Phe-114 和 Arg-117 氨基酸残基。Morlot 等^[57]通过对人类 Slit2 的 LRR-2 结构域和 Robo1 的 Ig1~2 结构域的表面等离子体共振实验发现, Robo1 Ig1 是

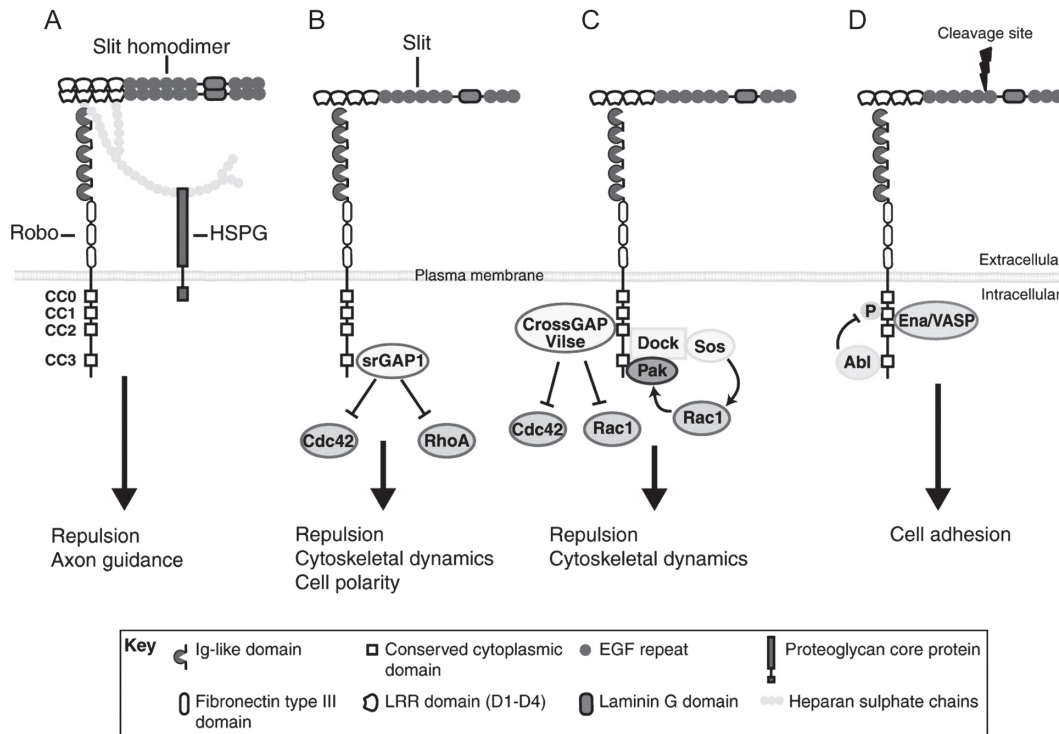


图 2. Slit-Robo信号示意图

Fig. 2. A schematic of Slit-Robo signaling. *A*: Slits bind to the immunoglobulin (Ig) 1 domain of Robo receptors through its second (D2) domain, which contains leucine-rich repeats (LRRs). Heparan sulphate proteoglycans (HSPGs) such as Syndecan (Sdc), which consist of a proteoglycan core protein and heparan sulphate (HS) chains, are co-receptors for Robo and Slit. HSPGs stabilize Robo and Slit binding by forming ternary complexes with the Ig1 domain of Robo receptors and the D2 domain of Slit through their HS polymers. *B*: The Rho GTPases and their regulators (GAPs and GEFs) are key components of the Slit-Robo signaling pathway. In the presence of Slit, Slit-RoboGAP1 (srGAP1) binds to the CC3 domain of Robo and inactivates RhoA and Cdc42. These effector proteins are able to mediate, among other outcomes, repulsion, control of cytoskeletal dynamics and cell polarity. *C*: In the presence of Slit, CrossGAP/Vilse can also bind to the CC2 domain of Robo and inhibit Rac1 and Cdc42. Rac1 is also activated by the recruitment of the GEF protein Son of sevenless (Sos) via the adaptor protein Dreadlocks (Dock), which binds to the CC2–3 domain of Robo. This activates the downstream target of Rac1 and p21-activated kinase (Pak), which also binds to Robo CC2–3 domains. These downstream signaling partners of Robo control repulsion and cytoskeletal dynamics. *D*: The tyrosine kinase Abelson (Abl) binds Robo CC3 domain and antagonizes Robo signaling through phosphorylation of the CC1 domain and mediates cell adhesion. Enabled (Ena), a substrate of Abl, also binds Robo CC1 and CC2 domains. The Slit cleavage site is also shown. Adopted with permission from Ypsilanti *et al.* (2010)^[54].

Slit2 LRR-2 结合的主要区域, 进一步对人的 Slit2 LRR-2 和 Robo1 Ig1 的共晶体分析表明, Robo1 的 Ig1 结构域与 Slit2 的 LRR-2 结构域凹面结合, 对 Robo1 Ig1 结合部位的突变分析也证明了 Slit LRR-2 与 Robo1 Ig1 之间的相互作用。

3.2 影响Slit与Robo结合的因子

3.2.1 硫酸肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)

HSPGs 是 Slit-Robo 信号的协同受体。主要的 HSPGs 分子有 Syndecans (Sdc)、Glypican、Glypican Dally-like (Dlp) 和 Perlecan 等, 肝素 (heparin) 是一种高度硫酸化的硫酸肝素 (heparan sulfate, HS) 变体^[58]。HSPGs 已被证明主要影响 Slit-Robo 的轴突导向功能 (图 2A)。

果蝇 Slit 的 LRR-2 结构域包含肝素的结合位点, 在固相结合实验中, 肝素显著提高了 Slit-Robo 之间相互作用的亲和力, 凝胶过滤色谱分析显示 Slit 的 LRR-2 结构域、Robo 的 Ig1~2 结构域和肝素形成一个三重复合体^[59]。另外对果蝇 Robo Ig1 结构域的保守氨基酸残基 Lys-69、Arg-117、Lys-122 和 Lys-123 的突变减少了 Robo 的 Ig1~5 结构域和肝素的结合^[56]。表面等离子体共振实验显示人类 Slit2 的 LRR-4 结构域和 HS 之间存在相互作用^[60]。

Sdc 和 Dlp 都属于跨膜的 HSPGs, Sdc 胞外域含有额外的硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 修饰, 而 Dlp 胞外域缺少 CS 修饰, Sdc 在 Slit 靶细胞中以细胞自主的方式起作用, 仅其胞外域就足够调节 Slit 的功能, Dlp 可以部分替代 Sdc 的功能, Sdc 和 Dlp 以合作却非冗余的方式对轴突导向起作用, Dlp 蛋白参与了配体 Slit 从表达部位到靶细胞的转运, 在靶细胞中, Sdc 集中和呈现 Slit^[61]。Smart 等^[62]也对 Sdc 和 Dlp 的功能进行了研究, Sdc 和 Dlp 都在果蝇胚胎的中枢神经系统侧面纵向神经纤维轴突束的形成中起作用, Sdc 主要对离中线最近的轴突的导向起作用, 而 Dlp 调节最外层的纵向轴突束, *sdc* 突变体中, 轴突的中线穿越出现异常, 而 Dlp 在中线穿越中不起作用。

在线虫中, 采用单细胞解析的方法发现, 不同的 HS 胞外修饰方式能够改变运动神经元轴突路线, 这个改变主要依赖于 HS 核心蛋白 LON-2/glypican 以及 SLT-1 和它的受体 EVA-1, 这为 HS 修饰能够调节配体-受体之间的相互作用的假说提供了体内遗传证据^[63]。

3.2.2 GTP酶激活蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)

RhoA、Rac1 和 Cdc42 属于 Rho 家族小分子鸟苷三磷酸酶 (small GTPases of Rho family, Rho GTPases), 能够调节肌动蛋白细胞骨架的动态变化^[64], 这些蛋白的 GDP 结合非活性状态和 GTP 结合活性状态之间的转变需要 GAPs 和鸟苷酸交换因子 (guanine exchange factors, GEFs) 的调节。slit-robo GTP 酶激活蛋白 (slit-robo GTPase-activating proteins, srGAP) 是 Wong 等利用酵母双杂交鉴定出来的 Slit-Robo 信号通路中的一种 GAP 蛋白, 包括 srGAP1、srGAP2 和 srGAP3^[65]。srGAP1 结合 Robo 的 CC3 结构域, 并通过其 GAP 结构域使 Cdc42 和 RhoA 失活, 从而调节 Slit 对来自 SVZ 的迁移神经先驱细胞的排斥作用 (图 2B); srGAP2 通过其 F-BAR 结构域也对神经细胞的迁移起到调节作用^[66]; srGAP3 调节 Rac 的活性, 在神经元的形态发生、细胞迁移发挥作用^[67]。Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse 也是一种 GAP 蛋白^[68], 在 Slit 与 Robo 结合的情况下, CrossGAP/Vilse 结合 Robo CC2 结构域并抑制 GTP 酶 Rac1 和 Cdc42 的活性, 同时接头蛋白 Dock 与 Robo CC2~3 结构域结合并吸收 GEFs 蛋白 Sos (Son of sevenless), 进而激活 GTP 酶 Rac1 和 p21 活化激酶 (p21-activated kinase, Pak), 这些下游信号分子控制 Slit 引起的排斥作用和细胞骨架动态变化 (图 2C)。

3.2.3 酪氨酸激酶Abelson

酪氨酸激酶 Abelson (Abl) 与 Robo CC3 结构域结合, 并通过对 Robo CC1 结构域的磷酸化抑制 Robo 信号, 从而抑制细胞黏附^[69], 而 Abl 的底物 Enabled (Ena) 能与 Robo 的 CC1~2 结构域结合 (图 2D)。

3.3 细胞内Ca²⁺浓度对Slit功能的影响

细胞内 Ca²⁺ 浓度在介导 Slit2 的排斥神经元迁移中有重要作用。Xu 等^[70]研究发现, 胞外 Slit2 浓度梯度导致体外培养的小脑颗粒神经元 (cerebellar granule neuron, CGN) 迁移方向的翻转, 这是由于胞外 Slit2 浓度梯度引起的胞内 Ca²⁺ 浓度升高逆转了迁移神经元中先前存在的不对称 Ca²⁺ 分布, 从而导致了神经元迁移方向的翻转。Guan 等^[71]进一步研究发现, 从生长锥到胞体传播的 Ca²⁺ 信号是 Slit2 的浓度梯度引起的 CGN 迁移方向翻转所必需的, Ca²⁺ 浓度通过调节胞内 RhoA 的重新分布, 使细胞骨架发生重组, 从而导致神经元迁移方向的翻转。

3.4 Netrin、Semaphorin、Ephrin信号对Slit功能的影响

Slit的排斥作用与Netrin的吸引作用既相互独立,又相互作用。Slit与Netrin共同调节斑马鱼间脑-脊髓多巴胺能神经元轴突(dopaminergic diencephalospinal axon)纵向路径的形成,Slit-Robo2信号对抗Netrin1-DCC信号对纵向多巴胺能神经元轴突的吸引作用,从而使其远离中线^[72]。

尽管在果蝇中Slit几乎调控了所有的排斥行为,然而在脊椎动物中Semaphorin也同样参与了对轴突的排斥活动。对鸡胚发育过程中胚胎角膜神经分布的研究发现,在角膜发育早期,Slit2和Semaphorin3A都阻止神经进入角膜基质,在发育的后期,Semaphorin3A仍然阻止神经进入角膜上皮,然而此时Slit2的作用转变为促进神经元轴突的分支^[73]。

此外,Slit2对血管生成的作用存在争议,Slit2具有促进血管生成和抑制血管生成两种不同的作用。Dunaway等^[74]发现,在Slit2单独存在时,在体外和体内都能促进血管生成,然而在Ephrin-A1存在时,Slit2抑制血管生成,Slit2促进血管生成是通过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Akt和GTP酶Rac的激活,当Ephrin-A1存在时,Akt和Rac的活性被抑制,这些结果说明Slit2促进血管生成和抑制血管生成这两种不同作用与环境中Ephrin-A1有关,Slit在血管生成中的复杂作用体现了依赖所处环境的机制。

3.5 MicroRNA-218(miR-218)对Slit功能的影响

最近的研究发现,小鼠*slit2*和*slit3*基因的第14个内含子编码的miR-218能够直接抑制Robo1、Robo2和大量硫酸肝素生物合成酶的表达,当使小鼠视网膜miR-218表达沉默时,出现了血管渗漏、视网膜脉管丛的复杂度降低及血管床的血管密度和厚度都较正常变小的现象,这说明miR-218通过调节Slit-Robo信号通路的组成分子来影响视网膜血管的发育^[75]。在斑马鱼中,miR-218同样对Robo1和Robo2具有负调控作用,基因敲除实验表明Slit/miR-218/Robo调节回路是斑马鱼心管形成所需的^[51]。此外,miR-218也能够通过下调Slit2-Robo1信号通路来抑制鼻咽癌的发展^[76]。以上结果表明,miR-218能够精确调节Slit-Robo信号组成分子的表达和活性,并通过这种机制维持Slit-Robo信号在体内的正常水平,最终保证生物体发育的正常进行。由于miR-218在不同脊椎动物间是高度保守的,Slit-

Robo信号通路的这种自我调控机制可能在不同物种的生理和病理过程中都发挥着至关重要的作用。

4 slit基因的表达调控研究

4.1 转录水平调控

通过遗传、生物化学和细胞培养分析发现,Single-minded、Fish-hook和Drifter三个转录因子共同表达在果蝇胚胎中枢神经系统的中线细胞,协同影响*slit*基因的转录^[77],另外,BTB转录因子Lola能够加强果蝇*slit*的表达^[78]。在鸡的视网膜,同源盒基因*irx4*负调控*slit1*的表达^[79]。最近的研究发现,在果蝇神经系统中,T-box转录因子Midline控制果蝇中线两侧细胞的*slit*的转录,在*midline*突变体,中线两侧细胞表达的*slit* mRNA大量减少^[80]。

4.2 转录后水平调控

在果蝇中,由于选择性剪接的结果,*slit*基因编码含有1 469和1 480个氨基酸残基两种不同蛋白,两者在最后一个EGF样序列的C-末端相差11个氨基酸残基^[81]。人类*slit2*存在*slit2A*、*slit2B*和*slit2C*三种剪接形式^[82]。在大鼠的大脑中,Slit1蛋白C-末端的选择性剪接导致其产物Slit1 α 富含半胱氨酸序列结构域的缺陷,但在体外该蛋白也能够对嗅球神经轴突导向起到排斥作用^[83]。

5 展望

Slit在神经系统和非神经系统的多种组织中发挥作用,其功能已通过大量的遗传学实验进行了研究,并且Slit不同生理功能的分子作用机制也在逐步阐明。最近,新研制的一种高通量微流体装置能够检测神经突对导向因子浓度梯度的反应,这种技术的应用将为研究*slit*基因的生物学功能提供有力的工具^[84]。虽然近年来关于Slit的研究取得了很大的进展,但也存在一些问题尚待解决。首先,Slit作用机制的研究涉及Slit与大量分子之间的相互作用,例如在果蝇中存在3种Robo,在脊椎动物中存在3种Slit和4种Robo,因此,在不同的信号事件中,Slit和Robo如何组合以及Slit和Robo的哪个区域在起作用需要明确;探明Slit与其它神经轴突导向分子之间的互作方式是全面理解Slit功能的关键,如Slit的排斥作用与Netrin的吸引作用之间既相互独立又相互作用的关系也需要进一步的研究。其次,*slit*基因在进化上高度保守,从果蝇到

人都保存了下来,并且其功能也具有很强的保守性,尤其是在神经系统中的轴突导向功能,而 Slit 多种功能的体现说明其分子作用机制具有共同性,因此研究这些功能在进化过程中是如何产生和获得的具有非常重要的意义。目前,我们正在对 *slit* 基因的起源和进化机制进行研究。此外,许多神经和精神方面的疾病以及神经再生问题仍然没有得到解决,如在颞叶癫痫 (temporal lobe epilepsy, TLE) 病人中, Slit2 的表达高于正常水平,说明 *slit* 基因在 TLE 发病中起作用^[85];开展 *slit* 在肿瘤转移及肿瘤新生血管生成中的作用机制研究,将为癌症治疗药物的开发提供理论依据和新的方法^[86, 87]。Slit 导向作用的研究不仅有助于揭示神经、血管、心脏等组织器官的发育调控机理,也将在医学领域展现出广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Chilton JK. Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 2006; 292(1): 13–24.
- 2 Niisslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch Dev Biol* 1984; 193: 267–282.
- 3 Rothberg JM, Hartley DA, Walther Z, Artavanis-Tsakonas S. slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* 1988; 55(6): 1047–1059.
- 4 Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 1999; 96(6): 795–806.
- 5 Hu H. Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 1999; 23(4): 703–711.
- 6 Ozdinler PH, Erzurumlu RS. Slit2, a branching-arborization factor for sensory axons in the mammalian CNS. *J Neurosci* 2002; 22(11): 4540–4549.
- 7 Zhang B, Dietrich UM, Geng JG, Bicknell R, Esko JD, Wang L. Repulsive axon guidance molecule Slit3 is a novel angiogenic factor. *Blood* 2009; 114(19): 4300–4309.
- 8 MacMullin A, Jacobs JR. Slit coordinates cardiac morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 2006; 293(1): 154–164.
- 9 Mertsch S, Schmitz N, Jeibmann A, Geng JG, Paulus W, Senner V. Slit2 involvement in glioma cell migration is mediated by Robo1 receptor. *J Neurooncol* 2008; 87(1): 1–7.
- 10 Hao JC, Yu TW, Fujisawa K, Culotti JG, Gengyo-Ando K, Mitani S, Moulder G, Barstead R, Tessier-Lavigne M, Bargmann CI. *C. elegans* slit acts in midline, dorsal-ventral, and anterior-posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor. *Neuron* 2001; 32(1): 25–38.
- 11 Li HS, Chen JH, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C, Ornitz DM, Wu JY, Rao Y. Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 1999; 96(6): 807–818.
- 12 Yeo SY, Little MH, Yamada T, Miyashita T, Halloran MC, Kuwada JY, Huh TL, Okamoto H. Overexpression of a slit homologue impairs convergent extension of the mesoderm and causes cyclopia in embryonic zebrafish. *Dev Biol* 2001; 230(1): 1–17.
- 13 Itoh A, Miyabayashi T, Ohno M, Sakano S. Cloning and expressions of three mammalian homologues of *Drosophila* slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 62(2): 175–186.
- 14 Hammond R, Vivancos V, Naeem A, Chilton J, Mambetisaeva E, Andrews W, Sundaresan V, Guthrie S. Slit-mediated repulsion is a key regulator of motor axon pathfinding in the hindbrain. *Development* 2005; 132(20): 4483–4495.
- 15 Geisen MJ, Di Meglio T, Pasqualetti M, Ducret S, Brunet JF, Chedotal A, Rijli FM. Hox paralog group 2 genes control the migration of mouse pontine neurons through slit-robo signaling. *PLoS Biol* 2008; 6(6): e142.
- 16 Kidd T, Bland KS, Goodman CS. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 1999; 96(6): 785–794.
- 17 Medioni C, Bertrand N, Mesbah K, Hudry B, Dupays L, Wolstein O, Washkowitz AJ, Papaioannou VE, Mohun TJ, Harvey RP, Zaffran S. Expression of Slit and Robo genes in the developing mouse heart. *Dev Dyn* 2010; 239(12): 3303–3311.
- 18 Morlot C, Hemrika W, Romijn RA, Gros P, Cusack S, McCarthy AA. Production of Slit2 LRR domains in mammalian cells for structural studies and the structure of human Slit2 domain 3. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2007; 63(Pt 9): 961–968.
- 19 Evans TA, Bashaw GJ. Axon guidance at the midline: of mice and flies. *Curr Opin Neurobiol* 2010; 20(1): 79–85.
- 20 Pappu KS, Morey M, Nern A, Spitzweck B, Dickson BJ, Zipursky SL. Robo-3-mediated repulsive interactions guide R8 axons during *Drosophila* visual system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(18): 7571–7576.
- 21 Erskine L, Herrera E. The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 2007; 308(1): 1–14.
- 22 Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ,

- Goodman CS, Mason CA, Tessier-Lavigne M. Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 2002; 33(2): 219–232.
- 23 Thompson H, Andrews W, Parnavelas JG, Erskine L. Robo2 is required for Slit-mediated intraretinal axon guidance. *Dev Biol* 2009; 335(2): 418–426.
- 24 Farmer WT, Altick AL, Nural HF, Dugan JP, Kidd T, Charon F, Mastick GS. Pioneer longitudinal axons navigate using floor plate and Slit/Robo signals. *Development* 2008; 135(22): 3643–3653.
- 25 Prince JE, Cho JH, Dumontier E, Andrews W, Cutforth T, Tessier-Lavigne M, Parnavelas J, Cloutier JF. Robo-2 controls the segregation of a portion of basal vomeronasal sensory neuron axons to the posterior region of the accessory olfactory bulb. *J Neurosci* 2009; 29(45): 14211–14222.
- 26 Cord BJ, Li J, Works M, McConnell SK, Palmer T, Hynes MA. Characterization of axon guidance cue sensitivity of human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 2010; 45(4): 324–334.
- 27 Braisted JE, Ringstedt T, O'Leary DD. Slits are chemorepellents endogenous to hypothalamus and steer thalamocortical axons into ventral telencephalon. *Cereb Cortex* 2009; 19 Suppl 1: i144–i151.
- 28 Bielle F, Marcos-Mondejar P, Keita M, Mailhes C, Verney C, Nguyen Ba-Charvet K, Tessier-Lavigne M, Lopez-Bendito G, Garel S. Slit2 activity in the migration of guidepost neurons shapes thalamic projections during development and evolution. *Neuron* 2011; 69(6): 1085–1098.
- 29 Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein JL, Sawamoto K. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 2010; 67(2): 213–223.
- 30 Ning Y, Sun Q, Dong Y, Xu W, Zhang W, Huang H, Li Q. Slit2-N inhibits PDGF-induced migration in rat airway smooth muscle cells: WASP and Arp2/3 involved. *Toxicology* 2011; 283(1): 32–40.
- 31 Wu JY, Feng L, Park HT, Havlioglu N, Wen L, Tang H, Bacon KB, Jiang Z, Zhang X, Rao Y. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature* 2001; 410(6831): 948–952.
- 32 Tole S, Mukovozov IM, Huang YW, Magalhaes MA, Yan M, Crow MR, Liu GY, Sun CX, Durocher Y, Glogauer M, Robinson LA. The axonal repellent, Slit2, inhibits directional migration of circulating neutrophils. *J Leukoc Biol* 2009; 86(6): 1403–1415.
- 33 Geutskens SB, Hordijk PL, van Hennik PB. The chemorepellent Slit3 promotes monocyte migration. *J Immunol* 2010; 185(12): 7691–7698.
- 34 Kim HK, Zhang H, Li H, Wu TT, Swisher S, He D, Wu L, Xu J, Elmets CA, Athar M, Xu XC, Xu H. Slit2 inhibits growth and metastasis of fibrosarcoma and squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 2008; 10(12): 1411–1420.
- 35 Yuasa-Kawada J, Kinoshita-Kawada M, Rao Y, Wu JY. Deubiquitinating enzyme USP33/VDU1 is required for Slit signaling in inhibiting breast cancer cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(34): 14530–14535.
- 36 Bauer K, Dowejko A, Bosserhoff AK, Reichert TE, Bauer R. Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Carcinogenesis* 2011; 32(6): 935–943.
- 37 Denk AE, Braig S, Schubert T, Bosserhoff AK. Slit3 inhibits activator protein 1-mediated migration of malignant melanoma cells. *Int J Mol Med* 2011; 28(5): 721–726.
- 38 Schmid BC, Rezniczek GA, Fabjani G, Yoneda T, Leodolter S, Zeillinger R. The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106(3): 333–342.
- 39 Zhou WJ, Geng ZH, Chi S, Zhang W, Niu XF, Lan SJ, Ma L, Yang X, Wang LJ, Ding YQ, Geng JG. Slit-Robo signaling induces malignant transformation through Hakai-mediated E-cadherin degradation during colorectal epithelial cell carcinogenesis. *Cell Res* 2011; 21(4): 609–626.
- 40 Denk AE, Kaufmann S, Stark K, Schedel J, Lowin T, Schubert T, Bosserhoff AK. Slit3 inhibits Robo3-induced invasion of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(2): R45.
- 41 Andrews W, Barber M, Hernandez-Miranda LR, Xian J, Rakic S, Sundaresan V, Rabbitts TH, Pannell R, Rabbitts P, Thompson H, Erskine L, Murakami F, Parnavelas JG. The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and morphological differentiation of cortical interneurons. *Dev Biol* 2008; 313(2): 648–658.
- 42 Ma L, Tessier-Lavigne M. Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J Neurosci* 2007; 27(25): 6843–6851.
- 43 Round JE, Sun H. The adaptor protein Nck2 mediates Slit1-induced changes in cortical neuron morphology. *Mol Cell Neurosci* 2011; 47(4): 265–273.
- 44 Campbell DS, Stringham SA, Timm A, Xiao T, Law MY, Baier H, Nonet ML, Chien CB. Slit1a inhibits retinal ganglion cell arborization and synaptogenesis via Robo2-dependent and -independent pathways. *Neuron* 2007; 55(2): 231–245.
- 45 Furrer MP, Vasenkova I, Kamiyama D, Rosado Y, Chiba A.

- Slit and Robo control the development of dendrites in *Drosophila* CNS. *Development* 2007; 134(21): 3795–3804.
- 46 Dimitrova S, Reissaus A, Tavosanis G. Slit and Robo regulate dendrite branching and elongation of space-filling neurons in *Drosophila*. *Dev Biol* 2008; 324(1): 18–30.
 - 47 Zhang HY, Zheng LF, Yi XN, Chen ZB, He ZP, Zhao D, Zhang XF, Ma ZJ. Slit1 promotes regenerative neurite outgrowth of adult dorsal root ganglion neurons *in vitro* via binding to the Robo receptor. *J Chem Neuroanat* 2010; 39(4): 256–261.
 - 48 Jones CA, London NR, Chen H, Park KW, Sauvaget D, Stockton RA, Wythe JD, Suh W, Larrieu-Lahargue F, Mukoyama YS, Lindblom P, Seth P, Frias A, Nishiya N, Ginsberg MH, Gerhardt H, Zhang K, Li DY. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nat Med* 2008; 14(4): 448–453.
 - 49 Han X, Zhang MC. Potential anti-angiogenic role of Slit2 in corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2010; 90(6): 742–749.
 - 50 London NR, Li DY. Robo4-dependent Slit signaling stabilizes the vasculature during pathologic angiogenesis and cytokine storm. *Curr Opin Hematol* 2011; 18(3): 186–190.
 - 51 Fish JE, Wythe JD, Xiao T, Bruneau BG, Stainier DY, Srivastava D, Woo S. A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish. *Development* 2011; 138(7): 1409–1419.
 - 52 Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS. Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 1993; 10(3): 409–426.
 - 53 Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 1998; 92(2): 205–215.
 - 54 Ypsilanti AR, Zagar Y, Chedotal A. Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 2010; 137(12): 1939–1952.
 - 55 Howitt JA, Clout NJ, Hohenester E. Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. *EMBO J* 2004; 23(22): 4406–4412.
 - 56 Fukuhara N, Howitt JA, Hussain SA, Hohenester E. Structural and functional analysis of slit and heparin binding to immunoglobulin-like domains 1 and 2 of *Drosophila* Robo. *J Biol Chem* 2008; 283(23): 16226–16234.
 - 57 Morlot C, Thielens NM, Ravelli RB, Hemrika W, Romijn RA, Gros P, Cusack S, McCarthy AA. Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(38): 14923–14928.
 - 58 Van Vactor D, Wall DP, Johnson KG. Heparan sulfate proteoglycans and the emergence of neuronal connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16(1): 40–51.
 - 59 Hussain SA, Piper M, Fukuhara N, Strohlic L, Cho G, Howitt JA, Ahmed Y, Powell AK, Turnbull JE, Holt CE, Hohenester E. A molecular mechanism for the heparan sulfate dependence of slit-robo signaling. *J Biol Chem* 2006; 281(51): 39693–39698.
 - 60 Seiradake E, von Philipsborn AC, Henry M, Fritz M, Lortat-Jacob H, Jamin M, Hemrika W, Bastmeyer M, Cusack S, McCarthy AA. Structure and functional relevance of the Slit2 homodimerization domain. *EMBO Rep* 2009; 10(7): 736–741.
 - 61 Chanana B, Steigemann P, Jackle H, Vorbruggen G. Reception of Slit requires only the chondroitin-sulphate-modified extracellular domain of Syndecan at the target cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(29): 11984–11988.
 - 62 Smart AD, Course MM, Rawson J, Selleck S, Van Vactor D, Johnson KG. Heparan sulfate proteoglycan specificity during axon pathway formation in the *Drosophila* embryo. *Dev Neurobiol* 2011; 71(7): 608–618.
 - 63 Bulow HE, Tjoe N, Townley RA, Didiano D, van Kuppevelt TH, Hobert O. Extracellular sugar modifications provide instructive and cell-specific information for axon-guidance choices. *Curr Biol* 2008; 18(24): 1978–1985.
 - 64 Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(9): 690–701.
 - 65 Wong K, Ren XR, Huang YZ, Xie Y, Liu G, Saito H, Tang H, Wen L, Brady-Kalnay SM, Mei L, Wu JY, Xiong WC, Rao Y. Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 2001; 107(2): 209–221.
 - 66 Guerrier S, Coutinho-Budd J, Sassa T, Gresset A, Jordan NV, Chen K, Jin WL, Frost A, Polleux F. The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis. *Cell* 2009; 138(5): 990–1004.
 - 67 Yang Y, Marcello M, Endris V, Saffrich R, Fischer R, Trendelenburg MF, Sprengel R, Rappold G. MEGAP impedes cell migration via regulating actin and microtubule dynamics and focal complex formation. *Exp Cell Res* 2006; 312(12): 2379–2393.
 - 68 Hu H, Li M, Labrador JP, McEwen J, Lai EC, Goodman CS, Bashaw GJ. Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(12): 4613–4618.
 - 69 Rhee J, Buchan T, Zukerberg L, Lilien J, Balsamo J. Cables

- links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol* 2007; 9(8): 883–892.
- 70 Xu HT, Yuan XB, Guan CB, Duan S, Wu CP, Feng L. Calcium signaling in chemorepellant Slit2-dependent regulation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(12): 4296–4301.
 - 71 Guan CB, Xu HT, Jin M, Yuan XB, Poo MM. Long-range Ca^{2+} signaling from growth cone to soma mediates reversal of neuronal migration induced by slit-2. *Cell* 2007; 129(2): 385–395.
 - 72 Kastnerhuber E, Kern U, Bonkowsky JL, Chien CB, Driever W, Schweitzer J. Netrin-DCC, Robo-Slit, and heparan sulfate proteoglycans coordinate lateral positioning of longitudinal dopaminergic diencephalospinal axons. *J Neurosci* 2009; 29(28): 8914–8926.
 - 73 Kubilus JK, Linsenmayer TF. Developmental guidance of embryonic corneal innervation: roles of Semaphorin3A and Slit2. *Dev Biol* 2010; 344(1): 172–184.
 - 74 Dunaway CM, Hwang Y, Lindsley CW, Cook RS, Wu JY, Boothby M, Chen J, Brantley-Sieders DM. Cooperative signaling between Slit2 and Ephrin-A1 regulates a balance between angiogenesis and angiostasis. *Mol Cell Biol* 2011; 31(3): 404–416.
 - 75 Small EM, Sutherland LB, Rajagopalan KN, Wang S, Olson EN. MicroRNA-218 regulates vascular patterning by modulation of Slit-Robo signaling. *Circ Res* 2010; 107(11): 1336–1344.
 - 76 Alajez NM, Lenarduzzi M, Ito E, Hui AB, Shi W, Bruce J, Yue S, Huang SH, Xu W, Waldron J, O'Sullivan B, Liu FF. MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res* 2011; 71(6): 2381–2391.
 - 77 Ma Y, Certel K, Gao Y, Niemitz E, Mosher J, Mukherjee A, Mutsuddi M, Huseinovic N, Crews ST, Johnson WA, Nambu JR. Functional interactions between *Drosophila* bHLH/PAS, Sox, and POU transcription factors regulate CNS midline expression of the slit gene. *J Neurosci* 2000; 20(12): 4596–4605.
 - 78 Crowner D, Madden K, Goeke S, Giniger E. Lola regulates midline crossing of CNS axons in *Drosophila*. *Development* 2002; 129(6): 1317–1325.
 - 79 Jin Z, Zhang J, Klar A, Chedotal A, Rao Y, Cepko CL, Bao ZZ. Irx4-mediated regulation of Slit1 expression contributes to the definition of early axonal paths inside the retina. *Development* 2003; 130(6): 1037–1048.
 - 80 Liu QX, Hiramoto M, Ueda H, Gojobori T, Hiromi Y, Hirose S. Midline governs axon pathfinding by coordinating expression of two major guidance systems. *Genes Dev* 2009; 23(10): 1165–1170.
 - 81 Rothberg JM, Artavanis-Tsakonas S. Modularity of the slit protein. Characterization of a conserved carboxy-terminal sequence in secreted proteins and a motif implicated in extracellular protein interactions. *J Mol Biol* 1992; 227(2): 367–370.
 - 82 Little M, Rumballe B, Georgas K, Yamada T, Teasdale RD. Conserved modularity and potential for alternate splicing in mouse and human Slit genes. *Int J Dev Biol* 2002; 46(4): 385–391.
 - 83 Tanno T, Takenaka S, Tsuyama S. Expression and function of Slit1alpha, a novel alternative splicing product for slit1. *J Biochem* 2004; 136(5): 575–581.
 - 84 Kothapalli CR, van Veen E, de Valence S, Chung S, Zervantonakis IK, Gertler FB, Kamm RD. A high-throughput microfluidic assay to study neurite response to growth factor gradients. *Lab Chip* 2011; 11(3): 497–507.
 - 85 Fang M, Liu GW, Pan YM, Shen L, Li CS, Xi ZQ, Xiao F, Wang L, Chen D, Wang XF. Abnormal expression and spatiotemporal change of Slit2 in neurons and astrocytes in temporal lobe epileptic foci: A study of epileptic patients and experimental animals. *Brain Res* 2010; 1324: 14–23.
 - 86 Liu ZJ, Herlyn M. Slit-Robo: neuronal guides signal in tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2003; 4(1): 1–2.
 - 87 Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chedotal A. Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 2011; 11(3): 188–197.