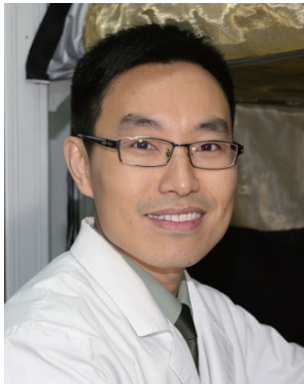


DOI: 10.13376/j.cbls/2017038

文章编号: 1004-0374(2017)03-0277-15



吴海涛, 军事医学科学院基础医学研究所神经生物学研究室主任、研究员, 国家优秀青年基金获得者。先后入选北京市“科技新星”、原总后勤部“科技新星”和军事医学科学院“十大杰出青年”。现任北京市神经科学学会青年委员会副主任委员、中国神经科学学会神经发育与再生分会委员、全军神经生物学专业委员会委员、中国生理学会应用生理学专业委员会委员。主要研究方向为神经发育与认知的分子机制及干预措施。研究组近年来的主要研究工作包括: (1) 神经肌肉接头突触发育及生理功能调控机制; (2) 大脑发育与认知功能障碍的神经环路基础及干预措施。相关研究结果发表在 *Neuron*、*PNAS*、*Development* 和 *eLife* 等刊物。

神经肌肉接头突触发育信号机制研究进展

杨海红, 吴海涛*

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要: 神经肌肉接头是目前研究较为深入的一种经典外周胆碱能化学突触。神经肌肉接头突触形成依赖于运动神经元与骨骼肌细胞之间的精细相互作用和复杂信号传递。此外, 胶质细胞在神经肌肉接头突触发育和成熟过程中亦发挥重要功能。现将主要围绕近年来神经肌肉接头发育过程中若干重要信号通路以及相关神经肌肉系统疾病的主要研究进展进行综述。

关键词: 神经肌肉接头; 运动神经元; 骨骼肌细胞; 胶质细胞

中图分类号: Q42; R338.13 **文献标志码:** A

Progresses and perspectives of signaling mechanisms underlying neuromuscular synapses development

YANG Hai-Hong, WU Hai-Tao*

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Neuromuscular junction (NMJ) is a classical peripheral cholinergic chemical synapse which has been extensively studied to date. The formation of NMJ synapses relies on the precise interaction as well as complicated signaling transduction between motoneurons and skeletal muscle fibers. Moreover, Schwann cells also play a critical role during NMJ synapses development and maturation. This review highlights recent advances in the study of NMJ development, focusing on several crucial signaling pathways, and related neuromuscular disorders as well.

Key words: neuromuscular junction; motoneurons; skeletal muscle fibers; Schwann cells

收稿日期: 2016-05-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2014CB542203); 国家自然科学基金项目(31371149, 315-22029); 北京市科学技术委员会“脑认知与脑医学”专项资助项目(Z161100000216154); 北京市科技新星项目(Z131102000413033)

*通信作者: E-mail: wuht@bmi.ac.cn

神经肌肉接头 (neuromuscular junction, NMJ) 是一种外周化学突触, 主要由运动神经元、骨骼肌和包绕在运动神经末梢的雪旺氏 (Schwann) 胶质细胞组成。同中枢神经系统突触相比, NMJ 具有体积较大、获取便捷、结构简单等特点, 因此, 作为一个经典模型被广泛用于研究突触发育的信号机制^[1-2]。不同种属 NMJ 采用不同类型的神经递质进行信号传递: 脊椎动物 NMJ 采用的是乙酰胆碱 (ACh); 果蝇 NMJ 采用的是谷氨酸 (Glu); 而线虫则具有两种不同类型的 NMJ, 包括能够引起骨骼肌兴奋性收缩的乙酰胆碱 (ACh) 和可导致骨骼肌抑制性舒张的 γ -氨基丁酸 (GABA)。上述神经递质的释放依赖于运动神经末梢突触囊泡和突触“活跃区” (active zone) 的分化、锚定和融合; 与之对应的是骨骼肌表面特化形成神经递质受体高度富集的突触后膜, 两者之间形成精准高效的 NMJ 运动终板结构^[3]。NMJ 发育或功能异常会导致包括先天性肌营养不良症、重症肌无力和脊髓侧索硬化症在内的多种神经肌肉系统疾病。

NMJ 的发育和维持依赖于突触前运动神经元和突触后骨骼肌细胞之间的相互作用, 且两者之间相互依赖。过去认为, 骨骼肌运动终板的分化成熟依赖于运动神经末梢分泌的顺向信号分子 (antegrade signals), 而运动神经元的分化成熟依赖于突触后骨骼肌分泌的逆向信号分子 (retrograde signals)^[1,3-4]。而近年来越来越多的研究证实, 有些分子同时参与突触前和突触后的分化成熟, 这表明 NMJ 突触前后膜分化成熟也可依赖相同的分子发挥调控作用。此外, 包绕在 NMJ 运动神经末梢的雪旺氏胶质细胞通过分泌一些细胞因子参与调控 NMJ 发育^[5-7], 而雪旺氏细胞的分化成熟也受到突触前和突触后来源诸多信号分子的调控^[8-10]。

除非特别指出, 本文将主要针对哺乳动物 NMJ 发育过程中运动神经元、骨骼肌细胞及包绕在运动终板外的雪旺氏胶质细胞之间相互作用的分子信号机制研究进展进行总结。

1 NMJ发育早期: 运动神经投射与AChR“预排”

在胚胎发育阶段, NMJ 的形成依赖于两个核心步骤, 即脊髓前角运动神经元的正确投射和靶器官骨骼肌的分化成熟。在胚胎早期, 脊髓前角中的运动神经元群根据其所在位置不同可划分为不同“运动柱” (motor columns)^[11-12], 这些不同类型的“运动柱”在完成正确神经投射、识别特定骨骼肌靶器官及建立正确 NMJ 功能联系控制复杂运动行为方

面起决定性作用^[11-14]。早期运动神经轴突投射方向并不受骨骼肌调控, 而是由其自身基因表达模式、神经电活性及周围神经轴突导向分子等多种因素共同决定^[11-12,15-17]。

随后, 运动轴突投射并对其靶器官骨骼肌进行正确识别是形成 NMJ 稳定支配的关键步骤。小鼠胚胎 E12.5-E13.5 时期, 在新生骨骼肌表面会形成很多弥散分布的不稳定性微小乙酰胆碱受体 (AChR) 聚集簇, 通常将其称之为新生 (aneural) AChR 的“预排” (prepatternning)^[18-21]。这些新生 AChR 聚集簇的生理学功能是该研究领域至今关注的重要科学问题。体外实验发现, 在共培养体系下脊髓运动神经元通常会忽略骨骼肌细胞表面已形成的“初始” (primitive) AChR 自发聚集簇, 而选择在非 AChR 聚集簇部位形成新的突触样连接, 表明运动神经元在 NMJ 位置形成方面起决定性作用^[22]。在体实验观察到, 在运动神经轴突投射到肌肉之前, 肌纤维表面形成的“初始” AChR 聚集簇多集中在骨骼肌纤维的中央区域^[23-24]; 而在膈神经或运动神经元缺失的动物体内仍会发生 AChR 的“预排”, 提示“初始” AChR 聚集簇形成并不依赖于运动神经元^[25], 骨骼肌纤维在 NMJ 发育早期发挥积极作用^[26]。当小鼠胚胎发育至 E18.5 时, 运动神经支配的“初始” AChR 聚集簇会显著增大并逐步特化形成 NMJ, 未被运动神经轴突支配的“初始” AChR 聚集簇将会逐步消失^[23-24,27]。

通过对小鼠胚胎膈肌进行体外培养观察还发现, 在没有“初始” AChR 聚集簇形成的肌肉表面依然能够诱导形成 NMJ 结构^[28]; 实验也进一步证实, 当因缺乏 AChR γ 亚基而不能形成“初始” AChR 聚集簇时, 运动神经源性“聚集素” agrin 同样能够在胚胎发育晚期诱导 AChR 聚集簇和 NMJ 结构形成, 尽管其在骨骼肌表面的分布会更加弥散^[29], 提示“初始” AChR 聚集簇形成并非是 NMJ 形成的必要条件。Jing 等^[30]通过对斑马鱼 NMJ 发育早期 AChR 聚集簇“预排”和运动轴突投射进行深入细致研究后, 亦得出类似结论。总而言之, 在脊椎动物胚胎发育早期, 骨骼肌表面“初始” AChR 聚集簇“预排”在调控运动神经元生长锥导向和决定 NMJ 形成位置方面可能发挥重要作用^[30-33]。

2 NMJ突触后膜分化: 骨骼肌表面AChR聚集簇形成

神经肌肉接头发育和成熟过程中最具代表性的

事件是骨骼肌表面突触后膜特化和 AChR 聚集簇形成 (AChR clustering), 其中主要包括 AChR 数量和密度增加、稳定性增强以及胚胎型 AChR γ 亚基向成年型 ϵ 亚基转换等, 在此过程中很多重要信号分子参与了 NMJ 突触后膜的分化调控。

2.1 Agrin/LRP4/MuSK信号

研究 NMJ 突触后膜 AChR 聚集簇的形成过程是揭示 NMJ 发育调控机制的关键环节。其中, “聚集素” agrin 在此过程中发挥关键作用^[34]。Agrin 是一种硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG), 它不仅能够诱导成年骨骼肌异位 AChR 聚集簇形成^[35], 还能在去神经支配骨骼肌中诱导突触后膜特异性 AChR 聚集和分化^[35-37]。Agrin 突变小鼠表现出 NMJ 发育缺陷, 突触后膜 AChR 弥散分布于突变小鼠骨骼肌表面, 证明 agrin 在诱导突触后膜 AChR 聚集和 NMJ 形成方面发挥至关重要的作用^[38]。需强调, 在胚胎发育早期 agrin 突变小鼠骨骼肌表面仍可形成“初始” AChR 聚集簇, 提示 agrin 并不参与早期 AChR “预排” (prepatternning)。此外, 虽然骨骼肌和雪旺氏细胞均能产生 agrin (z -亚型), 但只有运动神经源性 agrin ($z+$ 亚型) 在刺激 AChR 聚集簇形成方面才具有显著功能, 其活性是非神经源性 agrin 的 1 000 倍^[39-40]。有意思的是, agrin 缺失小鼠突触后膜 AChR 聚集簇发育缺陷的表型能够被乙酰胆碱转移酶 ChAT 突变所挽救, agrin/ChAT 双突变小鼠具有接近于正常 NMJ 的突触后 AChR 聚集簇结构和运动神经支配^[41-42]。乙酰胆碱 ACh 诱发 AChR 聚集簇解聚的活性依赖于骨骼肌细胞内丝苏氨酸激酶 Cdk5 和钙调蛋白激酶系统^[41,43-44], Cdk5 突变小鼠具有和 ChAT 突变小鼠类似的 NMJ 缺陷表型, 在胚胎发育早期两者均能在骨骼肌表面诱发形成多余的 AChR “预排”^[41,43]。上述结果表明, agrin 主要通过拮抗肌肉活动诱发的 AChR 聚集簇解聚, 进而诱导 NMJ 突触后膜 AChR 密度及其结构稳定性增加。

MuSK (muscle-specific tyrosine kinase) 是骨骼肌特异性酪氨酸激酶受体, 最早在富含化学突触的电鳗内被发现并克隆^[45], 能够在 NMJ 处与突触后膜 AChR 聚集簇共定位^[46]。与 agrin 突变小鼠不同的是, MuSK 突变小鼠不仅不能够形成 NMJ, 而且还不能形成“初始” AChR 聚集簇“预排”, 提示 MuSK 在非神经依赖的突触后膜 AChR “预排”和神经依赖的 agrin 诱导 AChR 聚集簇形成方面均发挥关键作用^[23-24,47-48]。在 agrin 突变小鼠体内过表达 MuSK

不仅能够诱导 NMJ 形成, 还能挽救 agrin 突变小鼠免于呼吸障碍导致的死亡^[33]。虽然 MuSK 作为 agrin 受体在调控 agrin 信号转导和 NMJ 发育方面发挥关键作用, 但两者间并不能直接相互作用, 需要借助一个称为 MASC (myotube-associated specific component) 的共受体来介导^[48]。直至 2008 年, Steven Burden 教授和 Lin Mei 教授实验室同期独立发现并报道, 低密度脂蛋白受体超家族成员 LRP4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4) 就是长期以来寻找的介导 agrin 与 MuSK 之间相互作用的共受体, LRP4 受体介导了 agrin 对 MuSK 的激活作用及 AChR 聚集簇形成过程^[49-51]。

结构生物学研究揭示, LRP4 胞外段的第一个 β -螺旋桨卷曲 (β -propeller) 结构能够特异性结合 $z+$ agrin 蛋白 C 端的 LG3 结构域, 从而以四聚体的形式激活 MuSK^[52]。进一步研究结果表明, 骨骼肌源性 LRP4 不仅能诱导突触后膜 AChR 聚集簇形成, 决定 AChR 聚集簇在骨骼肌表面形成的位置, 而且还能作为“逆向 (retrograde)”信号分子调控运动神经元轴突末梢的分化, 但这种逆向调控的分子机制仍有待进一步深入研究^[53-54]。LRP4 胞外段还能够同淀粉样蛋白前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 相结合, 在培养肌肉细胞内加入 APP 能够显著增加 agrin 诱导骨骼肌细胞表面 AChR 聚集簇的形成, 体内缺失 APP 能加重 LRP4 跨膜区缺失小鼠 NMJ 缺陷表型, 提示 APP 可能通过与 agrin 和 LRP4 形成复合物参与 NMJ 发育调控^[55]。事实上, LRP4 不仅在调控 NMJ 发育方面发挥重要作用, 同时对于维持成熟 NMJ 结构和功能亦不可或缺^[56]。

MuSK 作为 agrin/LRP4/MuSK 信号通路中发挥关键作用的突触后酪氨酸激酶, 其下游信号转导机制一直是该研究领域的热点和难点。越来越多的研究表明, MuSK 不仅仅只作为 agrin 下游的一个信号分子发挥作用, 同时, 也可作为一个“脚手架”将很多信号分子锚定在一起形成信号复合物。在目前已报道的 MuSK 相互作用蛋白中, 最关键的当属接头分子 Dok7 (downstream-of-tyrosine-kinase 7)。Dok7 的 PTB 结构域能够同 MuSK 胞内段的激酶活性区相互作用, Dok7 突变小鼠具有和 MuSK 突变小鼠高度相似的 NMJ 发育缺陷表型。体外实验还显示, 过表达 Dok7 能够以 agrin 非依赖方式激活 MuSK 并诱导 AChR 聚集簇形成^[57]。Hollock 等^[58]研究发现, agrin 激活 MuSK 信号后能将另外两种接头蛋白 Crk 和 Crk-L 招募到 Dok7 蛋白的 C 端并激活下

游信号转导，抑制 Crk 和 Crk-L 表达将导致 NMJ 发育和结构的显著异常。就 Dok7 而言，其是否能够同 LRP4 相互作用并介导 agrin 信号转导也是一个值得探索的非常有意义的科学问题。除 Dok7 外，MuSK 还可同热休克蛋白分子伴侣 Tid1 (tumorous imaginal discs) 相互作用，这种作用对 agrin 激活 MuSK 同 Dok7 之间相互作用并诱导 AChR 聚集簇形成至关重要^[59]。当 MuSK 被激活后能够发生快

速的内化^[60]，此过程是诱导 AChR 聚集簇形成的关键步骤。目前已发现 20 余种 MuSK 下游相互作用分子，包括酪氨酸激酶 Abl^[61]、Dvl^[62]、GTPases 活化酶 GGT^[63]、MAGUK 蛋白 MAGI-1c^[64]、14-3-3 γ ^[65] 和 Syne1^[66-67]，以及 E3 泛素连接酶家族分子 Paul 和 PDZRN3^[68-69] 等，这些分子在 MuSK 介导的 NMJ 突触后膜分化方面均发挥调节作用 (表 1)。

最新研究还表明，成年不同类型骨骼肌中

表1 Agrin/LRP4/MuSK信号通路下游相关关键信号分子

分类	重要信号分子	生理功能
脚手架和接头蛋白	Dok7、Dvl、Pak1、Tid1、APC、Rapsyn、Crk、CrkL	诱导和稳定AChR聚集
蛋白酶类	Calpain	解聚AChR聚集簇
酪氨酸蛋白激酶	Abl、Src、Fyn	调控骨架分子actin组装
酪氨酸蛋白磷酸酶	Shp2	诱导MuSK激酶去磷酸化
丝苏氨酸蛋白激酶	Cdk5、CaMK II、CK2	介导ACh信号、解聚AChR
小G蛋白	Rho、Rac	调控AChR聚集簇形成
异戊二烯基转移酶	GGT	调控AChR聚集簇形成

MuSK 的表达水平存在差异性，这种差异可能决定着不同部位骨骼肌纤维 NMJ 可塑性的差异^[70]。目前，本实验室正尝试采用更加灵敏的手段来筛选 MuSK 潜在的未知关键底物分子，相关研究将有望进一步深化对 NMJ 发育过程中 agrin/LRP4/MuSK 信号调控机制的理解。

2.2 Wnt和Neuregulin信号

在体遗传学证据表明，LRP4 和 MuSK 突变小鼠的 NMJ 发育缺陷表型要比 agrin 突变小鼠严重得多，尤其在胚胎发育早期，LRP4 和 MuSK 突变小鼠骨骼肌表面“初始”AChR 聚集簇“预排”形成完全消失，而 agrin 突变小鼠依旧能够形成 AChR 聚集簇的“预排”，提示体内存在一种 agrin 非依赖的信号通路介导早期 NMJ 特化过程。早期研究发现，MuSK 能够同 Wnt 信号通路中关键脚手架分子 Dishevelled (Dvl) 相互作用，而 Dvl 的突变会引起体外培养 NMJ 突触前后膜的功能异常，提示 Wnt 信号可能参与了 NMJ 的发育调控^[62]。此外，Wnt 下游信号分子 APC 和 β -catenin 分别被证明能够调节 AChR 聚集簇形成和 NMJ 发育^[71-73]。Wnt3 可通过激活 Rac1 而非经典 Wnt 信号通路，促进 AChR 聚集簇形成^[74]。国内罗振革教授实验室还研究发现，Wnt3a 可通过经典 Wnt 信号通路抑制 NMJ 脚手架蛋白 rapsyn 转录，减少 AChR 聚集簇形成^[75]。最近系统性体外实验结果显示，Wnt3a、7a、8a 和 10b 能够抑制 agrin 介导的 AChR 聚集簇形成，而

Wnt9a、9b、10 和 16 则能以 agrin 非依赖方式诱导骨骼肌细胞表面 AChR 聚集簇形成，提示不同类型 Wnt 分子可能在 NMJ 发育过程中发挥多样性的生物学作用^[76]。Jing 等^[30]发现，Wnt11 的斑马鱼同源物 Wnt11r 能够结合 MuSK (*Unplugged*) 胞外段 CRD 结构域，并通过激活 Dvl 信号通路调节斑马鱼发育早期新生 AChR 聚集簇的“预排”，进而影响运动神经元生长锥导向及其在骨骼肌表面的定位，提示 Wnt 可能通过调控突触后骨骼肌表面 AChR 聚集簇“预排”的形成来影响突触前运动神经元分化，因此，具有双向信号调节功能。2015 年，Messeant 等^[77]研究发现，MuSK 胞外段 CRD 缺失小鼠发育早期可出现 AChR 聚集簇“预排”形成缺陷，且成年后出现典型的肌肉萎缩、肌力下降等症状，在给予 GSK3 β 抑制剂氯化锂处理后能够逆转 NMJ 缺陷表型，表明 Wnt 不仅可通过 MuSK 蛋白 CRD 结构域调控 NMJ 早期发育，同时还参与了成熟后 NMJ 的功能维持。

在 NMJ 发育过程中，神经调节素家族成员 neuregulin1 (NRG1) 广泛表达于运动神经元、骨骼肌纤维及雪旺氏细胞中^[78-81]。既往研究表明，胞外 NRG1 能够同其酪氨酸激酶受体 ErbB 相互作用并调控 AChR 转录及相关蛋白的表达^[78-81]。但 NRG1 激活 ErbB 下游信号通路进而调控 AChR 转录和聚集的分子机制目前仍不明了，有些研究结果甚至质疑 NRG1 及其受体 ErbB 是否真的介导了 NMJ 的形

成^[8,82]。相关研究主要通过条件性敲除小鼠实验发现, 当在骨骼肌中特异性敲除 NRG1 受体 ErbB2 或 ErbB4 时并未对 NMJ 形成产生显著影响^[8]。当特异性敲除运动神经来源 NRG1 时, 突触后膜 AChR 的聚集和形成也未见显著影响; 特异性敲除骨骼肌源性 NRG1 也不会改变突触后膜的分化成熟^[82], 但由于 NRG1 或其受体 ErbB2 和 ErbB3 全身突变小鼠不能够正常形成 NMJ^[83], 提示 NRG1 对 NMJ 的发育调控作用可能还存在一些非 AChR 转录依赖的其他途径。

由于雪旺氏细胞也表达 NRG1 及其受体^[79], 越来越多研究提示, NRG1 对 NMJ 突触后膜的调节作用可能通过调控雪旺氏细胞的存活及其功能间接实现^[8-9,83-84]。假定如此, 雪旺氏细胞和运动神经源性而非骨骼肌源性 NRGs 可能才是调控 NMJ 发育和成熟的关键来源。目前尚不清楚 NRG1 及其受体 ErbB2 和 ErbB3 全身突变小鼠的 NMJ 缺陷表型是由于雪旺氏细胞发育缺陷导致的, 还是因为缺乏 NRG1 信号引起, 抑或两者兼而有之。要回答该问题, 只有通过分别建立雪旺氏细胞和运动神经元特异性 NRG1 及其受体敲除小鼠才有可能实现。2016 年, Lee 等^[85]研究发现, NRG1 在 NMJ 突触“消减”关键时期即出生后 2~3 周可达高峰, 之后便逐渐下降, 至成年后保持低水平表达, 运动神经末梢特异性过表达 NRG1 转基因小鼠显示出明显的 NMJ 突触“消减”加速表型, 而成年后持续过表达 NRG1 则促进 NMJ 结构与功能重塑, 表明运动神经源性 NRG1 对 NMJ 可塑性的调控作用可能依赖于运动神经末梢雪旺氏细胞的功能发挥。

2.3 细胞外基质蛋白

在 NMJ 发育过程中, 骨骼肌表面和运动神经末梢之间突触间隙内会形成一种称为突触基底结构 (synaptic basal lamina, SBL) 的细胞外基质蛋白 (ECM) 复合体。目前认为, 这些细胞外基质蛋白不仅对于突触后膜 AChR 聚集簇形成和维持至关重要, 同时, 还能够调控突触前运动神经末梢的分化成熟。目前已经鉴定出的 NMJ 相关细胞外基质蛋白, 主要包括前面介绍过的运动神经源性 agrin、层连蛋白 laminin、胶原蛋白 collagen IV ($\alpha 3 \sim \alpha 6$) 和 XIII、基底膜蛋白多糖 perlecan、乙酰胆碱脂酶 AChE 及其相关胶原蛋白 ColQ 等^[86]。需要特别指出的是, 从结构上看, NMJ 突触间隙内 ECM 蛋白的作用可能是将运动神经末梢与突触后骨骼肌表面分隔开, NMJ 突触间隙的距离在 50 nm 左右, 而很多 ECM

蛋白, 包括 agrin、laminin 和 collagen IV 等在内其分子大小均超过 50 nm, 提示这些排列在 SBL 中间的 ECM 蛋白能够同时接触到突触前膜和后膜。

NMJ 突触特异性表达的 laminin 共有 3 种亚型, $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 和 $\beta 2$, 其中 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 亚型主要在出生后表达, 而 $\beta 2$ 亚型在胚胎期高表达^[87]。Laminin $\beta 2$ 突变小鼠显示出 NMJ 发育异常, 位于运动神经末梢的雪旺氏细胞发出异常突起延伸至运动神经元与骨骼肌细胞之间的突触间隙内, 此外, 突变小鼠还显示出突触后膜褶皱数目减少及其同突触前神经末梢“活跃区” (active zone) 错排等缺陷。此外, 突变小鼠还呈现动作电位诱发障碍等缺陷^[88]。Laminin 还可以通过巢蛋白 entactin^[89]、纤连蛋白 fibronectin^[90] 和蛋白多糖 perlecan 等同 collagen IV 结合形成胞外基质网络, 尤其是骨骼肌外 Laminin 211 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) 蛋白对于维持骨骼肌纤维膜的整体性而言至关重要^[91-92]。当 laminin $\alpha 2$ 及其结合糖蛋白 dystroglycan 或整合素 integrin $\alpha 7\beta 1$ 发生缺陷时可产生显著先天性肌无力症状^[93-95]; 无论是 dystroglycan 胞外段糖基化修饰障碍^[96-97], 抑或是胞内端结合蛋白 dystrophin 或 plectin1 缺失, 都能产生显著的肌萎缩表型^[98]。值得注意的是, 几乎所有的 laminin 蛋白 α 链都能够结合 α -dystroglycan 和 integrin $\beta 1$, 且三聚体形式的成熟 laminin 分子在相关蛋白的参与下具有同其他 ECM 蛋白形成多聚复合体的基本特性, 提示包含 laminin 在内的这些 ECM 蛋白可能以多聚复合体的形式共同参与 NMJ 精细结构的形成, 并且对于成熟 NMJ 结构稳定性的维持亦至关重要。事实上, 骨骼肌来源 laminin 家族分子除了参与调控 NMJ 突触后膜特化和 AChR 聚集簇的稳定性, 同时, 在逆向调控突触前运动神经末梢分化方面也具有重要功能, 相关研究进展将在本文后半部分另行讨论。

除 laminin 外, 骨骼肌纤维基底膜中还富含另外一种 ECM 胶原蛋白 collagen IV^[99], 骨骼肌表面 collagen IV 具有多种不同亚型, 其中 collagen IV ($\alpha 1$) $2(\alpha 2)$ 主要存在于非 NMJ 部位的骨骼肌基底膜中, 而 collagen IV ($\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$) 和 collagen IV ($\alpha 5$) $2-(\alpha 6)$ 则特异性表达在 NMJ 部位的突触基底膜内^[100-101]。Collagen IV ($\alpha 3 \sim \alpha 6$) 在 NMJ 部位表达较晚, 一直到出生后 3 周成熟的 NMJ 部位才开始表达^[101]。正因如此, collagen IV 突变小鼠在出生后 3 周内 NMJ 未见显著异常, 但出生 2 月后即表现出典型的 AChR 聚集簇碎片化。有意思的是, 突变小鼠还呈现出典型的神经末梢结构异常改变, 提示 collagen IV 除了

参与调控突触后膜 AChR 聚集簇的稳定性外，同时，还可作为“逆向”信号分子参与突触前运动神经元的分化，通过这种双向调控作用维持成熟 NMJ 结构和功能的稳定性^[101]。与 collagen IV 类似，collagen XIII 在出生后早期的 NMJ 部位表达比较低，而在出生后 2 周表达量逐渐增加，骨骼肌特异性敲除 collagen XIII 可导致 NMJ 突触前后膜排列和定位紊乱^[102]。有意思的是，collagen XIII 突变小鼠具有同 laminin $\beta 2$ 突变小鼠相似的 NMJ 表型改变^[88]，即两者都会导致包绕神经末梢的雪旺氏细胞的异常突起延伸至突触间隙内；在突触功能方面，表现为微小终板电位 mEPP 幅度和频率的显著降低^[102]。

ColQ (Collagen Q) 是另一种在 NMJ 部位特异性高表达的胶原蛋白，能够同胆碱酯酶 AChE 和 MuSK 结合，参与调控 NMJ 突触后膜分化成熟^[103-105]。ColQ 突变小鼠丧失了将 AChE 正确定位到 NMJ 空间位置的能力，尽管仍然能够形成 NMJ，但伴随有一定程度的结构和形态学改变，突变小鼠通常只能存活数周^[106]。ColQ 还能够同蛋白多糖 perlecan 相互作用，perlecan 突变小鼠具有同 ColQ 突变小鼠类似的表型，即 AChE 不能精确定位到 NMJ 的合适位置，但与 ColQ 突变小鼠不同的是，perlecan 突变小鼠出生后即因呼吸衰竭而死亡^[107]。因此，上述研究表明，ColQ-AChE 能够同 MuSK 及包括 perlecan 在内的其他一些 NMJ 突触特异性 ECM 相互作用，起到锚定 AChE 精确定位和稳定 ECM 表达的作用，反之亦然。

值得一提的是，细胞外基质金属蛋白酶 (extracellular matrix metalloproteinases, MMPs) 及其抑制剂 TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) 在 NMJ 发育过程中可能也发挥重要调节作用。但由于啮齿类动物体内含有大量不同亚型的 MMPs 和 TIMPs，这给研究工作带来一定挑战。果蝇体内只存在两种 MMPs (分泌型 MMP1 和 GPI- 锚着型 MMP2) 和一种分泌性 TIMP，这大大方便了有关 MMPs 和 TIMPs 调控 NMJ 发育的在体功能研究。有意思的是，2016 年，Dear 等^[108]的研究结果表明，果蝇体内 MMP1 和 MMP2 以相互抑制的方式调控 NMJ 的发育和功能，两者都可通过限制 Wnt 信号来调控突触的发生，在突变体中过表达 Wnt 信号共受体 Dlp (Dally-like protein) 能够阻止突触形成缺陷的发生，而当 MMP1 和 MMP2 双敲除时反而能够恢复正常 NMJ 发育和功能，进一步证实了 MMP1 和 MMP2 可通过相互抑制的方式调控果蝇 NMJ 的形成。

2.4 泛素化信号及其他

果蝇 NMJ 发育受到 E3 泛素连接酶 APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) 和 *highwire* 的调控。其中 APC/C 不仅能够调控突触前突触扣结 (synaptic bouton) 尺寸，同时还能通过调控突触后膜骨骼肌表面谷氨酸受体的聚集影响突触传递，而 *highwire* 也是调节果蝇 NMJ 发育与功能的关键因素^[109-110]，提示泛素化信号通路可能在调控 NMJ 发育和功能方面发挥重要作用。最早发现泛素化信号途径参与调控脊椎动物 NMJ 发育的直接证据是 E3 泛素连接酶 PDZRN3 和 PAUL (putative ariadne-like E3 ubiquitin ligase) 能同 MuSK 胞内段相互作用，进而影响 MuSK 内吞和泛素化途径依赖的降解^[68-69]。此外，在 NMJ 突触旁雪旺氏细胞内存在一种 E3 泛素连接酶 LNX1，其在 NMJ 区域特异性高表达，并可通过调控 ErbB2 蛋白的降解影响 NRG1/ErbB2 信号通路的激活，进而特异性影响 NMJ 突触旁雪旺氏细胞的功能^[111]。NMJ 发育同时受 E3 泛素连接酶 Nedd4 调控，Nedd4 在骨骼肌和雪旺氏细胞而非运动神经元中选择性高表达，有意思的是，Nedd4 突变小鼠显示出 NMJ 突触前运动神经轴突束化的显著异常和自发微小终板电位发放频率的显著降低，提示 Nedd4 在调控运动神经元发育及其同骨骼肌细胞相互作用方面发挥重要作用，但其信号机制有待深入研究^[112]。

基于斑马鱼 NMJ 研究的结果还表明，NMJ 发育核心脚手架分子 rapsyn 蛋白的降解和功能受 E3 泛素连接酶复合体 CUL3/KEL-8 调控，哺乳动物 rapsyn 蛋白也能够被该 E3 泛素连接酶复合体同源蛋白 CUL3/KLHL8 所修饰，敲低 KLHL8 的表达能够显著降低体内 rapsyn 的泛素化修饰水平，提示在 rapsyn 蛋白的稳定性调控机制方面具有一定的进化保守性^[113]。非常有意思的是，rapsyn 蛋白 C 端具有经典的 E3 泛素连接酶 RING-H2 保守功能结构域 (C3H2C3)，脚手架蛋白 rapsyn 本身是否具有 E3 泛素连接酶活性也是一个非常值得探讨的问题。Chen 等^[114]还研究发现，泛素 C 末端水解酶 UCH-L1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1) 突变小鼠显示出典型的 NMJ 功能和结构障碍，提示其在 NMJ 结构和功能维持方面发挥重要调控作用。最新研究还表明，E3 泛素连接酶 HERC1 突变小鼠在出生 1 个月后呈现出显著的运动行为障碍，同时，伴有运动终板面积减小、神经肌肉活动效率降低和运动神经递质障碍等缺陷，提示 HERC1 在维持 NMJ 结

构和功能稳定性方面发挥重要作用。Wilson 及其团队成员近年来的研究工作表明, 去泛素化酶家族成员 USP14 (ubiquitin-specific protease 14) 也参与了 NMJ 的发育调控进程, 其作用机制可能通过调控 MLK3-MKK4-JNK 信号通路活性来实现^[115-117]。综上, 泛素化信号通路可能主要通过调控 NMJ 特异性关键蛋白的稳定性或相关信号通路功能活性介导对 NMJ 发育及其结构和功能的调控。

此外, 部分 miRNA 也参与了 NMJ 发育、结构与功能维持及神经肌肉系统疾病的发生。Lu 等^[118]发现, miR-8 可通过调控细胞黏附分子 CAMs (cell adhesion molecules) 的表达影响多个发育阶段 NMJ 突触前后膜特化。同年, Valdez 等^[119]利用骨骼肌特异性基因敲除策略系统研究了 miR-206、miR-133b 和 Dicer 突变小鼠 NMJ 发育与去神经支配后再生表型, 认为 miR-206 而非 miR-133b 在调节失神经支配后 NMJ 再生修复方面发挥促进作用。2015 年, Amin 等^[120]研究发现, miR-218 在发育与成熟的运动神经元中特异性高表达, miR-218 突变小鼠出生后即刻死亡并伴有严重的神经肌肉系统功能障碍, 突变小鼠还呈现出运动神经元兴奋性过度激活和数目显著减少的特征, 该表型同临床上包括脊髓侧索硬化症 (ALS) 和脊髓型肌肉萎缩 (SMA) 等在内的多种运动神经元退行性病变极为类似, 提示 miR-218 参与调控的靶基因可能在运动神经元退行性病变发生方面发挥关键作用。此外, 有关线虫 NMJ 的研究结果还表明, 肌肉特异性 miR-1 可能通过调控 nAChR 受体和转录因子 MEF2 表达分别发挥顺向与逆向信号调节作用^[121]。

3 NMJ突触前膜分化: 运动神经末梢特化与成熟

NMJ 发育过程中另一标志性事件是突触前运动神经末梢的分化与成熟, 该过程不仅依赖于骨骼肌来源“逆向”信号分子的调控作用, 神经末梢雪旺氏细胞同样发挥重要功能。较之于运动神经来源“顺向”信号研究, 目前对“逆向”信号分子理解较为有限。下面将主要回顾总结调控 NMJ 突触前分化的骨骼肌来源“逆向”信号分子, 有关胶质细胞的调控作用将在本文后半部分另行讨论。

3.1 β -catenin与TGF β

Luo 等^[62]早期关于 Wnt 信号下游脚手架蛋白 Dvl 的功能研究发现, 骨骼肌中 Dvl 突变不仅能够减少 AChR 聚集簇形成, 还能够降低共培养体系中

突触前运动神经末梢自发突触电流的释放频率, 提示骨骼肌 Dvl 下游未知“逆向”信号分子可能参与了 NMJ 突触前的发育调控; 但 Dvl1 突变小鼠并未表现出显著的 NMJ 发育缺陷表型, 可能与体内还存在另外两种 Dvl2 和 Dvl3 同源异构体有关^[74]。为克服这一问题, Li 等^[72]围绕 Dvl 下游关键信号分子 β -catenin 展开了深入探讨, 通过采用条件性敲除策略分别在骨骼肌和运动神经元中特异性敲除了 β -catenin 分子, 结果表明, 骨骼肌特异性敲除 β -catenin 可导致小鼠出生后即刻死亡, 并伴有严重的 NMJ 发育和功能缺陷, 表现为运动神经轴突的束化与功能异常、膈神经自发发电频率显著降低等。而当运动神经元特异性敲除 β -catenin 后, 突变小鼠 NMJ 形态和功能不受影响。该结果首次在遗传学水平证实 β -catenin 直接参与了 NMJ “逆向”信号通路的调控。后续, 本实验室通过功能“增益” (gain-of-function) 和功能“挽救”实验分别对骨骼肌 β -catenin “逆向”调控运动神经元的信号机制进行了深入探讨^[73,122], 首次证实了 β -catenin 的转录激活功能而非其细胞黏附信号在“逆向”调控运动神经元分化成熟过程中发挥关键作用, 且轴突导向分子 Slit2 可作为受 β -catenin 靶向调控的下游分子特异性调控突触形成和神经递质释放, 而骨骼肌 β -catenin 突变小鼠神经轴突束化异常不能为 Slit2 转基因小鼠所“挽救”, 提示 β -catenin 下游还存在其他一些靶分子与 Slit2 共同参与了对突触前运动神经元的“逆向”调控^[122]。下一步, 如何发掘并验证更多受 β -catenin 调控的 NMJ “逆向”信号分子应该是本领域值得关注的方向。

除 Wnt/ β -catenin 信号外, 大量文献证实, TGF- β 信号通路在果蝇 NMJ 发育过程中发挥重要调控作用。围绕果蝇 NMJ 发育信号机制方面的研究表明, 当 TGF- β 信号配体 Gbb (Glass bottom boat)、I 型受体 Tkv (Thickveins) 和 Sax (Saxophone)、II 型受体 Wit (Wishful thinking) 或其下游 Smad 转录因子发生突变时, 均可导致显著的 NMJ 突触前缺陷表型, 包括 NMJ 数目的降低、突触前 T-bars 结构的异常和神经递质释放障碍等^[123-126]。值得一提的是, 较之突触前膜的发育缺陷表型而言, Wit 突变果蝇 NMJ 突触后膜蛋白 Dlg (Discs large) 和谷氨酸受体 GluRs 的表达和功能并不受影响, 且其 NMJ 突触前膜的缺陷表型可被运动神经元特异性 Wit 转基因所“挽救”^[127]。相关研究表明, Gbb 可作为肌肉来源“逆向”信号分子特异性调控突触前运动神经末梢的终

末分化和功能，尽管也有文章证实 Gbb 及 I 型受体 Tkv 介导的 TGF- β 信号在调控果蝇 NMJ 突触后膜发育方面亦发挥重要调节作用^[128]。较之于果蝇 TGF- β 信号，小鼠体内存在 3 种形式的 TGF- β 配体成员：TGF- β 、BMPs (bone morphogenetic proteins) 和 activins，这 3 种蛋白在运动神经元、骨骼肌和雪旺氏细胞中均广泛表达，并通过激活 I 型和 II 型 TGF- β 受体 (TbRI 和 TbRII) 调控其下游 Smad 依赖性和 Smad 非依赖性信号通路发挥功能^[129]。与果蝇 TGF- β 信号不同，迄今为止，尚无遗传学证据表明，小鼠体内 TGF- β 可作为“逆向”信号分子参与调控 NMJ 的形成，反而更多线索指向其可能主要是通过影响雪旺氏细胞的存活和凋亡间接调控 NMJ 发育^[130-131]。关于哺乳动物体内 TGF- β 信号调控 NMJ 发育的研究进展，将主要在本文后半部分对雪旺氏细胞进行综述时介绍。

3.2 FGFs、laminin 和 collagen

Umehori 等^[132]通过采用体外培养运动神经元观察神经末梢突触囊泡聚集的方法，发现小鼠脑组织来源 FGF22 可作为靶向来源信号分子促进轴突末梢分化和突触囊泡聚集，FGF7 和 FGF10 与 FGF22 具有类似的功能活性。Fox 等^[101]进一步通过基因敲除手段系统研究了 FGF 受体 FGFR2、laminin β 2 和胶原蛋白 collagen IV 突变小鼠的 NMJ 缺陷表型，发现 FGFR2/laminin β 2 双突变小鼠显示出更为严重的 NMJ 突触前发育缺陷，证实了骨骼肌来源多种“逆向”信号分子可相互协同共同调控 NMJ 突触前膜特化结构的形成、成熟和功能维持^[101]。此外，Nishimune 等^[133]还发现，运动神经末梢电压依赖钙离子通道 (VGCC) 可以作为 laminin β 2 受体发挥调节作用。在 NMJ 发育的早期和后期，运动神经末梢可分别表达 N-型和 P/Q 型 VGCC 离子通道，N-型 VGCC 突变小鼠 NMJ 突触前膜展现出同 laminin β 2 突变小鼠相似的表型，即突触前神经末梢“活跃区”数目减少^[88,133]；而 N-型和 P/Q 型 VGCC 双突变小鼠则呈现出包括 Bassoon、Piccolo 和 CAST/Erc2 等在内的多种突触“活跃区”蛋白表达降低的改变，提示可能存在一种“laminin β 2-钙通道-突触活跃区脚手架蛋白”复合体参与调控 NMJ 突触前膜的分化和成熟。

前文提到，collagen IV (α 3~ α 6) 在出生 3 周后的成熟 NMJ 部位才开始表达，且出生 2 月后的突变小鼠 NMJ 除发生 AChR 聚集簇碎片化外，还呈现典型的神经末梢结构异常改变，提示 collagen IV

(α 3~ α 6) 除可调节突触后膜 AChR 聚集簇的稳定外，还可作为“逆向”信号分子调控运动神经末梢的结构与功能，但其作用的分子机制仍有待探讨^[101]。最新研究还发现，另一种新型胶原蛋白 CLAC-P/collagen XXV 在调控早期运动神经轴突在肌肉纤维中的投射方面发挥重要作用。Col25a1 突变小鼠出生后由于呼吸衰竭导致即刻死亡，进一步分析发现其原因是由于运动神经不能正确靶向支配骨骼肌导致运动神经元的大量凋亡所致，敲除 Bax 能够显著减少 Col25a1 缺失导致的运动神经元凋亡的发生，表明 CLAC-P/collagen XXV 是参与维持运动神经元存活与 NMJ 早期发育的充要条件^[134]。

3.3 β 1 integrin

如前所述，细胞外基质蛋白 laminin β 2 能够同神经末梢的 P/Q 型钙离子通道受体相互作用。此外，laminin β 2 还能够在缺乏 agrin 存在的情况下，通过激活 ECM 受体 β 1 integrin 增加骨骼肌表面 AChR 聚集簇形成，提示其可能参与胚胎发育早期“初始”AChR 聚集簇“预排”发生的调控过程。不过骨骼肌特异性 β 1 integrin 敲除小鼠胚胎发育早期骨骼肌“初始”AChR 聚集簇“预排”并不受影响，且 β 1 integrin 敲除肌肉细胞同野生型肌细胞相比对 agrin 的反应性并无显著性差别^[135]，说明 laminin β 2/ β 1 integrin 信号对突触后膜 AChR 聚集簇“预排”的发生是非必要条件。有意思的是，虽然骨骼肌特异性 β 1 integrin 突变小鼠的 NMJ 突触后膜 AChR 聚集未受显著影响，其出生后却即刻死亡，提示其 NMJ 功能可能存在严重缺陷。进一步研究发现，突变小鼠突触前运动神经末梢不能够正确支配在骨骼肌中央区域，呈现过度投射生长的表型，而运动神经元特异性敲除 β 1 integrin 并不影响 NMJ 发育和功能^[135]。该研究首次在遗传学水平证实骨骼肌源性 β 1 integrin 及其下游信号分子可作为“逆向”信号参与调控运动神经轴突的发育和成熟，该过程是否依赖于 laminin β 2 尚有待于进一步深入研究。Lluri 等^[136]研究发现，TIMP-2 敲除小鼠出现显著的肌力下降，且以快肌类型纤维为主；他们还发现 TIMP-2 敲除小鼠肌肉组织中 β 1 integrin 表达水平显著下降，同时伴有运动神经轴突过度生长和突触消减障碍的表型，这与骨骼肌特异性 β 1 integrin 敲除小鼠具有一定的相似性，再次验证了 β 1 integrin 可作为“逆向”信号分子参与调控突触前运动神经元的发育和成熟。

3.4 GDNF 和 BDNF

体内骨骼肌可表达并分泌一定浓度的胶质细胞

源性神经营养因子 (GDNF) 用于调节 NMJ 的发育与成熟。当在肌肉中过表达 GDNF 时, 可导致 NMJ 在骨骼肌表面过度支配和突触消减 (synaptic elimination) 障碍, 同时出现典型的震颤样症状^[137]; 当在运动神经元中特异性敲除 GDNF 受体 Ret 时, 可导致运动神经末梢分化成熟障碍和运动终板数量减少^[138], 提示骨骼肌来源 GDNF 在“逆向”调控 NMJ 突触前运动神经元分化成熟和功能维持方面可能发挥重要作用。同 GDNF 相似, 在新生小鼠骨骼肌中过表达外源性脑源性神经营养因子 (BDNF) 前体 proBDNF 时能够加速 NMJ 突触消减, 而过表达成熟亚型 mBDNF 能够延缓 NMJ 突触消减进程。激活 proBDNF 受体 proBDNF-p75 (NTR) 能加速 NMJ 突触消减, 而抑制 p75 (NTR) 受体功能活性能够延缓突触消减速度^[139-140], 表明骨骼肌来源 proBDNF 和 mBDNF 可能在“逆向”调控 NMJ 突触前运动神经末梢分化过程中发挥完全相反的作用。

在运动神经元与骨骼肌细胞共培养体系中加入 GDNF 能够增加骨骼肌表面 AChR 水平而不影响其合成^[141]。与之相反的是, 在培养的骨骼肌细胞中加入 BDNF 能够抑制 agrin 诱导 AChR 聚集簇的形成和维持^[142-143]。此外, BDNF 及其他神经营养因子家族成员, 如 NT3 等, 还能分别通过雪旺氏细胞表面的 ATP 受体 P2YR 和 mAChR 调节胶质细胞的功能活性, 影响胶质细胞与运动神经元之间的相互作用^[144]。研究发现, 神经营养因子除可作为“逆向”信号分子参与突触前运动神经元分化和突触消减调控之外, 还能调控突触后 AChR 聚集簇形成和雪旺氏细胞的功能活性, 提示神经营养因子家族成员可能在 NMJ 发育过程中多个环节发挥功能。

4 雪旺氏细胞在 NMJ 发育和成熟中的作用

较之于运动神经元与骨骼肌细胞相互作用的深入研究而言, 目前有关雪旺氏细胞调控 NMJ 发育与成熟的研究较为有限。如前所述, 雪旺氏细胞可通过分泌促突触形成因子调控 NMJ 的发育和成熟^[5-7], 而它们本身的分化与成熟也受到突触前和突触后来源信号分子的调控^[8-10], 如 NRG1、ErbB2 和 ErbB3 突变小鼠会导致雪旺氏细胞形成障碍, 进而引起运动神经末梢从其支配的骨骼肌表面回缩和运动神经元死亡^[9,83]。

目前认为, 运动神经轴突末梢雪旺氏细胞在 NMJ 发育早期对于运动神经轴突导向和 NMJ 初始形成的作用可能比较有限, 但其在促进 NMJ 生长、

突触重塑与功能维持方面可能发挥重要功能^[1,145]。Brill 等^[146]通过建立单个雪旺氏细胞毁损方法, 分别观察了发育过程中和成熟后 NMJ 突触旁雪旺氏细胞的空间动力学变化规律, 证明 NMJ 轴突末梢雪旺氏细胞可能通过相邻胶质细胞之间或胶质与运动神经轴突之间的空间竞争参与了 NMJ 突触结构的重塑。雪旺氏细胞参与 NMJ 突触后膜 AChR 聚集簇结构重塑可能与提高 ECM 蛋白 MMP3 的活性有关, MMP3 可通过清除 agrin 达到消除不稳定 AChR 聚集簇的效果^[147-149]。Smith 等^[147]认为在突触消减过程中, 雪旺氏细胞起初对神经轴突末梢的清除可能并无明确选择性, 而是随机进行清除, 最终留下唯一的轴突进行支配。而 Darabid 等^[150]通过采用双光子钙成像结合电生理记录技术系统分析了单个雪旺氏细胞对其相互作用神经末梢的破译功能, 发现雪旺氏细胞对神经末梢的调控作用主要取决于其功能特性, 而该功能特性能够在雪旺氏细胞表面诱导特异性受体, 如 ATP 受体 P2YR 或 mAChR 的表达, 这些受体能够对神经末梢分泌的神经递质 AChR 或 ATP 产生响应, 影响雪旺氏细胞同运动神经末梢间的相互作用, 进而改变运动神经末梢的竞争性修剪及支配。上述研究为理解 NMJ 超微结构的精密组装提供了重要信息和线索, 进一步证明 NMJ 结构的形成依赖于神经轴突多个末梢间的竞争、突触后膜特化及其与雪旺氏细胞之间的相互作用。2014 年, Roche 等^[151]研究还发现, 雪旺氏细胞可分泌一种 Nfasc155 (Neurofascin155) 蛋白, 并通过该蛋白调控 NMJ 的突触“消减”, Nfasc155 突变小鼠 NMJ 呈现出突触消减延迟和突触后膜发育迟缓的缺陷表型。如何鉴定出更多的雪旺氏细胞特异性调控 NMJ 发育的关键蛋白, 以及明确其表面相关特异性受体在 NMJ 突触修剪和可塑性变化中的分布和作用特征, 有望成为未来本研究领域的两大热点方向。

需强调, 虽然运动神经元、骨骼肌和雪旺氏细胞均能表达 TGF- β , 事实上 NMJ 部位 TGF- β 主要来源是雪旺氏细胞。当在体外共培养运动神经元和骨骼肌细胞体系内加入雪旺氏细胞条件培养基或 TGF- β 1 时, 能够显著促进骨骼肌细胞表面 AChR 聚集簇形成的数目、大小以及突触样特化结构形成, 而免疫清除 TGF- β 1 能阻断该生物学效应^[7], 提示雪旺氏细胞可通过分泌 TGF- β 1 间接调控 NMJ 突触后膜 AChR 聚集簇的形成。进一步研究表明, TGF- β 1 促突触形成作用可能是通过上调运动神经

末梢 agrin 表达来实现的^[7]。此外，除了前文提到的骨骼肌来源 GDNF 可作为“逆向”信号分子发挥调控作用之外，突触旁雪旺氏胶质细胞也可分泌 GDNF，但与骨骼肌来源 GDNF 可发挥“逆向”信号调节作用不同，雪旺氏细胞源性 GDNF 在 NMJ 发育过程中的功能仍不甚明了，尚有待进一步深入探讨^[137]。

5 NMJ突触发育功能异常与神经肌肉系统疾病

先天性肌无力综合征 (congenital myasthenic syndrome, CMS) 是 NMJ 相关的一种常见遗传性疾病，可由多种 NMJ 发育和功能调控基因突变引起^[152]。这些致病突变包括 Agrin-LRP4-MuSK-Dok7-rapsyn-AChR 信号通路相关若干关键信号分子如 agrin、LRP4、MuSK 或 MuSK 相关结合蛋白的突变^[153-157]，脚手架蛋白 rapsyn 和 AChR 编码基因的突变^[158-160]，Dok7 部分位点的突变^[161-162]，突触前运动神经元内乙酰胆碱转移酶 ChAT 的突变^[163]等，都会导致临床上各种类型 CMS 症状的发生。此外，人体内钠离子通道 Nav1.4 突变^[164-165]、ColQ 突变^[166-167]或 laminin $\beta 2$ 编码基因 *LAMB2* 突变^[168]等均可导致典型的 CMS 发生。骨骼肌表面 α -dystroglycan 糖基化修饰酶 POMT1 和 POMT2 的突变也会引起严重的 CMS 发生^[96-97]，进一步佐证了 dystroglycan 蛋白糖基化修饰对于维持其正常生理功能至关重要^[169]。此外，细胞外基质蛋白多糖 perlecan 突变也会引起典型的外周神经肌肉系统退行性病^[170]。

另一种 NMJ 相关神经肌肉系统功能障碍可由自身免疫性疾病引起，如重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 和 Eaton-Lambert 肌无力综合征等。当采用实验性自身免疫性重症肌无力小鼠模型 (EAMG) 产生针对 LRP4 的自身抗体时，能够诱导显著的重症肌无力样病理学改变，进一步证明了 LRP4 不仅对维持 NMJ 正常的功能至关重要，而且可能是临床上部分重症肌无力患者潜在致病原因之一^[171]。目前，已有越来越多研究证实并支持该观点，即除了过去常见的针对 AChR 和 MuSK 的自身抗体可诱发 MG 之外，针对 LRP4 或 agrin 的自身抗体也可能导致临床上 MG 的发生^[156,172-174]。抗 ColQ 和 MuSK 自身抗体可通过竞争性抑制 agrin/LRP4/MuSK 信号通路诱发肌无力症状^[175]。Eaton-Lambert 肌无力综合征是另一种自身免疫性 NMJ 疾病，患者体内存在针对运动神经末梢 VGCC 钙离子通道的自身抗体，推测其致病原因可能是该抗体阻断了 laminin

$\beta 2$ 同 VGCC 钙离子通道之间的相互作用，进而影响了突触前运动神经末梢的功能^[153]。

除上述两种常见类型的神经肌肉系统疾病外，NMJ 相关神经肌肉系统疾病还包括脊髓性肌萎缩 (SMA) 和脊髓侧索硬化症 (ALS) 等。目前已有大量关于这两种疾病的发病机制、治疗进展等方面的文献或综述，在此不再多做赘述。

6 总结与展望

NMJ 作为一种经典化学突触，对其进行结构、功能和信号机制方面的研究由来已久。有关 NMJ 突触发育信号机制的研究，为理解中枢神经系统突触形成过程和基本工作原理提供了一个研究范式。随着双光子活体成像技术、新型基因编辑技术、光遗传学和化学遗传学等技术的不断发展和完善，未来基于这些新型研究手段将会更加深入地揭示 NMJ 发育调控及 NMJ 相关神经肌肉系统疾病的致病机理，有望为临床上周围神经损伤修复及多种神经肌肉系统疾病诊治提供全新视角和思路。

[参 考 文 献]

- [1] Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*, 1999, 22: 389-442
- [2] Colquhoun D, Sakmann B. From muscle endplate to brain synapses: a short history of synapses and agonist-activated ion channels. *Neuron*, 1998, 20: 381-7
- [3] Wu H, Xiong WC, Mei L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*, 2010, 137: 1017-33
- [4] Sanes JR, Lichtman JW. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2: 791-805
- [5] Koirala S, Reddy LV, Ko CP. Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. *J Neurocytol*, 2003, 32: 987-1002
- [6] Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, et al. Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction *in vivo*. *Neuron*, 2003, 40: 563-80
- [7] Feng Z, Ko CP. Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor- $\beta 1$. *J Neurosci*, 2008, 28: 9599-609
- [8] Escher P, Lacazette E, Courtet M, et al. Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors. *Science*, 2005, 308: 1920-3
- [9] Lin W, Sanchez HB, Deerinck T, et al. Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1299-304
- [10] Patton BL, Chiu AY, Sanes JR. Synaptic laminin prevents

- glial entry into the synaptic cleft. *Nature*, 1998, 393: 698-701
- [11] Landmesser L. The distribution of motoneurons supplying chick hind limb muscles. *J Physiol*, 1978, 284: 371-89
- [12] Landmesser LT. The acquisition of motoneuron subtype identity and motor circuit formation. *Int J Dev Neurosci*, 2001, 19: 175-82
- [13] Jessell TM. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*, 2000, 1: 20-9
- [14] Lance-Jones C. Motoneuron axon guidance: development of specific projections to two muscles in the embryonic chick limb. *Brain Behav Evol*, 1988, 31: 209-17
- [15] Bonanomi D, Pfaff SL. Motor axon pathfinding. *CSH Perspect Biol*, 2010, 2: a001735
- [16] Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science*, 1996, 274: 1123-33
- [17] Hanson MG, Landmesser LT. Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron*, 2004, 43: 687-701
- [18] Bevan S, Steinbach JH. The distribution of α -bungarotoxin binding sites of mammalian skeletal muscle developing *in vivo*. *J Physiol*, 1977, 267: 195-213
- [19] Braithwaite AW, Harris AJ. Neural influence on acetylcholine receptor clusters in embryonic development of skeletal muscles. *Nature*, 1979, 279: 549-51
- [20] Creazzo TL, Sohal GS. Neural control of embryonic acetylcholine receptor and skeletal muscle. *Cell Tissue Res*, 1983, 228: 1-12
- [21] Ziskind-Conhaim L, Bennett JI. The effects of electrical inactivity and denervation on the distribution of acetylcholine receptors in developing rat muscle. *Dev Biol*, 1982, 90: 185-97
- [22] Anderson MJ, Cohen MW. Nerve-induced and spontaneous redistribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. *J Physiol*, 1977, 268: 757-73
- [23] Lin W, Burgess RW, Dominguez B, et al. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature*, 2001, 410: 1057-64
- [24] Yang X, Arber S, William C, et al. Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron*, 2001, 30: 399-410.
- [25] Yang X, Li W, Prescott ED, et al. DNA topoisomerase II β and neural development. *Science*, 2000, 287: 131-4
- [26] Kummer TT, Misgeld T, Sanes JR. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Curr Opin Neurobiol*, 2006, 16: 74-82
- [27] Vock VM, Ponomareva ON, Rimer M. Evidence for muscle-dependent neuromuscular synaptic site determination in mammals. *J Neurosci*, 2008, 28: 3123-30
- [28] Lin S, Landmann L, Rugg MA, et al. The role of nerve-versus muscle-derived factors in mammalian neuromuscular junction formation. *J Neurosci*, 2008, 28: 3333-40
- [29] Liu Y, Padgett D, Takahashi M, et al. Essential roles of the acetylcholine receptor γ -subunit in neuromuscular synaptic patterning. *Development*, 2008, 135: 1957-67
- [30] Jing L, Lefebvre JL, Gordon LR, et al. Wnt signals organize synaptic prepattern and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor. *Neuron*, 2009, 61: 721-33
- [31] Flanagan-Steet H, Fox MA, Meyer D, et al. Neuromuscular synapses can form *in vivo* by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development*, 2005, 132: 4471-81
- [32] Panzer JA, Gibbs SM, Dosch R, et al. Neuromuscular synaptogenesis in wild-type and mutant zebrafish. *Dev Biol*, 2005, 285: 340-57
- [33] Kim N, Burden SJ. MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nat Neurosci*, 2008, 11: 19-27
- [34] McMahan UJ. The agrin hypothesis. *CSH Symp Quant Biol*, 1990, 55: 407-18
- [35] Jones G, Meier T, Lichtsteiner M, et al. Induction by agrin of ectopic and functional postsynaptic-like membrane in innervated muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2654-9
- [36] Bezakova G, Helm JP, Francolini M, et al. Effects of purified recombinant neural and muscle agrin on skeletal muscle fibers *in vivo*. *J Cell Biol*, 2001, 153: 1441-52
- [37] Herbst R, Burden SJ. The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling. *EMBO J*, 2000, 19: 67-77
- [38] Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, et al. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*, 1996, 85: 525-35
- [39] Gesemann M, Denzer AJ, Rugg MA. Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J Cell Biol*, 1995, 128: 625-36
- [40] Reist NE, Werle MJ, McMahan UJ. Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron*, 1992, 8: 865-8
- [41] Lin W, Dominguez B, Yang J, et al. Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron*, 2005, 46: 569-79
- [42] Misgeld T, Kummer TT, Lichtman JW, et al. Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11088-93
- [43] Fu AK, Ip FC, Fu WY, et al. Aberrant motor axon projection, acetylcholine receptor clustering, and neurotransmission in cyclin-dependent kinase 5 null mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 15224-9
- [44] Chen F, Qian L, Yang ZH, et al. Rapsyn interaction with calpain stabilizes AChR clusters at the neuromuscular junction. *Neuron*, 2007, 55: 247-60
- [45] Jennings CG, Dyer SM, Burden SJ. Muscle-specific trk-related receptor with a kringle domain defines a distinct class of receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 2895-99
- [46] Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, et al. Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage:

- expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*, 1995, 15: 573-84
- [47] DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, et al. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation *in vivo*. *Cell*, 1996, 85: 501-12
- [48] Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, et al. Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell*, 1996, 85: 513-23
- [49] Weatherbee SD, Anderson KV, Niswander LA. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development*, 2006, 133: 4993-5000
- [50] Zhang B, Luo S, Wang Q, et al. LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron*, 2008, 60: 285-97
- [51] Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, et al. Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*, 2008, 135: 334-42
- [52] Zong Y, Zhang B, Gu S, et al. Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling. *Genes Dev*, 2012, 26: 247-58
- [53] Wu H, Lu Y, Shen C, et al. Distinct roles of muscle and motoneuron LRP4 in neuromuscular junction formation. *Neuron*, 2012, 75: 94-107
- [54] Yumoto N, Kim N, Burden SJ. Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature*, 2012, 489: 438-42
- [55] Choi HY, Liu Y, Tennert C, et al. APP interacts with LRP4 and agrin to coordinate the development of the neuromuscular junction in mice. *Elife*, 2013, 2: e00220
- [56] Barik A, Lu Y, Sathyamurthy A, et al. LRP4 is critical for neuromuscular junction maintenance. *J Neurosci*, 2014, 34: 13892-905
- [57] Okada K, Inoue A, Okada M, et al. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*, 2006, 312: 1802-5
- [58] Hallock PT, Xu CF, Park TJ, et al. Dok-7 regulates neuromuscular synapse formation by recruiting Crk and Crk-L. *Genes Dev*, 2010, 24: 2451-61
- [59] Linnoila J, Wang Y, Yao Y, et al. A mammalian homolog of *Drosophila* tumorous imaginal discs, Tid1, mediates agrin signaling at the neuromuscular junction. *Neuron*, 2008, 60: 625-41
- [60] Zhu D, Yang Z, Luo Z, et al. Muscle-specific receptor tyrosine kinase endocytosis in acetylcholine receptor clustering in response to agrin. *J Neurosci*, 2008, 28: 1688-96
- [61] Finn AJ, Feng G, Pendergast AM. Postsynaptic requirement for Abl kinases in assembly of the neuromuscular junction. *Nat Neurosci*, 2003, 6: 717-23
- [62] Luo Z, Wang Q, Zhou J, et al. Regulation of AChR clustering by dshevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron*, 2002, 35: 489-505
- [63] Luo ZG, Je HS, Wang Q, et al. Implication of geranylgeranyltransferase I in synapse formation. *Neuron*, 2003, 40: 703-17
- [64] Strochlic L, Cartaud A, Labas V, et al. MAGI-1c: a synaptic MAGUK interacting with muSK at the vertebrate neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 2001, 153: 1127-32
- [65] Strochlic L, Cartaud A, Mejat A, et al. 14-3-3 γ associates with muscle specific kinase and regulates synaptic gene transcription at vertebrate neuromuscular synapse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 18189-94
- [66] Apel ED, Lewis RM, Grady RM, et al. Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem*, 2000, 275: 31986-95
- [67] Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses*, 2007, 69: 310-21
- [68] Bromann PA, Weiner JA, Apel ED, et al. A putative ariadne-like E3 ubiquitin ligase (PAUL) that interacts with the muscle-specific kinase (MuSK). *Gene Expr Patterns*, 2004, 4: 77-84
- [69] Lu Z, Je HS, Young P, et al. Regulation of synaptic growth and maturation by a synapse-associated E3 ubiquitin ligase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 2007, 177: 1077-89
- [70] Punga AR, Maj M, Lin S, et al. MuSK levels differ between adult skeletal muscles and influence postsynaptic plasticity. *Eur J Neurosci*, 2011, 33: 890-8
- [71] Wang J, Jing Z, Zhang L, et al. Regulation of acetylcholine receptor clustering by the tumor suppressor APC. *Nat Neurosci*, 2003, 6: 1017-8
- [72] Li XM, Dong XP, Luo SW, et al. Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle beta-catenin. *Nat Neurosci*, 2008, 11: 262-8
- [73] Wu H, Lu Y, Barik A, et al. β -Catenin gain of function in muscles impairs neuromuscular junction formation. *Development*, 2012, 139: 2392-404
- [74] Henriquez JP, Webb A, Bence M, et al. Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 18812-7
- [75] Wang J, Ruan NJ, Qian L, et al. Wnt/ β -catenin signaling suppresses Rapsyn expression and inhibits acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction. *J Biol Chem*, 2008, 283: 21668-75
- [76] Barik A, Zhang B, Sohal GS, et al. Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction. *Dev Neurobiol* 2014, 74: 828-38
- [77] Messeant J, Dobbertin A, Girard E, et al. MuSK frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance. *J Neurosci*, 2015, 35: 4926-41
- [78] Rimer M, Cohen I, Lomo T, et al. Neuregulins and erbB receptors at neuromuscular junctions and at agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle. *Mol Cell Neurosci*, 1998, 12: 1-15.
- [79] Lemke G. Glial control of neuronal development. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 87-105
- [80] Jo SA, Zhu X, Marchionni MA, et al. Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression. *Nature*, 1995, 373: 158-61
- [81] Sandrock AW, Dryer SE, Rosen KM, et al. Maintenance

- of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction *in vivo*. *Science*, 1997, 276: 599-603
- [82] Jaworski A, Burden SJ. Neuromuscular synapse formation in mice lacking motor neuron- and skeletal muscle-derived Neuregulin-1. *J Neurosci*, 2006, 26: 655-61
- [83] Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, et al. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*, 1997, 389: 725-30
- [84] Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, et al. Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron*, 2000, 25: 79-91
- [85] Lee YI, Li Y, Mikesh M, et al. Neuregulin1 displayed on motor axons regulates terminal Schwann cell-mediated synapse elimination at developing neuromuscular junctions. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2016, 113: E479-87
- [86] Singhal N, Martin PT. Role of extracellular matrix proteins and their receptors in the development of the vertebrate neuromuscular junction. *Dev Neurobiol*, 2011, 71: 982-1005
- [87] Miner JH, Patton BL, Lentz SI, et al. The laminin α chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of $\alpha 1-5$, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel $\alpha 3$ isoform. *J Cell Biol*, 1997, 137: 685-701
- [88] Noakes PG, Gautam M, Mudd J, et al. Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin $\beta 2$. *Nature*, 1995, 374: 258-62
- [89] Smith J, Ockleford CD. Laser scanning confocal examination and comparison of nidogen (entactin) with laminin in term human amniochorion. *Placenta*, 1994, 15: 95-106
- [90] Ockleford C, Bright N, Hubbard A, et al. Microtrabeculae, macro-plaques or mini-basement membranes in human term fetal membranes? *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci*, 1993, 342: 121-36
- [91] Chandrasekharan K, Martin PT. Genetic defects in muscular dystrophy. *Methods Enzymol*, 2010, 479: 291-322
- [92] Hara Y, Balci-Hayta B, Yoshida-Moriguchi T, et al. A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *New Engl J Med*, 2011, 364: 939-46
- [93] Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, et al. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*, 2002, 418: 417-22
- [94] Barresi R, Campbell KP. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci*, 2006, 119: 199-207
- [95] Hayashi YK, Chou FL, Engvall E, et al. Mutations in the integrin $\alpha 7$ gene cause congenital myopathy. *Nat Genet*, 1998, 19: 94-7
- [96] Beltran-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A, et al. Mutations in the O-mannosyltransferase gene *POMT1* give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet*, 2002, 71: 1033-43
- [97] van Rееuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, et al. *POMT2* mutations cause α -dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*, 2005, 42: 907-12
- [98] Ervasti JM, Sonnemann KJ. Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex. *Int Rev Cytol*, 2008, 265: 191-225
- [99] Yurchenco PD, Patton BL. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des*, 2009, 15: 1277-94
- [100] Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, et al. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol*, 1990, 111: 1685-99
- [101] Fox MA, Sanes JR, Borza DB, et al. Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell*, 2007, 129: 179-93
- [102] Latvanlehto A, Fox MA, Sormunen R, et al. Muscle-derived collagen XIII regulates maturation of the skeletal neuromuscular junction. *J Neurosci*, 2010, 30: 12230-41
- [103] Rotundo RL. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Neurocytol*, 2003, 32: 743-66
- [104] Massoulié J, Millard CB. Cholinesterases and the basal lamina at vertebrate neuromuscular junctions. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9: 316-25
- [105] Sigoillot SM, Bourgeois F, Lambergeon M, et al. ColQ controls postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci*, 2010, 30: 13-23
- [106] Feng G, Krejci E, Molgo J, et al. Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol*, 1999, 144: 1349-60
- [107] Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, et al. Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 119-23
- [108] Dear ML, Dani N, Parkinson W, et al. Two classes of matrix metalloproteinases reciprocally regulate synaptogenesis. *Development*, 2016, 143: 75-87
- [109] van Roessel P, Elliott DA, Robinson IM, et al. Independent regulation of synaptic size and activity by the anaphase-promoting complex. *Cell*, 2004, 119: 707-18
- [110] Wu C, Wairkar YP, Collins CA, et al. Highwire function at the *Drosophila* neuromuscular junction: spatial, structural, and temporal requirements. *J Neurosci*, 2005, 25: 9557-66
- [111] Young P, Nie J, Wang X, et al. LNX1 is a perisynaptic Schwann cell specific E3 ubiquitin ligase that interacts with ErbB2. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 30: 238-48
- [112] Liu Y, Oppenheim RW, Sugiura Y, et al. Abnormal development of the neuromuscular junction in *Nedd4*-deficient mice. *Dev Biol*, 2009, 330: 153-66
- [113] Nam S, Min K, Hwang H, et al. Control of rapsyn stability by the CUL-3-containing E3 ligase complex. *J Biol Chem*, 2009, 284: 8195-206

- [114] Chen F, Sugiura Y, Myers KG, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 is required for maintaining the structure and function of the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 1636-41
- [115] Marshall AG, Watson JA, Hallengren JJ, et al. Genetic background alters the severity and onset of neuromuscular disease caused by the loss of ubiquitin-specific protease 14 (Usp14). *PLoS One*, 2013, 8: e84042
- [116] Vaden JH, Bhattacharyya BJ, Chen PC, et al. Ubiquitin-specific protease 14 regulates c-Jun N-terminal kinase signaling at the neuromuscular junction. *Mol Neurodegener*, 2015, 10: 3
- [117] Vaden JH, Watson JA, Howard AD, et al. Distinct effects of ubiquitin overexpression on NMJ structure and motor performance in mice expressing catalytically inactive USP14. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 11
- [118] Lu CS, Zhai B, Mauss A, et al. MicroRNA-8 promotes robust motor axon targeting by coordinate regulation of cell adhesion molecules during synapse development. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci*, 2014, 369: 1-11
- [119] Valdez G, Heyer MP, Feng G, et al. The role of muscle microRNAs in repairing the neuromuscular junction. *PLoS One*, 2014, 9: e93140
- [120] Amin ND, Bai G, Klug JR, et al. Loss of motoneuron-specific microRNA-218 causes systemic neuromuscular failure. *Science*, 2015, 350: 1525-9
- [121] Simon DJ, Madison JM, Conery AL, et al. The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. *Cell*, 2008, 133: 903-15
- [122] Wu H, Barik A, Lu Y, et al. Slit2 as a β -catenin/Ctnn1-dependent retrograde signal for presynaptic differentiation. *Elife*, 2015, 4: e07266
- [123] McCabe BD, Hom S, Aberle H, et al. Highwire regulates presynaptic BMP signaling essential for synaptic growth. *Neuron*, 2004, 41: 891-905
- [124] McCabe BD, Marques G, Haghighi AP, et al. The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron*, 2003, 39: 241-54
- [125] Rawson JM, Lee M, Kennedy EL, et al. *Drosophila* neuromuscular synapse assembly and function require the TGF- β type I receptor saxophone and the transcription factor Mad. *J Neurobiol*, 2003, 55: 134-50
- [126] Marques G, Bao H, Haerry TE, et al. The *Drosophila* BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function. *Neuron*, 2002, 33: 529-43
- [127] Aberle H, Haghighi AP, Fetter RD, et al. wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*, 2002, 33: 545-58
- [128] Dudu V, Bittig T, Entchev E, et al. Postsynaptic mad signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Curr Biol*, 2006, 16: 625-35
- [129] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 2003, 425: 577-84
- [130] Awatramani R, Shumas S, Kamholz J, et al. TGF β 1 modulates the phenotype of Schwann cells at the transcriptional level. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 19: 307-19
- [131] Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, et al. Decreased expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*, 2001, 193: 458-67
- [132] Umemori H, Linhoff MW, Ornitz DM, et al. FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. *Cell*, 2004, 118: 257-70
- [133] Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS. A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature*, 2004, 432: 580-7
- [134] Tanaka T, Wakabayashi T, Oizumi H, et al. CLAC-P/collagen type XXV is required for the intramuscular innervation of motoneurons during neuromuscular development. *J Neurosci*, 2014, 34: 1370-9
- [135] Schwander M, Shirasaki R, Pfaff SL, et al. β 1 integrins in muscle, but not in motor neurons, are required for skeletal muscle innervation. *J Neurosci*, 2004, 24: 8181-91
- [136] Lluri G, Langlois GD, McClellan B, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates neuromuscular junction development via a β 1 integrin-mediated mechanism. *J Neurobiol*, 2006, 66: 1365-77
- [137] Nguyen QT, Parsadian AS, Snider WD, et al. Hyperinnervation of neuromuscular junctions caused by GDNF overexpression in muscle. *Science*, 1998, 279: 1725-9
- [138] Baudet C, Pozas E, Adameyko I, et al. Retrograde signaling onto ret during motor nerve terminal maturation. *J Neurosci*, 2008, 28: 963-75
- [139] Je HS, Yang F, Ji Y, et al. ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions. *J Neurosci*, 2013, 33: 9957-62
- [140] Je HS, Yang F, Ji Y, et al. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 15924-9
- [141] Yang LX, Nelson PG. Glia cell line-derived neurotrophic factor regulates the distribution of acetylcholine receptors in mouse primary skeletal muscle cells. *Neuroscience*, 2004, 128: 497-509
- [142] Wells DG, McKechnie BA, Kelkar S, et al. Neurotrophins regulate agrin-induced postsynaptic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1112-7
- [143] Gonzalez M, Ruggiero FP, Chang Q, et al. Disruption of Trkb-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions. *Neuron*, 1999, 24: 567-83
- [144] Todd KJ, Auld DS, Robitaille R. Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci*, 2007, 25: 1287-96
- [145] Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6: 671-82
- [146] Brill MS, Lichtman JW, Thompson W, et al. Spatial constraints dictate glial territories at murine neuromuscular junctions. *J Cell Biol*, 2011, 195: 293-305

- [147] Smith IW, Mikesh M, Lee Y, et al. Terminal Schwann cells participate in the competition underlying neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci*, 2013, 33: 17724-36
- [148] VanSaun M, Werle MJ. Matrix metalloproteinase-3 removes agrin from synaptic basal lamina. *J Neurobiol*, 2000, 43: 140-9
- [149] Werle MJ, VanSaun M. Activity dependent removal of agrin from synaptic basal lamina by matrix metalloproteinase 3. *J Neurocytol*, 2003, 32: 905-13
- [150] Darabid H, Arbour D, Robitaille R. Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci*, 2013, 33: 1297-313
- [151] Roche SL, Sherman DL, Dissanayake K, et al. Loss of glial neurofascin155 delays developmental synapse elimination at the neuromuscular junction. *J Neurosci*, 2014, 34: 12904-18
- [152] Lorenzoni PJ, Scola RH, Kay CS, et al. Congenital myasthenic syndrome: a brief review. *Pediatr Neurol*, 2012, 46: 141-8
- [153] Farrugia ME, Vincent A. Autoimmune mediated neuromuscular junction defects. *Curr Opin Neurol*, 2010, 23: 489-95
- [154] Engel AG, Shen XM, Selcen D, et al. What have we learned from the congenital myasthenic syndromes. *J Mol Neurosci*, 2010, 40: 143-53
- [155] Huze C, Bauche S, Richard P, et al. Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet*, 2009, 85: 155-67
- [156] Shen C, Xiong WC, Mei L. LRP4 in neuromuscular junction and bone development and diseases. *Bone*, 2015, 80: 101-8
- [157] Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, et al. LRP4 third β -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Human Mol Genet*, 2014, 23: 1856-68
- [158] Natera-de Benito D, Bestue M, Vilchez JJ, et al. Long-term follow-up in patients with congenital myasthenic syndrome due to *RAPSN* mutations. *Neuromuscul Disord*, 2016, 26: 153-9
- [159] Brugnoli R, Maggi L, Canioni E, et al. Identification of previously unreported mutations in *CHRNA1*, *CHRNE* and *RAPSN* genes in three unrelated Italian patients with congenital myasthenic syndromes. *J Neurol*, 2010, 257: 1119-23
- [160] Rinz CJ, Lennon VA, James F, et al. A *CHRNE* frameshift mutation causes congenital myasthenic syndrome in young Jack Russell Terriers. *Neuromuscul Disord*, 2015, 25: 921-7
- [161] Lozowska D, Ringel SP, Winder TL, et al. Anticholinesterase therapy worsening head drop and limb weakness due to a novel *DOK7* mutation. *J Clin Neuromuscul Dis*, 2015, 17: 72-7
- [162] Tsao CY. Effective treatment with a lbuterol in *DOK7* congenital myasthenic syndrome in children. *Pediatr Neurol*, 2016, 54: 85-7
- [163] Tan JS, Ambang T, Ahmad-Annuar A, et al. Congenital myasthenic syndrome due to novel *CHAT* mutations in an ethnic kadazandusun family. *Muscle Nerve*, 2016, 53: 822-6
- [164] Habbout K, Poulin H, Rivier F, et al. A recessive *Nav1.4* mutation underlies congenital myasthenic syndrome with periodic paralysis. *Neurology*, 2016, 86: 161-9
- [165] Arnold WD, Feldman DH, Ramirez S, et al. Defective fast inactivation recovery of *Nav 1.4* in congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol*, 2015, 77: 840-50
- [166] Sigoillot SM, Bourgeois F, Karmouch J, et al. Neuromuscular junction immaturity and muscle atrophy are hallmarks of the *ColQ*-deficient mouse, a model of congenital myasthenic syndrome with acetylcholinesterase deficiency. *FASEB J*, 2016, 30, 2382-99
- [167] Abitbol M, Hitte C, Bosse P, et al. A *ColQ* missense mutation in sphynx and devon rex cats with congenital myasthenic syndrome. *PLoS One*, 2015, 10: e0137019
- [168] Maselli RA, Ng JJ, Anderson JA, et al. Mutations in *LAMB2* causing a severe form of synaptic congenital myasthenic syndrome. *J Med Genet*, 2009, 46: 203-8
- [169] Martin PT. Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. *Glycobiology*, 2003, 13: 55R-66R
- [170] Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, et al. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet*, 2002, 70: 1368-75
- [171] Shen C, Lu Y, Zhang B, et al. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis. *J Clin Invest*, 2013, 123: 5190-202
- [172] Gasperi C, Melms A, Schoser B, et al. Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis. *Neurology*, 2014, 82: 1976-83
- [173] Zhang B, Shen C, Bealmear B, et al. Autoantibodies to agrin in myasthenia gravis patients. *PLoS One*, 2014, 9: e91816
- [174] Zhang B, Tzartos JS, Belimezi M, et al. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol*, 2012, 69: 445-51
- [175] Otsuka K, Ito M, Ohkawara B, et al. Collagen Q and anti-MuSK autoantibody competitively suppress agrin/LRP4/MuSK signaling. *Sci Rep*, 2015, 5: 13928