

· 专论与综述 ·

C 族 GPCRs 的半胱氨酸富集区的研究进展及药学意义 *

阮 斌¹ 赵 菡¹ 薛 礼¹ 蒋 明¹ 黄思罗^{1△}

(1 湖北医药学院附属东风总医院, 药剂部 湖北 十堰 442008 ;

2 华中科技大学生命科学与技术学院, 分子生物物理教育部重点实验室 湖北 武汉 430074)

摘要 C 族 GPCRs 是体内重要的受体, 参与众多重要的生理和病理进程, 并具有复杂的结构和激活机制。在体内该族受体形成组成性的二聚体并具有七螺旋跨膜结构(heptahelical transmembrane domain, HD)、捕蝇草模块(venus flytrap domain, VFT)和半胱氨酸富集区(cysteine-rich domain, CRD)。本文系统介绍了近年来 CRD 单体的序列和结构解析, 以及参与受体激活过程的机制研究的历程和进展。同时也展望了这些基础研究成果对于开发新的更具有成药性的以 C 族 GPCRs 为靶点的变构剂的指导意义。

关键词 C 族 G 蛋白偶联受体; CRD; 激活机制; 构象变化

中图分类号: Q25, Q27 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)09-1755-05

Recent Research and its Pharmacologic Significance on Cysteine-Rich Domain of Class C GPCRs*

RUAN Pin¹, ZHAO Han², XUE Li², JIANG Ming², HUANG Si-Luo^{1△}

(1 Department of pharmaceuticals, Dongfeng Hospital, HuBei Medical University, Shiyan 442008, China,

2 Key Laboratory of Molecular Biophysics of Ministry of Education, School of Life Science and Technology,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

ABSTRACT: Class C GPCRs are important receptors in vivo and involved in many physiologic and pathologic process. These receptors have complex structure and active mechanism. They are constitutive dimer and each monomer is composed of transmembrane HD (heptahelical transmembrane domain), extracellular VFT (venus flytrap domain) and CRD (cysteine-rich domain) which between in VFT and CRD. Although there are many results in the activation mechanism of these receptors, but until recently the role of CRD in the activation process is largely unknown. So we reviewed the course and advance of the research in the sequence, structure, function, and their conformation change in the activation process of these receptor dimmers. And lastly we also point the significance and new insights of the Class C GPCR based-drug discovery to gain the new allosteric modulators which have better clinic implication..

Key Words: Class C GPCRs; CRD; Activation mechanism; Allosteric change

Chinese Library Classification(CLC): Q25, Q27 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1755-05

前言

G 蛋白偶联受体(G-protein coupled receptors, GPCRs)是体内最大的蛋白质超家族, 其编码序列接近总基因组的 1%^[1]。根据序列同源性及蛋白质三维结构, 可以分为 5 个亚家族。其中 C 族 GPCRs(以下简称 C 族受体)包括 B 型 γ -氨基丁酸受体(GABA-B receptor, GABABR)、代谢型谷氨酸受体(metabotropic glutamate receptors, mGluRs)、味觉受体第一家族(taste receptor family 1 member, T1R)、钙离子敏感受体(calcium sensing receptor, CaSR)和一些信息素受体^[2,3]。这些受体在体内分布广泛参与很多重要的生理进程, 如学习和记忆的发生、突触传递效率的可塑性变化、甜味和鲜味味觉的产生、钙代谢的调控等, 并与癫痫、帕金森症、亨廷顿症、药物依赖、疼痛等多种疾病的病理发生密切相关^[4,7]。因此以其为靶点的药物具有重要的临床价值和工业价值, 比如目前广泛应用于临床的以 GABABR 为靶

点的抗痉挛药巴氯酚(baclofen)^[8]和广泛使用的以 T1R 为靶点的甜味剂糖精^[9]。考虑到该族受体在生理和病理上的重要性, 其结构和功能研究一直受到广泛的关注。

不同于其他 GPCRs 的其他亚家族, C 族受体结构上最重要的特点是其组成性的二聚化。在早期的研究中, 研究者往往认为 GPCRs 以单体形式存在。1998 年研究者在整个 GPCRs 超家族中首先发现 GABABR 是由 GB1 和 GB2 两个亚基形成的异二聚体^[10], 随后其他 C 族受体也被证明为组成性二聚体, 其中 T1R 是由 T1R1/2 和 T1R3 形成的异源二聚体^[11], 而 mGluRs^[12]和 CaSR^[13]则形成同源二聚体(图 1)。C 族受体的另一个特点是具有复杂的多功能域结构, 每个单体均包括膜外的捕蝇草模块(VFT), 由 LB1 和 LB2 两个亚基组成; 跨膜的七螺旋跨膜结构(HD), 含有 7 个跨膜疏水螺旋 TM1-7 连接各个 TM 的 Loop; 膜外位于 VFT 和 HD 之间包含 9 个严格保守的 Cys 的半胱氨酸富集区(CRD); 以及胞内的 C 末端(图 1)^[2,3]。其中

* 基金项目 第 47 批中国博士后面上基金(20100471184)、国家自然科学基金面上基金(30973514, 31100548)

作者简介 阮斌(1973-), 女, 主管药师, 主要研究 C 族 G 蛋白偶联受体的药物作用分子机制。E-mail: ruanpin@126.com

△通讯作者 黄思罗 E-mail: slhuang@mail.hust.edu.cn, Tel: 027-87792031 Fax: 027-87792024

(收稿日期: 2011-06-28 接受日期: 2011-07-23)

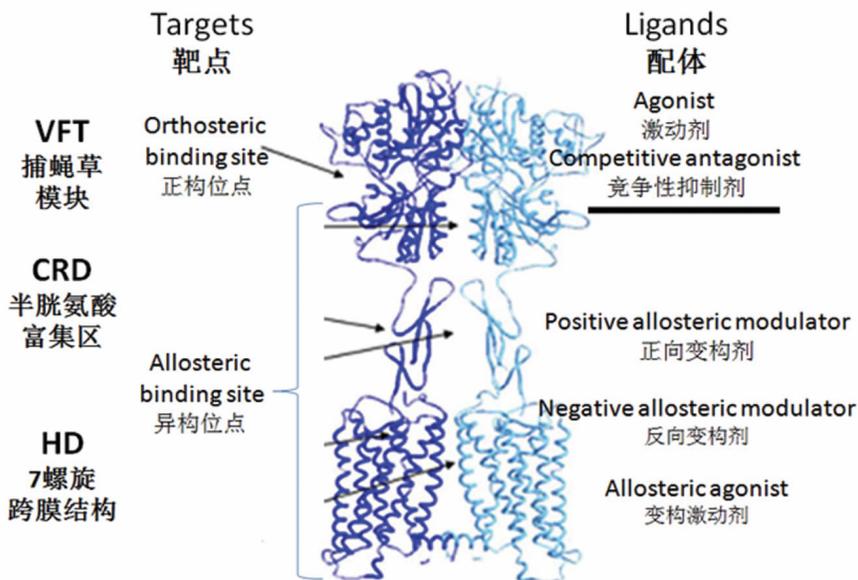


图 1 C 族受体的结构模式图和药物作用位点^[2]

Fig.1 Structure model of Class C GPCRs and the binding site of drugs^[2]

VFT 和 CRD 在其他亚家族受体中均不存在。

1 CRD 单体的序列和结构

半胱氨酸富集区在很多蛋白质中都存在，如 TNFR(tumor necrosis factor receptor, TNFR) 中具有包含 8 个保守 Cys 的膜外区^[14]。Fz 家族蛋白(frizzled family protein)具有包含 10 个保守 Cys 的膜外区^[15]。而 C 族受体的 CRD 与已知的其他蛋白质均不同源，其包含 67-70 个残基，一级序列可以用 C1-X3-C2-X11-14-C3C4-X2-C5-X2-C6-X11-14-C7-X2-C8-X12-

C9(C 下标数字为 CRD 的第几位 Cys, X 上标数字为非保守残基的数目)来表示^[16]，其中包含有 9 个严格保守的 Cys(图 2)，因此有研究者将该保守序列命名为 NCD3G (nine-cysteine domain of family 3 GPCRs)^[17]。序列同源分析表明，该序列仅存在于动物基因组(从 caenorhabditis briggsae 到 Homo sapiens)，真细菌和植物基因组均没有相匹配的序列；另一方面，NCD3G 只存在于 C 族受体，并伴随着 VFT 与 HD 功能域存在，体外实验也表明，单独表达的 CRD 不能形成正常的三维结构^[18]。

| | | | |
|---------|-------|---|---|
| hCaSR | (542) | C | |
| mPhr1 | (521) | C | |
| mPhr2 | (500) | C | |
| hmGluR1 | (524) | C | E |
| hmGluR5 | (511) | C | E |
| hmGluR2 | (500) | C | E |
| hmGluR3 | (509) | C | E |
| hmGluR4 | (520) | C | R |
| hmGluR8 | (516) | C | E |
| hmGluR7 | (523) | C | E |
| hmGluR6 | (518) | C | E |
| rTR2 | (499) | C | |
| rTR3 | (499) | C | |

图 2 部分 C 族受体的 CRD 一级结构比对图^[18]

Fig.2 Multiple sequence alignment of the CRD in the Class C GPCRs^[18]

序列上的保守性往往意味着结构保守。研究者将 CaSR 的 CRD 中的 9 个 Cys 突变成 Ser 后，突变体均不能正确表达和激活，这说明这些保守的 Cys 在维持 CRD 结构中的重要性^[19]。随之研究者进一步试图解析 CRD 单体的三维结构，其中最重要的是 CRD 内部维持结构的二硫键的分布。Yu 等利用生物信息学手段预测了 CRD 单体的空间结构(图 3A)，在该模型中，CRD 包含 4 个 β 片层，C₂-C₃、C₆-C₇、C₈-C₉ 间分别形成 3 对二硫键^[17]。其后我们发现在 C 族受体的 VFT 底部存在一个严格保守的 Cys，生化实验进一步表明，该 Cys 与 CRD 中的 C3 之间形成了二硫键^[20]。在已知的 mGluR1 的 VFT 晶体结构和上述

研究结果基础上，我们预测了 mGluR1 的 CRD 的三维模型。在该模型中，CRD 中存在 4 对功能域内的二硫键(C₁-C₄、C₂-C₅、C₆-C₇、C₈-C₉)，而 C3 则与 VFT 底部的保守残基形成功能域内的二硫键(图 3B)^[20]。

由于 CRD 的结构不能单独存在，并且 C 族受体是组成性的二聚体，这给利用 X 光衍射法解析其结构带来了很大的困难。但 Muto 等的杰出工作最后解决了这些问题，他们在体外表达了 mGluR3 膜外包含 VFT 和 CRD 的片段，晶体化后发现，mGluR3 的 CRD 由 3 个 β 片层和 2 个较短的反平行的 β 片层组成，其中二硫键的分布与我们的模型完全一致^[18](图 3C)。

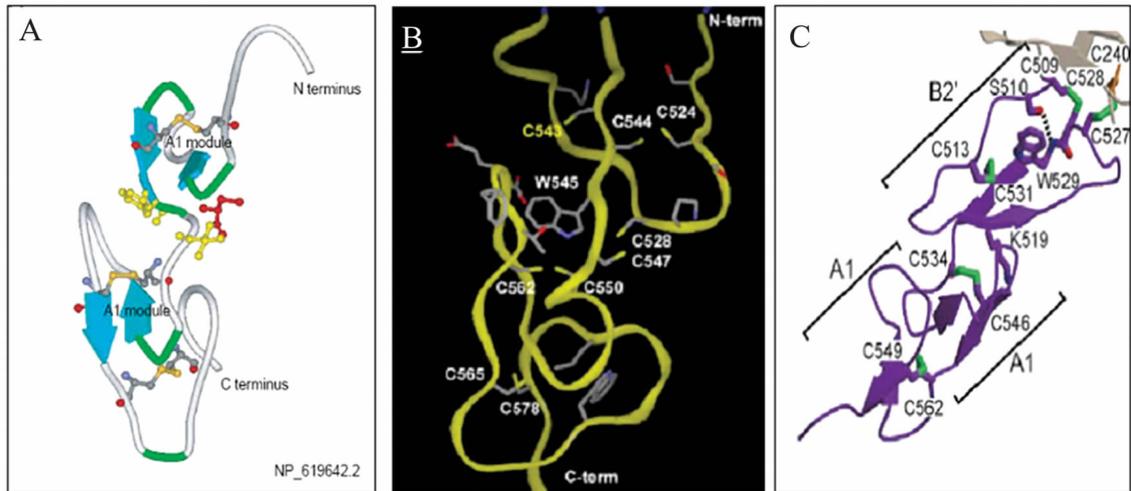


图3 CRD单体的三维结构模型。A. Liu 等的模型^[17] ;B. Rondard 等的模型^[20] ;C. Muto 等的模型^[18]

Fig.3 The 3-dimension structure model of CRD monomer. A. Liu's model^[17]; B. Rondard's model^[20]; C. Muto's model^[18]

2 C族受体CRD在激活进程中的角色

2.1 C族受体的VFT和HD具有独立的功能

研究发现,C族受体的VFT和HD都可以在单独表达时行使功能。体外表达的VFT单体可以在静息的开启(Open)和激活的关闭(Closed)构象之间保持动态平衡,激动剂和竞争性抑制剂都可以结合到VFT的中缝(图1)^[2,3,21,22]。激动剂的结合可稳定VFT的Closed构象,而竞争性抑制剂的结合则通过位阻效应阻碍了VFT的关闭,从而稳定了VFT的Open构象。

另一方面,C族受体广泛存在的不依赖于激动剂组成性活性,说明HD的激活可以不需要VFT的参与。近年来不结合于内源性配体结合的VFT中缝部位,从而被称为变构剂(allosteric modulator, AM)的药物受到了广泛的注意^[2,5,7]。这类药物可以结合到C族受体的HD或其他位点如CRD^[23]或VFT外表面^[24](图1)根据其药理学性质可以分为正向变构剂(positive allosteric modulators, PAMs)、反向变构剂(negative allosteric modulators, NAMs)、变构激动剂(allosteric agonists),其中PAMs和NAMs可以正向或反向调节受体在激动剂作用下的激活水平,而变构激动剂则可以直接激活受体^[2,4,6]。有趣的是,体内表达切除了VFT和CRD的多种C族受体剪切体如mGluR5、mGluR2、GABABR等均可以被PAMs或变构激动剂激活,其药物反应性质与激动剂结合在HD的A族G蛋白偶联受体非常接近,这些实验进一步证明了HD的激活可以不需要VFT的参与^[25]。

2.2 C族受体二聚体中VFTs和CRDs的构象变化

C族受体的多功能域结构和二聚化使其激活进程中的构象变化非常复杂。大量的实验表明,该族受体的VFTs和HDs均是以二聚体的形式参与激活进程^[18,21,22,26],在二聚体层面具有6种不同的构象,即ROO、RCO、RCC和AOO、ACO、ACC构象(其中A和R表示HDs所处的激活态和静息态,而下标的O和C表示二聚体中两个VFT单体分别所处的开启和关闭构象)。静息状态下二聚体的VFTs为两个VFT单体均处于开启状态的OO(open-open)构象,激动剂结合到二聚体中的一个或两个VFT的中缝内,导致结合了激动剂的一个或两个VFT单

体关闭,VFT单体的关闭导致单体表面残基重排,使得两个VFT单体沿中轴向内侧旋转,从而使LB2底部相互接近,形成激活的CO(closed-open)构象和CC(closed-closed)构象^[21,22];没有激动剂存在时,受体的HDs处于静息态R(rest),而配体刺激后两个HD单体内部发生结构重排同时沿着结合界面发生旋转,导致两个HD单体的i2-loop之间距离变近,i1-loop之间的距离变远,从而形成激活态A(active),而处于激活状态下的HDs偶联且只能偶联一个G蛋白从而激活下游信号通路^[26,27]。

2.3 CRDs参与VFTs和HDs的激活信号传导

鉴于C族受体的VFT和HD都具有相对独立的功能和构象变化,那么激动剂刺激下VFTs的激活信号是如何传导到HDs的呢。CRD位于VFT和HD之间,物理大小约为40,其存在完全屏蔽了两者之间的直接接触,这些都提示CRD参与了VFT和CRD之间的激活信号传导。去除了CRD的CaSR可以正常表达和上膜,但是丧失了激活能力,直接证实了上述猜想;而将mGluR₁和CaSR的CRD相互替换仍可以正常激活,说明C族受体的CRD具有类似的作用机制^[28]。

2006年我们利用生物信息学和早期的蛋白结晶研究结果分析了mGluR₁二聚体中2个VFT相互靠近后的构象变化细节,结果表明,VFT结合配体关闭后2个VFT单体的C末端之间的距离并没有太大的改变,如在R_{OO}、A_{CO}、A_{CC}构象中,两者之间的距离均为63;而LB2底部与CRD形成二硫键的Cys254之间的距离则分别为46.9、26.5、16.0。这说明VFT关闭后可以通过VFT-CRD间的二硫键导致2个CRD相互靠近^[20]。随之Muto等工作也证实了这个结论,体外表达的mGluR₃的VFT-CRD蛋白结晶结果表明,在激动剂存在的情况下,两个CRD单体之间会相互靠近(图4A)。Muto等进一步利用生物信息学手段检测了处于不同构象的二聚体中的2个Glu567(CRD的最后一位残基)间的距离,分别为104(R_{OO})、109(R_{CO})、126(R_{CC})、90(A_{OO})、57(A_{CO})、46(A_{CC})。这也提示CRDs在激动剂结合到VFTs后其底部相互靠近,从而拉动HD相互靠近激活受体^[18]。

为了在体内验证这些假设,我们在mGluR₂二聚体中可能的CRD结合界面的不同位点引入Cys,结果发现部分突变体产

生了不依赖配体的组成性活性,进一步的结构分析表明这些突变体的两个 CRD 单体间形成了新的二硫键,从而使受体锁定在激活状态。而这些突变体的组成性活性不能被结合于 VFT 的竞争性抑制剂所抑制,但是可以被结合于 HD 的 NAM 所抑制^[29]。有趣的是,所有的阳性突变体均集中于 CRD 顶部与 VFT 间形成二硫键的第 3 个保守 Cys 附近,而位于其他位置的突变体即使可以形成单体间的二硫键也不能导致组成性活性,这说明在激动剂结合后 VFTs 的构象变化可以通过功能域间的二硫键而使两个 CRD 单体的发生特定位置和方向的相互靠近和侧向旋转^[29](图 4B)。

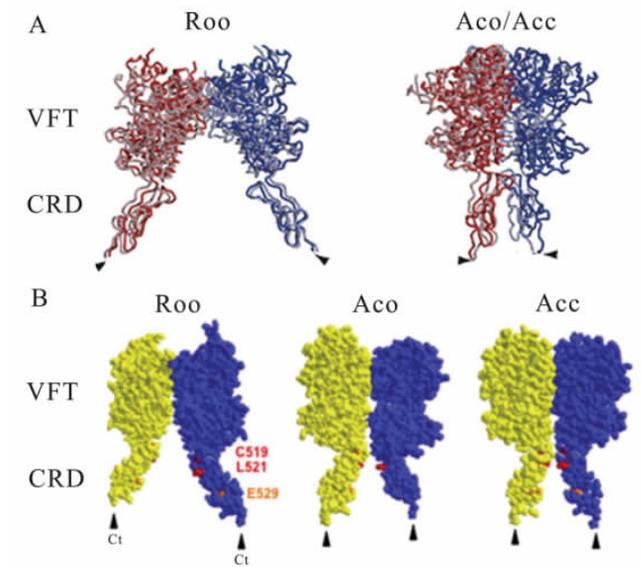


图 3 CRD 单体的三维结构模型。A. Liu 等的模型^[17]; B. Rondard 等的模型^[20]; C. Muto 等的模型^[18]

Fig.3 The 3-dimension structure model of CRD monomer. A. Liu's model^[17]; B. Rondard's model^[20]; C. Muto's model^[18]

2.4 结合于 CRD 的变构激动剂可以直接导致受体激活

组成性活性突变体的结果已经表明,在 VFT 没有结合激动剂的情况下,CRDs 的构象变化足以直接导致受体的激活。一些结合于 CRD 的变构激动剂也证实了这一点。研究者利用味觉受体的种属差异性发现,一类小分子量的糖蛋白 Brazzein 可以结合于甜味受体的在 TIR3 亚基 CRD 顶部的 Ala537 和 Phe540,从而可以激活受体^[23]。虽然目前对 Brazzein 结合到 CRD 后所诱导的构象变化并不了解,但是其结合位点同样位于 CRD 的顶部,这提示该类药物的作用机制也可能是诱导了二聚体中两个单体的 CRD 相互靠近。

3 结论和展望

C 族受体的激活机制,一直是生命科学的热点问题。但由于各种不利因素和技术手段的限制,多年来对于 CRD 参与受体激活的机制研究一直停滞不前。但最近研究者的一系列工作,很好的说明了 CRD 在 C 族受体的激活进程中所扮演的重要角色,同时也一定程度解析了二聚体激活进程中从 VFTs 到 CRDs 的激活信号传导进程中的关键构象变化和分子机制,并证明 CRD 和 VFT/HD 功能域一样,同样是以二聚体的形式来

行使功能。而下一步的研究工作,也许将集中在激活信号是如何从 CRDs 而传导到 HDs。

另一方面,由于功能上的重要性以及结构上的易操控性,使得 C 族受体在医学和药学上都具有重要的意义。而 CRD 已被证实与部分疾病的病理发生有关,如多种人的钙代谢紊乱遗传病,其发病原因均为 CaSR 的 CRD 中发生了自然突变,从而导致整个受体失活而引起病变^[30-31],而 mGluR6 在 CRD 的突变将导致夜盲症的发生^[32]。因此,对于 C 族受体的 CRD 的结构功能的研究,必将促进以相关的病理研究和药物开发。而特别需要指出的是,CRD 结合药物潜能的存在,也为开发以 C 族受体为靶点的变构剂类药物提供了新的思路。相对于结合到 VFT 中缝的正构类药物,变构剂具有用量小、特异性差、耐药性低的特点。目前的以 C 族受体为靶点的变构剂开发主要着眼于 HD,但结合于跨膜的 HD 的药物一般都为疏水性较强的分子,在体内实验中往往难以通过血脑屏障而到达作用靶点,而更重要的是,体内 C 族受体往往存在着参与重要生理功能的低强度的组成性活性,而作用于 HD 的 NAMs 在抑制激动剂依赖活性时也同样抑制了正常范围的组成性活性,从而可能产生一定的副作用^[2-4]。而 CRD 是位于膜外的功能域,在理论上其结合药物应具有良好的水溶性,同时结合于 CRD 的药物在理论上不能影响受体正常的组成性活性而避免了潜在的副作用,因此设计和筛选以 CRD 为靶点的变构剂,可能具有更好的成药性和临床前景。而根据目前基础研究的成果,C 族受体中单体内的 VFT-CRD 界面和单体间的 CRD-CRD 界面都可能成为有潜力的药物作用位点。

参考文献(References)

- [1] Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success[J]. *Embo J*, 1999, 18(7): 1723-1729
- [2] Rondard P, Goudet C, Kniazeff J, et al. The complexity of their activation mechanism opens new possibilities for the modulation of mGlu and GABAB class C G protein-coupled receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2011, 60(1): 82-92
- [3] Pin J P, Kniazeff J, Liu JF, et al. Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors [J]. *Febs J*, 2005, 272 (12): 2947-2955
- [4] Brauner-Osborne H, Wellendorph P, Jensen AA, et al. Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors[J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(1): 169-184
- [5] Heilker R, Wolff M, Tautermann CS, et al. G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach[J]. *Drug Discov Today*, 2009, 14(5-6): 231-240
- [6] Lagerstrom MC, Schioth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(4): 339-357
- [7] Park PS, Lodowski DT, Palczewski K, et al. Activation of G protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48: 107-141
- [8] Rondard P, Huang, S, Tu HJ, et al. Functioning of the dimeric GABA (B) receptor extracellular domain revealed by glycan wedge scanning [J]. *Embo J*, 2008, 27(9): 1321-1332

- [9] Galindo-Cuspinera V, Winnig M, Bufe B, et al. A TAS1R receptor-based explanation of sweet water-taste [J]. *Nature*, 2006, 441(7091): 354-357
- [10] White JH, Wise A, Main MJ, et al. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA (B) receptor [J]. *Nature*, 1998, 396(6712): 679-682
- [11] Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, et al. The receptors for mammalian sweet and umami taste[J]. *Cell*, 2003, 115(3): 255-266
- [12] Ray K and Hauschild BC. Cys-140 is critical for metabotropic glutamate receptor-1 dimerization [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (44): 34245-34251
- [13] Ray K, Hauschild BC, Steinbach PJ, et al. Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca (2+) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca (2+) receptor [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(39): 27642-27650
- [14] Naismith JH and Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family [J]. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(2): 74-79
- [15] Chen CM, Strapps W, Tomlinson A, et al. Evidence that the cysteine-rich domain of Drosophila Frizzled family receptors is dispensable for transducing Wingless [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(45): 15961-15966
- [16] Belenikin MS, Palyulin VA, Zefirov NS, et al. The modeling of the structure of the cysteine-rich domain of metabotropic glutamate receptors[J]. *Dokl Biochem Biophys*, 2004, 394: 21-25
- [17] Liu X, He Q, Studholme DJ, et al. NCD3G: a novel nine-cysteine domain in family 3 GPCRs [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29 (9): 458-461
- [18] Muto T, Tsuchiya D, Morikawa K, et al. Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(10): 3759-3564
- [19] Fan GF, Ray K, Zhao XM, et al. Mutational analysis of the cysteines in the extracellular domain of the human Ca²⁺ receptor: effects on cell surface expression, dimerization and signal transduction[J]. *FEBS Lett*, 1998, 436(3): 353-356
- [20] Rondard P, Liu JF, Huang SL, et al. Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(34): 24653-24661
- [21] Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor [J]. *Nature*, 2000, 407(6807): 971-977
- [22] Tsuchiya D, Kunishima N, Kamiya N, et al. Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd³⁺ [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(5): 2660-2665
- [23] Jiang P, Ji Q, Liu Z, et al. The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 45068-45075
- [24] Zhang F, Klebansky B, Fine RM, et al. Molecular mechanism for the umami taste synergism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(52): 20930-20934
- [25] Goudet C, Gaven F, Kniazeff J, et al. Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(1): 378-383
- [26] Tateyama M, Abe H, Nakata H, et al. Ligand-induced rearrangement of the dimeric metabotropic glutamate receptor 1alpha [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(7): 637-642
- [27] Tateyama M and Kubo Y. Dual signaling is differentially activated by different active states of the metabotropic glutamate receptor 1alpha [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(4): 1124-1128
- [28] Hu J, Hauache O, Spiegel AM, et al. Human Ca²⁺ receptor cysteine-rich domain. Analysis of function of mutant and chimeric receptors[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(21): 16382-16389
- [29] Huang, SL, Cao JH, Jiang M, et al. Interdomain movements in metabotropic glutamate receptor activation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(37):15480-15485
- [30] Pearce SH, Trump D, Wooding C, et al. Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(6): 2683-2692
- [31] Pidasheva S, Grant M, Canaff L, et al. Calcium-sensing receptor dimerizes in the endoplasmic reticulum: biochemical and biophysical characterization of CASR mutants retained intracellularly [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(14): 2200-2209
- [32] Zeitz C, Forster U, Neidhardt J, et al. Night blindness-associated mutations in the ligand-binding, cysteine-rich, and intracellular domains of the metabotropic glutamate receptor 6 abolish protein trafficking [J]. *Hum Mutat*, 2007, 28(8): 771-780