

GPCRs 组成性活性的研究进展及意义 *

Baloucounne Guillaume Antoine 肖胜杰 蒋 明 皮振钧 黄思罗[△]

(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: GPCRs 是体内最大的蛋白质亚家族, 其活性涉及体内绝大部分重要的生理和病理进程。研究表明, GPCRs 或其突变体能在无配体结合的情况下自发产生部分甚至完全活性程度的生理活性, 称之为组成性活性。据此研究者提出了 GPCRs 激活过程中存在多个中间激活态的观点, 从而丰富了配体受体相互作用的经典模型, 并使组成性活性突变体(constitutive active mutant, CAM)成为研究 GPCRs 的新方法。本文系统介绍了组成性活性的研究历程, 以及近年来利用 CAM 的方法研究 GPCRs 的结构、激活机制和活性调节的历程和进展, 和体内组成性活性突变的成因和与疾病的关系, 以及 CAM 在研究药物作用机理和新药研发中的意义。

关键词: G 蛋白偶联受体 组成性活性 组成性活性突变体 激活机制 反向激动剂

中图分类号: Q25, Q27 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2012)19-3784-05

Recent Research and its Significance of the Constitutive Activity of GPCRs

Baloucounne Guillaume Antoine, XIAO Sheng-jie, JIANG Ming, PI Zhen-jun, HUANG Si-luo[△]

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

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430074, China)

ABSTRACT: GPCRs are the largest protein subfamily in human genome, and its activity is involved in the most physiological and pathological processes in vivo. Studies have shown that, GPCRs or its mutants spontaneously exhibit partly and even full activity in the absence of ligand which named as constitutive activity. Therefore researchers proposed there exists many active states in the middle of the activation process in GPCRs to enrich the classical ligand-receptor interaction model. And constitutively active mutant (CAM) is also to be a new useful method to study GPCRs. This paper systematically describes the course and progress of CAM in recent years, included the researches of GPCRs structure, activation mechanism and activity regulation illustrated by using CAM, the researches upon the produce mechanism of CAM in vivo and its role in different disease, as well as the significance of CAM in pharmacology and new drugs development.

Key words: GPCRs; Constitutive activity; CAM; Activation mechanism; Reverse Agonist

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

Article ID: 1673-6273(2012)19-3784-05

前言

G 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptor, GPCR) 以能结合和调节 G 蛋白活性而得名, 迄今已报道了近 2000 种不同的 GPCRs, 是体内最大的蛋白质超家族, 其基因总量接近全基因组的 1%^[1]。根据序列同源性以及配体结合的位置, 可分为 5 个亚家族, 分别为: A 族 -- 类视紫红质 (rhodopsin like) 受体、B 族 -- 类分泌素 (secretin like) 受体、C 族 -- 代谢性谷氨酸和信息素 (metabotropic glutamate/ pheromone) 受体、D 族 -- 真菌信息素 (fungal pheromone) 受体和 E 族 -- cAMP 受体 (cAMP receptor)^[1,2]。

GPCRs 具有其标志性的参与 G 蛋白偶联的七螺旋跨膜结构 (heptahelical transmembrane domain, 7HD), 该结构由 7 个跨膜疏水螺旋 (TM1-7) 和连接各个螺旋的 3 个膜外 (e1/2/3-loop) 和

3 个膜内 (i1/2/3-loop) 袢环组成, GPCRs 也具有不同大小的 N 端膜外区, 其中 B 族和 C 族受体的膜外区比较复杂, 而 C 族受体的膜外区更是由高度特化的捕蝇草模块 (Venus FlyTrap Domain, VFT) 和半胱氨酸富集区 (Cysteine Rich Domain, CRD) 构成, GPCRs 还具有膜内的 C 末端, 其长度由 12 到 230 个残基不等。另一方面, GPCRs 还会发生稳定或者不稳定的二聚化和多聚化^[1-3]。

在体内几乎所有的生理进程都涉及到 GPCRs 的参与, 同时这些受体在体内也受到非常精密的调控, 其活性的增加和降低都会导致不同的疾病^[2]。另一方面, GPCRs 的配体结合部位在膜外, 外界药物很容易到达作用靶点^[2,3]。功能上的重要性和用药的方便性使其成为令人瞩目的药物作用靶点, 据统计目前世界上 1/3 的小分子药物都是 GPCRs 的激动剂 (agonist) 或拮抗剂 (antagonist), 而在销量最大的 50 种药物中, 其中 20% 均以

* 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)

作者简介: Baloucounne Guillaume Antoine (1976-) 男, 博士研究生, 主要研究 C 族 G 蛋白偶联受体的激活过程中的分子机制,

E-mail: baloucounneg@yahoo.fr, Tel: 027-87792024, 13476812332

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

(收稿日期: 2011-11-23 接受日期: 2011-12-18)

GPCRs 为靶点^[3]。

1 GPCRs 的组成性活性和组成性活性突变体

1.1 GPCRs 激活的多态假说和组成性活性

最初的学说认为 GPCRs 的激活只涉及没有配体的静息态 (Ri) 和结合了配体后的激活态 (ARa), GPCRs 就象是一个开关, 在激动剂的作用下打开, 而拮抗剂则可以抑制激动剂的作用^[4]。但 1989 年研究者发现在 NG108-15 细胞中 δ 阿片受体在不存在配体的情况下依然具有一定的生理活性, 这一有违经典学说的现象被命名为受体组成性活性 (constitutive activity)^[5]。类似的现象在其他受体中也得到了证实, 由此 1993 年 Samama 等提出了受体的二态模型^[6]。该假说摒弃了早期学说认为的配体结合才能导致受体活化的观点, 认为受体本身就存在着静息态 (Ri) 和激活态 (Ra) 并在两种构象间相互转化, 但只有处于 Ra 构象的受体可以激活下游信号通路。在静息情况下存在的一定比例的 Ra 构象而产生组成性活性, 而配体结合后可以稳定受体的 Ra 构象从而激活受体。在此基础上, 研究者进一步提出了三元二态假说, 认为激动剂 (A) 和 G 蛋白 (G) 可以随机动态与受体形成复合体, 结合了 G 蛋白且处于激活态的受体 (RaG) 就能够激活下游信号通路, 配体的存在则可以促进 RaG 的形成^[7,8]。

组成性活性的存在也使得研究者重新审视药物的分类, 从以前单一的拮抗剂而分为不能够抑制组成性活性的中性拮抗剂 (Neural antagonist) 和可以抑制受体组成性活性的反向激动剂 (Reverse agonist)^[9]。而激动剂或反向激动剂也可根据药物强度而分为完全或部分两类。这些结果导致了 GPCRs 激活的多态假说的建立, 即受体可以在被反向激动剂所稳定的基态和多个激活构象间动态平衡, 不同的激活构象则具有不同的激活强度, 配体因为可以稳定或促进某种特定构象的形成, 从而显示出完全或部分的激动剂 / 反向激动剂活性^[9-11]。

虽然上述假说在提出时都是根据药理学反应的推论而产生, 但近年来都得到了结构学的证实和进一步的完善。比如研究者发现 $\alpha 2$ 肾上腺素受体在没有激动剂存在的情况下可以与 Go-GDP 形成复合体, 该复合体可以在随机或激动剂作用下解聚并释放出活化的 Go-GTP^[12]。最近我们在 GABABR 中也发现了类似的现象。这些发现不仅证实了三元模型中的 RG 中间体的存在, 而且表明这种理论预期的可能不稳定的过渡态是一种稳定的结构。而受体的多个不同激活构象也得到了证实, 并且还发现受体的不同激活构象不仅影响激活强度, 同时还决定着下游所招募的 G 蛋白亚基和信号通路。比如 2007 年研究者利用 FRET 方法证明, 激动剂 DHPG 单独刺激和与 Gd3+ 合并刺激下的 mGluR1 的 i2-loop 与 i3-loop 之间的相对位置存在差异, 同时激动剂单独刺激时可以同时激活 Gq 和 Gs 信号通路, 而合并刺激下只能够激活 Gq 通路, 因此表现出 Gq 通路的完全激活状态^[13]。我们在形成同二聚体的 mGluR2 中也发现了类似的现象, 该受体的两种组成性活性突变体 C500A 和 L521C 虽然都能组成性激活 Gi/o 通路, 但 L521C 不具有细胞毒性, 而 C500A 通过未知的信号通路而导致强烈的慢性细胞毒性^[14]。而结构解析表明在 C500A 和 L521C 同二聚体中, 两个 CRD 单体彼此间的方向存在差异, 这也有力的证明了不同的激活构象在

偶联下游通路的差异^[14]。此外最近研究还发现不依赖于 G 蛋白的受体组成性活性, 如血清素受体可以通过与 arrestin 的结合而产生组成性活性^[15], 而 mGluR5 则通过与 Homer 蛋白的结合直接偶联下游的信号蛋白产生组成性活性^[16], 这些结果都进一步丰富了我们对于组成性活性的认识。

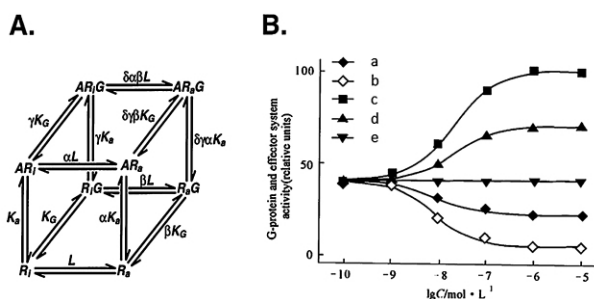


图1 A, GPCRs 的三元二态激活模型。Ri(静息受体), Ra(激活受体), G(G 蛋白), A(激动剂)^[7,8]; B, GPCRs 在不同药物作用下的生理效应: a, 部分反向激动剂; b, 完全反向激动剂; c, 完全激动剂; d, 部分激动剂; e, 对照和中性拮抗剂。其中 e 所表现的活性即为组成性活性^[9]

Fig.1 A, The cubic ternary complex model for GPCR activation. Ri (Inactive Receptor), Ra (Active Receptor), G (G protein), A (Agonist); B, Constitutive receptor activity (denoted by [RaG]) as a function of receptor density ([Ri]) and the allosteric constant ([Ra]/[Ri])^[7,8]; B, the activity of GPCRs upon different drugs. a, partly agonist; b, fully agonist; c, fully agonist; d, partly agonist; e, neutral antagonist or control. The activity in e is the constitutive activity^[9]

1.2 CAM 激活的分子机制

虽然很多 GPCRs 都具有一定程度的组成性活性, 但研究者在包括转基因小鼠的在内的多种表达系统中发现, 将受体的特定位点突变后, 可以使得受体的组成性活性显著增加, 因此该类突变体被称之为组成性活性突变体 (constitutive active mutant, CAM)^[7-11]。随之在多种遗传病患者体内中也发现了大量的天然 CAM^[17-19]。

根据多态假说, CAM 高组成性激活的分子机制有两种: 1) 受体的突变消除掉受体激活构象的抑制因素使其在多态变化中更倾向于激活构象的形成, 比如在 A 族受体中激活构象的抑制因素之一是 TM3 的 D (E)RY 基序与 TM6 之间形成的氢键, 而在 R 位点的突变由于破坏了氢键而导致受体可以更多的形成激活构象从而表现出弱的组成性活性^[20]; 2) 受体突变后产生了可以稳定受体激活构象的新的相互作用, 比如前面谈到的 mGluR2 的 C500A 和 L521C 突变体, 可以在同二聚体的两个 CRD 单体间形成一个二硫键, 由此使受体锁定在激活状态而表现出和野生型受体在激动剂刺激下的激活强度接近一致的高组成性活性^[14]。比较两者可以发现, 后者的构象与激动剂诱导产生的激活构象更为接近, 同时也更加稳定。

2 组成性活性在疾病中的作用

2.1 正常受体组成性活性的生理作用

如前所述, 很多 GPCRs 都具有一定程度的组成性活性。研究表明, 多种神经递质如多巴胺、乙酰胆碱、阿片肽、组胺、褪

黑素、谷氨酸等的受体都具有组成性活性,而这些组成性活性与基础神经活性、神经系统的发育和形成都密切相关^{[16,19] [21]}; PTHR 受体的组成性活性则被证实参与了骨骼形成^[22],促黄体素受体的组成性活性则参与发育和性成熟^[23]。有趣的是,在其他物种乃至真菌、酵母等低等生物,也发现 GPCRs 的组成性活性在生理上扮演重要的角色^[24,25]。比如最近研究发现,在真菌中的孤儿受体 CPR2 的组成性活性支配着真菌的性别决定和形态转换^[25]。

2.2 天然 CAM 在疾病中的作用

GPCRs 的活性在体内受到精密的调控,而天然 CAM 因为其上调的受体活性无疑会引起各种疾病(表 1)。在 1993 年研究者在视紫红质受体中首先报道了天然 CAM 在疾病中的作用, P23H 位点的突变可以导致先天性夜盲症^[19]。随后其他天然 CAM 在视紫红质受体中陆续报道,截止到目前已经有接近 15 种^[26]。另一个研究较多的受体是钙敏感性受体 CaSR, S425D、R474L、C542R 都被证实是天然 CAM 并导致家族性低钙血症的发生^[8,19,27,28]。这些遗传性疾病往往通过常染色体显性的方式遗传。值得一提的是, C542R 是我们最近发现的 mGluR2 的人工突变体 C500A 的同源位点的突变,其组成性激活机制都是在二聚体的两个单体间中产生了新的二硫键而使受体锁定在激活状态^[14]。而体细胞中的天然 CAM 同样可导致疾病的发生。如促甲状腺受体 TSHR 的 CAM 可以导致甲状腺素的过量分泌,也导致了甲状腺细胞的过量增殖而引起肿瘤^[17]。根据受体激活的多态假说,治疗这些疾病,只能采用相应受体的反向激动剂而不能采用不能抑制组成性活性的中性拮抗剂。

2.3 CAM 的成因

目前已发现多种原因均可能导致体内 CAM 的发生。最普遍的是基因层面的随机点突变,在关键区域发生的点突变,可能使活性构象大量增加,从而增加受体的组成性活性。大部分遗传性疾病相关的 CAM 均属于此类。RNA 水平的剪切变异也可以导致 CAM 的产生,如缺失了 i3-loop 的 H3R 的剪切突变体在体内产生了很强的组成性活性^[29]。而正常受体的不同剪切体之间,也往往存在着明显的组成性活性的差异。体细胞中则经常因为单核苷酸多态性而产生 CAM,如在很多心衰病人身上均发现 β - 肾上腺素受体发生 S 49G 突变,从而产生组成性活性^[9]。最近研究者还发现,一些整合病毒如巨细胞病毒 MV1 可以编码类似于哺乳动物 GPCRs 的基因,可以编码表达具有高组成型活性的 CAM,从而干扰和控制细胞的信号转导形成肿瘤^[19]。

2.4 其他导致异常组成性活性的因素

近年来多项研究表明,即使是没有发生突变的正常受体,体内也存着一些调控方式而改变其组成性活性。很多 GPCRs 都具有自身抗体,其识别部位大多都在受体 e2-loop,而这些自身抗体的结合往往都会影响受体的组成性活性,从而导致自身免疫性疾病。如人血管紧张素受体 AT1 参与了肾移植病人的同种异移植排斥反应,其症状可以被受体的反向激动剂所缓解^[30]。而持续的激动剂暴露也会产生受体的异常组成性活性,如 δ - 和 μ - 阿片受体慢性暴露于激动剂可增加组成性活性,同时一些本来为中性拮抗剂和部分激动剂的药物转变为反向

激动剂活性,从而表现出药物成瘾和依赖的症状^[31]。此外一些研究还表明,受体异常的表达水平、二聚化程度和在脂筏中的定位都会影响受体的组成性活性而产生疾病,但具体机制尚不清楚^[19]。

3 CAM 在基础研究和新药开发中的应用

3.1 CAM 在研究受体激活机制中的应用

由于 CAM 特别是锁定在激活状态的 CAM 与激活受体的构象有着很大的相似之处,因此目前利用 CAM 来研究 GPCRs 的激活机制已成为通用的研究方法并取得很多重要的结果。通过产生 CAM 而分析其构象是一种方法,例如对多种 A 族受体的 CAM 研究发现,很多 CAM 的突变都位于受体的 i3-loop、相邻的 TM6 以及 TM3 的 D(E)RY 基序^[4,11,32,33],进一步的研究表明, TM3 和 TM6 之间的靠近以及维持该构象所必须的氢键在受体激活过程中起着关键作用。而通过在已有的 CAM 中引入新的突变以破坏组成性活性,从而确定维持激活构象所需的相互作用是另一种思路。如 2006 年研究者发现 Ste2p 受体中 N205 和 Y266 之间在激活构象中存在着氢键,但该氢键在静息构象中并不存在,从而首次给出了只有在激活情况下才建立的蛋白质相互作用的实验证据^[34]。值得一提的是, C 族受体因为其相对复杂的空间结构和激活机制,在该族受体的激活机制研究取得进展几乎都涉及 CAM 的应用。2004 年我们通过在 GABABR 受体的 GB1-VFT 的参与配体结合的两个位点引入 Cys 而形成二硫键,从而得到具有高组成性活性的 CAM,证实了该受体的激活需要 GB1-VFT 的关闭(图 2A、B)^[35]。其他研究者通过在该区域引入离子键也获得了类似的 CAM,2009 年研究者发现,在 TM5 引入的 T764W 由于巨大侧链的位阻效应而使得 TM3 和 TM5 之间的构象发生改变从而产生高组成性活性(图 2C、D)^[36]。而最近我们发现,在 mGluR2 的 CRD 顶部引入二硫键,可以使同二聚体中的两个 CRD 通过单体间的二硫键而靠近,由此产生的高组成性活性说明了受体的激活需要两个单体间的靠近和侧向旋转。这也是首次在整个 GPCRs 家族中发现可以通过影响二聚化而导致组成性活性的 CAM (图 2E、F)^[14]。

3.2 CAM 在研究受体调节机制中的应用

在体内 GPCRs 涉及到磷酸化、去棕榈酸化、失敏、内化、降解、循环等一系列激活后的调节过程,而通过分析 CAM 与野生型受体在这些生命进程中的差异无疑将有助于我们了解受体激活与这些激活后调节作用的关系^[4,11]。多数 CAM 都表现出组成性磷酸化,例如黄体生成素受体和肾上腺素受体,说明 CAM 的激活构象使其 C 末端的磷酸化位点被特异和非特异激酶识别,最终引发失敏和内化。有关 CAM 组成性内化和循环最近也有报道,如血管紧张素 I 受体(AT1)的多种 CAM 都具有组成性内化和循环现象。而用反向激动剂处理 2 h 后,在不影响受体表达量的情况下受体在膜上发生了重新分布。这种膜受体的重新分布并不依赖于受体蛋白的合成,在去除反向激动剂后数分钟即消失^[30]。而我们最近发现, GABABR 的 CAM 会发生组成性的去棕榈酸化,同时其在脂筏中的定位也发生了改变,这些都加深了我们对 GABABR 激活后调节机制的理解。但有趣的是, CAM 的调节机制并不完全类似于配体激活后的野

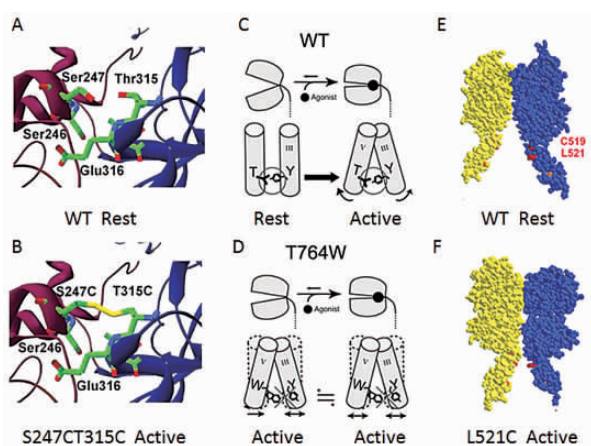


图2 A 静息状态下 GABABR-WT 的 GB1-VFT 的 3D 模型 B 处于组成性激活状态的 GABABR-S247CT315C 突变体的 GB1-VFT 的 3D 模型^[35] C mGluR8-WT 在配体结合前后 TM5 和 TM3 之间构象变化的示意图 D mGluR8-T764W 在配体结合前后 TM5 和 TM3 构象变化的示意图^[36] E 静息状态下 mGluR2-WT 同二聚体的构象 F 处于组成性激活状态的 mGluR2-L521C 同二聚体的构象^[14]

Fig.2 A, the 3-D model of GB1-VFT of GABABR-WT in rest state; B, the 3-D model of GB1-VFT of GABABR-S247CT315C in constitutive active state^[35]; C, the diagram of the allosteric change between TM5 and TM3 of mGluR8-WT upon agonist stimulation; D, the diagram of the allosteric change between TM5 and TM3 of mGluR8-T764W upon agonist stimulation^[36]; E, the 3-D model of mGluR2-WT homodimer in rest state; F, the 3-D model of mGluR2-L521C homodimer in rest state^[14]

生型受体。如最近发现具有组成性活性 LHR-L457R 不同于激活后的 LHR-WT,不进入溶酶体路径降解,而是大量的滞留于质膜,具体的机制尚待进一步研究^[37]。

3.3 CAM 在孤儿受体脱孤中的应用

人类基因组计划证实人类基因组中大概还有 150 个左右属于 GPCRs 家族的孤儿受体,而在其他物种基因组中也还存在着大量的孤儿受体。如何研究这些孤儿受体的配体和功能是一个棘手的问题,CAM 的出现为解决孤儿受体的功能提供了一种解决办法。利用随机突变或根据同源定向突变的方法获得孤儿受体的 CAM,然后在体外表达系统中检测其生理效应,并进一步在体内予以证实,是目前研究孤儿受体的通用思路,如我们在 C 族受体中发现产生组成性活性的关键位点,这为研究结构类似的小鼠信息素受体中的孤儿受体提供了新的研究方向^[14]。CAM 也为进一步研究孤儿受体的内源性配体即脱孤过程提供了重要的工具。如孤儿受体 RDC8S 的 CAM 在异源表达时可激活 Gs 通路而增强 cAMP 合成,进一步的研究发现该生理活性可被阿糖腺苷类似物所抑制,结合其他生物学信息如定位,最终证实该孤儿受体为阿糖腺苷 A2A 受体^[4]。

3.4 CAM 在新药开发中的应用

毫无疑问,CAM 的出现为寻找 GPCRs 的反向激动剂提供了有力的研究工具。结合组合突变方法和高通量筛选技术,研究者构建了一系列基于 CAM 的药物筛选方法。比如 2002 年 Chalmers 等发展了组成性激活受体技术 (constitutively activating receptor technology, CART),其将目的受体表达于合成胰岛素的细胞系,利用胰岛素的分泌量而测定受体的活性变化^[38];

其后其他研究者利用蛙黑色素细胞系统和酿酒啤酒酵母系统构建了类似的方法^[8]。采用这些方法研究者筛选出众多具有反向激动剂活性的拮抗剂^[5,9],如我们利用前面提到的 GABABR 的 CAM(S247CT315C)筛选出反向激动剂 NAM310,而最近研究者利用 hTSHR 的 CAM,首次筛选出该受体的小分子反向激动剂^[39]。

4 总结和展望

综上所述,GPCRs 的组成性活性在体内扮演重要的角色,其组成性活性的异常或天然 CAM 的产生与疾病高度相关。另一方面,CAM 因为在一定程度上模拟了野生型 GPCRs 的激活状态,从而为我们研究该族受体的功能、激活机制、激活后调节等提供了重要的思路和方法,同时也为我们筛选有效的反向激动剂提供了有效的工具。

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] 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
- [3] 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
- [4] Gether U. Uncovering molecular mechanism involved in activation of G-protein-coupled receptors[J].*Endocrine Rev*,2000,21(1):90-113
- [5] Costa T, Herz A. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1989,86(19):7321-7325
- [6] Samama P, Cotecchia S, Costa T, et al. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model[J]. *J Biol Chem*,1993,268(7):4625-4636
- [7] Chen G, Jayawickreme C, Way J, et al. Constitutive receptor systems for drug discovery [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*,1999,42 (4): 199-206
- [8] Chen G, Way J, Armour S, et al. Use of constitutive G protein-coupled receptor activity for drug discovery [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 57(1): 125-134
- [9] Richard F, Barroso S, Martinez J, et al. Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2[J]. *Mol Pharmacol*,2001,60(6):1392-1398
- [10] Kenakin T. Principles: receptor theory in pharmacology [J]. *Trends Pharmacol Sci*,2004,25(4):186-192
- [11] 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
- [12] Nobles M, Benians A, Tinker A. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2005,102(51):18706-18711
- [13] 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 USA*,2006,103(4):1124-1128
- [14] Huang SL, Cao JH, Jiang M, et al. Interdomain movements in metab-

- tropic glutamate receptor activation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011,108(37):15480-15485
- [15] Labasque M, Meffre J, Carrat G, et al. Constitutive activity of serotonin 2C receptors at G protein-independent signaling: modulation by RNA editing and antidepressants[J]. *Mol Pharmacol*, 2010,78(5):818-826
- [16] Ango F, Prezeau L, Muller T, et al. Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer [J]. *Nature*, 2001,411(6840):962-965
- [17] Biebermann H, Schoneberg T, Hess C, et al. The first activating TSH receptor mutation in transmembrane domain 1 identified in a family with nonautoimmune hyperthyroidism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001,86(9):4429-4433
- [18] Parma J, Duprez L, Van Sande J, et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas [J]. *Nature*, 1993,365(6447):649-651
- [19] Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H, et al. Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2004,104(3):173-206
- [20] Ballesteros J, Kitanovic S, Guarnieri F, et al. Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor [J]. *J Biol Chem*, 1998,273(17):10445-10453
- [21] Connor M and Traynor J. Constitutively active mu-opioid receptors [J]. *Methods Enzymol*, 2010,484:445-469
- [22] Ono N, Nakashima K, Schipani E, et al. Constitutively active PTH/PTHrP receptor specifically expressed in osteoblasts enhances bone formation induced by bone marrow ablation [J]. *J Cell Physiol*, 2012,227(2):408-415
- [23] Lei Y, Hagen GM, Smith SM, et al. Constitutively-active human LH receptors are self-associated and located in rafts [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007,260-262:65-72
- [24] Dosil M and Konopka JB. Strategies for isolating constitutively active and dominant-negative pheromone receptor mutants in yeast [J]. *Methods Enzymol*, 2010,485:329-348
- [25] Hsueh YP, Xue C, Heitman J. A constitutively active GPCR governs morphogenic transitions in *Cryptococcus neoformans* [J]. *EMBO J*, 2009,28(9):1220-1233
- [26] Li T, Sandberg MA, Pawlyk BS, et al. Effect of vitamin A supplementation on rhodopsin mutants threonine-17 --> methionine and proline-347 --> serine in transgenic mice and in cell cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998,95(20):11933-11938
- [27] Parnot C, Miserey-Lenkei S, Bardin S, et al. Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors [J]. *Endocrinology and Metabolism*, 2002,13(8):336-343
- [28] 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
- [29] Rouleau A, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, et al. Histamine H3-receptor-mediated [35S] GTP gamma[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H3 receptors[J]. *Br J Pharmacol*, 2002,135(2):383-392
- [30] Bhuiyan MA, Hossain M, Miura S, et al. Constitutively active mutant N111G of angiotensin II type 1 (AT(1)) receptor induces homologous internalization through mediation of AT(1)-receptor antagonist[J]. *J Pharmacol Sci*, 2009,111(3):227-234
- [31] Zaki PA, Keith DE, Thomas JB, et al. Agonist-, Antagonist-, and inverse agonist-regulated trafficking of the-opioid receptor correlates with, but does not require, G protein activation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001,298(3):1015-1020
- [32] Chee MJ, M?rl K, Lindner D, et al. The third intracellular loop stabilizes the inactive state of the neuropeptide Y1 receptor [J]. *J Biol Chem*, 2008,283(48):33337-33346
- [33] Huang P, Jin Li, Chen CG. Functional role of a conserved motif in TM6 of the rat opioid receptor: constitutively active and inactive receptors result from substitutions of Thr6 [J]. *Biochemistry*, 2001,40:13501-13509
- [34] Lee YH, Naider F, Becker JM. Interacting residues in an activated state of a G protein-coupled receptor [J]. *J Biol Chem*, 2006,281(4):2263-2272
- [35] Kniazeff J, Saintot P, Goudet C, Liu JF, Charnet A, Guillon G, Pin JP. Locking the dimeric GABA (B) G-protein-coupled receptor in its active state[J]. *J Neurosci*, 2004,24(2):370-377
- [36] Yanagawa M, Yamashita T, Shichida Y. Activation switch in the transmembrane domain of metabotropic glutamate receptor [J]. *Mol Pharmacol*, 2009,76(1):201-207
- [37] Galet C and Ascoli M. A constitutively active mutant of the human lutropin receptor (hLHR-L457R) escapes lysosomal targeting and degradation[J]. *Mol Endocrinol*, 2006,20(11):2931-2945
- [38] Chalmers DT, Behan DP. The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002,1(8):599-608
- [39] Neumann S, Huang W, Eliseeva E, et al. A small molecule inverse agonist for the human thyroid-stimulating hormone receptor [J]. *Endocrinology*, 2010,151(7):3454-3459