

МНОЖЕСТВЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

© 2024 г. А. О. Шпаков*, К. В. Деркач**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*E-mail: alex_shpakov@list.ru

**E-mail: derkach_k@list.ru

Поступила в редакцию 08.07.2024 г.

После доработки 29.07.2024 г.

Принята к публикации 10.08.2024 г.

Регуляторные эффекты лютеинизирующего гормона (ЛГ) и хорионического гонадотропина (ХГ) реализуются посредством активации сопряженного с G-белками рецептора ЛГ/ХГ (ЛГ/ХГ-Р). Результатом этого является активация различных типов G-белков, что приводит к стимуляции (G_s) или ингибированию (G_i) цАМФ-зависимого пути и стимуляции кальциевого сигналинга ($G_{q/11}$, G_i), и рекрутирование β -аррестинов, которые предотвращают G-белковый сигналинг путем интернализации и даун-регуляции рецептора, но также могут активировать каскад митогенактивируемых протеинкиназ. Несмотря на определенное сходство эффектов ЛГ и ХГ, между ними имеются различия как в эффективности, так и в паттерне регуляции ЛГ/ХГ-Р. Это является следствием различий в аффинности ЛГ и ХГ к ортостерическому сайту рецептора, а также различий на уровне аллостерической регуляции рецептора, что обусловлено присутствием в β -субъединице ХГ С-концевого расширения, включающего сайты для О-гликозилирования, и вариабельностью N-гликозилирования α - и β -субъединиц гонадотропинов. При этом различаются число N-гликанов, степень их разветвленности и заряд, что ведет к различной эффективности активации внутриклеточных каскадов, влияя на физиологический ответ репродуктивной системы на гонадотропины. Большое значение имеет образование гомоди(олиго)мерных комплексов ЛГ/ХГ-Р и его гетерокомплексов с рецептором фолликулостимулирующего гормона, где протомеры аллостерически влияют на эффективность активации ЛГ/ХГ-Р и предвзятость сигнальной трансдукции. С учетом большого числа аллостерических сайтов в ЛГ/ХГ-Р ведется разработка низкомолекулярных аллостерических его регуляторов, в том числе агонистов на основе тиено[2,3-d]-пиримидина и пептидов, производных цитоплазматических петель ЛГ/ХГ-Р. Эти регуляторы могут стать прототипами препаратов для коррекции функций репродуктивной системы. Анализ данных о сходстве и различиях в сигнальных и физиологических эффектах гонадотропинов с ЛГ-активностью, о роли в этом аллостерических механизмов и перспективах создания аллостерических регуляторов ЛГ/ХГ-Р посвящен настоящий обзор.

Ключевые слова: рецептор лютеинизирующего гормона, хорионический гонадотропин, аллостерический сайт, репродуктивная система, фолликулогенез, овуляция, стероидогенез.

DOI: 10.31857/S0301179824040031 **EDN:** ANEJYS

Сокращения: АКО – аминокислотный остаток; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ЛГ/ХГ-Р – рецептор ЛГ/ХГ; ТМ – трансмембранный участок; ТМД – трансмембранный домен; ТП – тиено[2,3-d]пиримидиновое производное; ФСГ-Р – рецептор фолликулостимулирующего гормона; ХГ – хорионический гонадотропин; чХГ – ХГ человека; ARF6 – АДФ-рибозилирующий фактор 6; ВАР – предвзятый аллостерический модулятор; ECL – внеклеточная петля; GalNAc – сульфатированный N-ацетилгалактозамин; GPCR – G-белок-сопряженный рецептор; GRK – специфичная для GPCR рецепторная киназа; ICL – цитоплазматическая петля; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы; NAM – негативный аллостерический модулятор; РАР – положительный аллостерический модулятор; PDE – фосфодиэстераза; TGF β – рецептор трансформирующего фактора роста- β ; TP03 – 5-амино-N-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид; TP4/2 – 5-амино-N-трет-бутил-4-(3-(1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамидо)фенил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ГОНАДОТРОПИНОВ, КАК ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СУПЕРСЕМЕЙСТВА GPCR

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) и хорионический гонадотропин (ХГ), которые вырабатываются аденогипофизом (ЛГ, гипофизарный ХГ) или эмбрионом и плацентой на ранних этапах беременности (ХГ), являются важнейшими компонентами ЛГ-зависимой сигнальной системы, вовлеченной в регуляцию репродуктивных функций. Они активируют рецептор ЛГ/ХГ (ЛГ/ХГ-Р), который относится к семейству G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR) класса А, связываясь с его ортостерическим сайтом, локализованным в значительном по размеру эктодомене. Ортостерический сайт GPCR является мишенью для основного эндогенного лиганда этого рецептора и обычно характеризуется высокой аффинностью к нему. ЛГ и ХГ связываются с ЛГ/ХГ-Р с высокой аффинностью, вызывая широкий спектр физиологических ответов. Однако эффективность и специфичность активации внутриклеточных каскадов, а соответственно и вызываемый ЛГ и ХГ конечный ответ, могут существенно различаться [4, 22, 68, 80, 104, 105], и это имеет вполне определенный биологический смысл, учитывая различную физиологическую роль ЛГ и ХГ в организме человека и других млекопитающих. Каждый из гонадотропинов имеет большое число изоформ, что определяется особенностями их гликозилирования и приводит к разнообразному паттерну специфической активности, влияя на предвзятость сигнальной трансдукции [19, 28, 49, 50, 73, 133]. Клеточный ответ на ЛГ и ХГ может регулироваться на уровне ЛГ/ХГ-Р путем посттрансляционных модификаций рецептора и вследствие образования гомо- и гетеро(олиго)мерных рецепторных комплексов [23, 27, 41, 47, 70, 71, 75]. Гликозилирование ЛГ и ХГ и образование ЛГ/ХГ-Р-содержащих комплексов являются важнейшими процессами аллостерической регуляции активности ЛГ/ХГ-Р и всей ЛГ/ХГ-опосредуемой сигнальной трансдукции. При этом нельзя исключить и аллостерического влияния на нее липидного состава мембран, ионного и аминокислотного состава во внутри- и межклеточной среде, доступности и функциональной активности адаптерных белков, образующих комплексы с ЛГ/ХГ-Р. Так мембранные липиды — холестерин и фосфолипиды, некоторые ионы (Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cl^- и другие), аминокислоты и их производные (Tyr, Phe, Trp, Leu, Ile, гомоцистеин, агматин и др.) и некоторые адаптерные белки могут функционировать как аллостерические регуляторы GPCR [110]. Однако прямые доказательства их участия в контроле активности ЛГ/ХГ-Р в настоящее время отсутствуют. Кроме того, в качестве эндогенных аллостерических регуляторов ЛГ/ХГ-Р

могут выступать аутоантитела к гонадотропинам с ЛГ-активностью и к ЛГ/ХГ-Р [72].

Существуют различные аллостерические механизмы регуляции ЛГ/ХГ-Р, что указывает на возможность тонкой настройки эффективности и селективности ЛГ/ХГ-индуцированной сигнальной трансдукции. Эта настройка зависит от физиологического статуса клетки, паттерна гликоформ ЛГ и ХГ, состава и соотношения ЛГ/ХГ-Р-содержащих комплексов, активности других сигнальных каскадов, модулирующих активность ЛГ/ХГ-Р, а также от выработки аутоантител к гонадотропинам и ЛГ/ХГ-Р. Такое многообразие аллостерических влияний предопределено существованием большого числа аллостерических сайтов в ЛГ/ХГ-Р, как это показано и для других GPCR класса А. Эти сайты могут быть локализованы во внеклеточных петлях и внешнем входе в трансмембранный тоннель, во внутренней полости этого тоннеля, на внешней поверхности трансмембранного домена (ТМД), граничащей с липидным бислоем мембраны, в цитоплазматических петлях и в области внутриклеточного входа в трансмембранный тоннель [110]. Аллостерические сайты, как правило, не столь специфичны к лигандам, как ортостерический сайт, и имеют более низкую аффинность к ним. Наряду с этим связывание с ними лигандов направлено в основном на модуляцию конstitutивной или активированной ортостерическим агонистом активности GPCR, в то время как собственные эффекты таких лигандов выражены слабо и отчетливо выявляются только при использовании специально разработанных синтетических регуляторов с повышенным сродством к аллостерическим сайтам GPCR.

Соответственно, появляется возможность разработки сайт-специфичных аллостерических лигандов, которые будут наделены различным профилем фармакологической активности. В случае ЛГ/ХГ-Р они могут выступать в качестве модуляторов эффектов гонадотропина или иметь собственную агонистическую или антагонистическую активность. Как известно, аллостерические регуляторы могут снижать (негативный аллостерический модулятор, NAM) или повышать (положительный аллостерический модулятор, PAM) сродство и эффективность ортостерического агониста, модулировать другие аллостерические эффекты (“молчащий” аллостерический модулятор, SAM), проявлять собственную активность полного или инверсионного агониста и нейтрального антагониста в отсутствие ортостерического агониста, совмещать активность полного агониста и антагониста с активностью PAM (ago-PAM, PAM-антагонист) или NAM (ago-NAM) [110, 143, 145]. Поскольку аллостерические сайты взаимодействуют не только с ортостерическим сайтом, но и между собой, то профиль активности аллостерического лиганда

может быть сложным и не описываться в терминах предложенной классификации, что справедливо и для некоторых аллостерических регуляторов ЛГ/ХГ-Р. В дополнение к этому, с учетом множественности сигнальных каскадов, активируемых ортостерическими агонистами, некоторые аллостерические модуляторы могут избирательно усиливать или, напротив, ослаблять только один такой каскад, что приводит к предпочтительной активации определенного сигнального пути и обеспечивает предвзятый агонизм ортостерического агониста, используемого в комбинации с таким модулятором. Такие аллостерические лиганды относят к группе предвзятых или «смещенных» аллостерических модуляторов (ВАМ) [115, 145].

Настоящий обзор посвящен анализу и обсуждению роли в сигнальной трансдукции гликозилирования ЛГ и ХГ, комплексообразования ЛГ/ХГ-Р, в том числе его гетеродимеризации с рецептором фолликулостимулирующего гормона (ФСГ-Р), вкладу этих процессов в контроль активности ЛГ/ХГ-Р и в развитие репродуктивных дисфункций. В обзоре рассмотрены современные достижения в разработке низкомолекулярных аллостерических регуляторов ЛГ/ХГ-Р, взаимодействующих с трансмембранными и цитоплазматическими сайтами рецептора. Перед рассмотрением аллостерических механизмов дана краткая характеристика ЛГ и ХГ, ЛГ/ХГ-Р и их сигнальных систем.

СТРУКТУРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА И ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА

ЛГ и ХГ представляют собой $\alpha\beta$ -гетеродимеры с молекулярной массой около 30 кДа. Секреция ЛГ осуществляется гонадотрофами аденогипофиза и контролируется гипоталамическим релизинг-фактором гонадолиберин и опосредованно множеством полипептидных факторов, стероидными гормонами, цитокинами [44, 117]. Для ХГ человека (чХГ) известны гипофизарная форма, которая, подобно ЛГ, продуцируется гонадотрофами, плацентарная форма, секретируемая эмбрионом и плацентой в первом триместре беременности, и гипергликозилированная форма, экспрессируемая на ранних стадиях развития эмбриона и существенно отличающаяся от ЛГ и других чХГ [31, 95].

α -Субъединица кодируется одним геном и является общей для всех гонадотропинов. Она представляет собой полипептид длиной 116–120 аминокислотных остатков (АКО) и характеризуется высокой степенью гомологии первичной структуры. β -Субъединицы сильно различаются по первичной структуре и определяют типовую принадлежность гонадотропина. Высоко консервативными в β -субъединицах являются остатки цистеина, определяющие их пространственную организацию

и ответственные за образование функционально активных $\alpha\beta$ -гетерокомплексов. В 1990-е гг. была расшифрована 3D-структура гетеродимерной молекулы чХГ [74]. Важным структурообразующим компонентом α - и β -субъединиц гонадотропинов являются внутримолекулярные дисульфидные связи, которые соединяют удаленные друг от друга сегменты α - и β -субъединиц, благодаря чему те перекрещиваются между собой и формируют жесткую узловую структуру (cystine-knot). Цистиновые узлы локализованы в центральной части α - и β -субъединиц и стабилизируют исходящие из нее петли – L1, L2 и L3 [101]. В гетеродимере α - и β -субъединицы расположены симметрично по отношению друг к другу, имеют вытянутую форму и большое отношение площади поверхности к объему молекулы. Полипептид, соответствующий С-концевой области β -субъединицы, выходит за пределы скрепленной цистиновыми узлами центральной части молекулы и функционирует как “ремень безопасности”, оборачиваясь вокруг антипараллельных спиралей, формирующих L2-петлю α -субъединицы. Пространственная структура “ремня безопасности” стабилизируется внутримолекулярной S–S-связью, формируемой остатками цистеина, один из которых локализован в L1-петле β -субъединицы, другой – ближе к ее С-концу (в β -чХГ – Cys²⁶ и Cys¹¹⁰). Сегмент, формирующий центральную часть “ремня безопасности” β -субъединицы, определяет специфичность взаимодействия гонадотропина с ЛГ/ХГ-Р. В β -ЛГ и β -чХГ этот сегмент имеет суммарный положительный заряд, что предопределяет его взаимодействие с отрицательно заряженными сайтами ЛГ/ХГ-Р [101].

α - и β -Субъединицы подвергаются N-гликозилированию, поскольку содержат Asn-содержащие сайты, мишени N-гликозилтрансфераз, со структурой Lys-Asn-(Val/Ile) или (Glu/Tyr)-Asn-His [50]. В α -субъединице локализованы два таких сайта (Asn⁵², Asn⁷⁸), в β -субъединице – один (β -ЛГ, Asn³⁰) или два (β -чХГ, Asn¹³ и Asn³⁰) сайта. В β -субъединице ФСГ, как и в β -чХГ, также имеются два сайта для N-гликозилирования (рис. 1). С-концевое расширение β -чХГ включает четыре сайта для O-гликозилирования, где мишенями O-гликозилтрансфераз являются остатки Ser¹²¹, Ser¹²⁷, Ser¹³² и Ser¹³⁸ [49, 50]. Степень гликозилирования, локализация и структура N-гликанов (разветвленность, заряд) в α - и β -субъединицах вносят значительный вклад в специфичность образования ими гетеродимерных комплексов и в их устойчивость, а также определяют связывающие характеристики и эффективность гонадотропинов, предвзятость их сигналинга, влияют на их фармакокинетику [15, 49, 50].

Представителем необычной группы гонадотропинов с ЛГ-активностью является ХГ лошади (лХГ), который сочетает свойства ЛГ и ФСГ

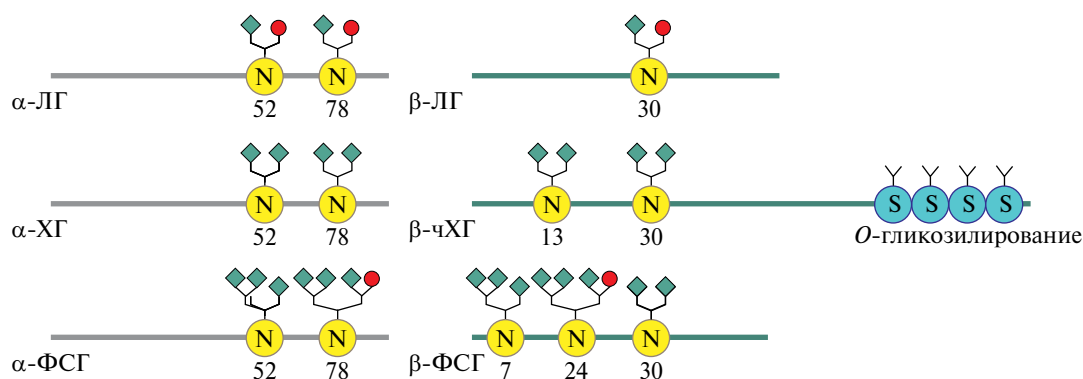


Рис. 1. *N*- и *O*-гликозилирование субъединиц ЛГ и ХГ человека, а также представленного для сравнения ФСГ. Для α-ЛГ, α-ФСГ и α-ХГ представлены гликоформы α-субъединиц, характерные для молекул ЛГ, ФСГ и плацентарного чХГ. Во всех субъединицах показаны сайты для *N*-гликозилирования, а в β-субъединицах чХГ — также локализованные в С-концевой части молекул сайты для *O*-гликозилирования. Приведены наиболее типичные структуры *N*-гликанов, характерные для представленных гонадотропинов. В α- и β-субъединицах ЛГ и ХГ преобладают слабоветвленные (гибридные и двухантенные) *N*-гликаны, причем в секретируемом гипофизом ЛГ больше сульфатированного *N*-ацетилгалактозамина (GalNAc), а в секретируемом плодом и плацентой чХГ превалируют остатки сиаловой кислоты. В α- и β-субъединицах ФСГ имеется значительное число более разветвленных (трех- и четырехантенных) *N*-гликанов, обогащенных сиаловой кислотой. Концевые остатки сиаловой кислоты обозначены *незакрашенными квадратами*, концевые остатки сульфатированного GalNAc обозначены *закрашенными кружочками*.

[76]. В отличие от чХГ β-субъединица лХГ имеет один сайт для *N*-гликозилирования (Asn¹³), но в С-концевой области содержит до 11–12 сайтов для *O*-гликозилирования, причем мишенями *O*-гликозилтрансфераз являются остатки как серина (Ser¹¹⁸, Ser¹²³, Ser¹²⁸, Ser¹³⁰, Ser¹³⁷, Ser¹⁴⁰, Ser¹⁴¹ и Ser¹⁴⁹), так и треонина (Thr¹²⁷, Thr¹²⁹, Thr¹³¹ и Thr¹³³) [14]. Наряду с β-лХГ у лошади имеется β-субъединица ЛГ (лЛГ), которая также обладает двойной специфичностью, активируя ЛГ/ХГ-Р и ФСГР. Как и β-лХГ, β-лЛГ имеет до 11 сайтов для *O*-гликозилирования [20].

СТРУКТУРА РЕЦЕПТОРА ЛГ/ХГ И МЕХАНИЗМЫ ЕГО СВЯЗЫВАНИЯ С ГОНАДОТРОПИНАМИ

ЛГ/ХГ-Р относится к классу А суперсемейства рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), и включен в группу δ родопсинового семейства, вместе с ФСГ-Р и рецептором тиреотропного гормона (ТТГ-Р). Гонадотропины связываются с высокоаффинным ортостерическим сайтом ЛГ/ХГ-Р, который сформирован значительным по размеру внеклеточным доменом, подобно тому, как это наблюдается в других рецепторах группы δ.

Экдомен ЛГ/ХГ-Р включает до 360 АКО и содержит два структурных субдомена. Первый включает девять повторяющихся участков, обогащенных лейцином (leucine-rich repeat, LRR), второй представляет собой шарнирную область, соединяющую LRR-субдомен с ТМД. Основными структурными

элементами ТМД являются семь трансмембранных спиралей (ТМ), образующих трансмембранный тоннель. На *N*- и *C*-концах шарнирной области располагаются еще два LRR-сегмента, LRR10 и LRR11, между которыми локализованы α-спираль Pro²⁷²–Asn²⁸⁰ и протяженная петлеобразная структура [41]. На С-конце шарнирной области, в месте перехода эктодомена в ТМД, локализован участок P10 (Phe³⁵⁰–Tyr³⁵⁹). Шарнирная область осуществляет тонкую регуляцию связывания гонадотропинов с эктодоменом и обеспечивает передачу генерируемого ими сигнала к ТМД [41].

Поверхность чХГ содержит кластеры, обогащенные положительно заряженными АКО, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными АКО, формирующими лиганд-связывающую поверхность эктодомена ЛГ/ХГ-Р. Во взаимодействии с ЛГ/ХГ-Р вовлечены обе субъединицы чХГ. С-концевой сегмент 92–106 β-чХГ взаимодействует с остатками Arg⁵³, Ser⁵⁵, Ala⁵⁷ и Tyr⁵⁸ повтора LRR1 и с остатком Glu²⁰⁶ повтора LRR7, а остатки Val⁴⁶ и Gln⁴⁸ β-чХГ образуют контакты с остатками Gln²⁴⁶ и Arg²⁴⁷ повтора LRR10. Остатки Tyr⁸⁸, Tyr⁸⁹ и Ser⁹² α-субъединицы взаимодействуют с Tyr¹²⁷, Ile¹⁵², Lys¹⁸⁰ и Tyr¹⁸², локализованными в повторах LRR4–LRR6 ЛГ/ХГ-Р [41]. При связывании чХГ с рецептором конформационные изменения наблюдаются в четырех сегментах — в локализованном в β-чХГ участке, называемом “ремнем безопасности”, который отвечает за стабилизацию αβ-гетеродимера чХГ, а также в β-складчатых структурах, локализованных в β-чХГ (L2, L3) и α-чХГ (L3) [41].

138]. Несмотря на сходство “ремня безопасности” в β -чХГ и β -ЛГ, между их β -складчатыми структурами имеются существенные отличия, что влечет за собой различия в эффективности их взаимодействия с ЛГ/ХГ-Р и в способности активировать внутриклеточные каскады [41, 53].

Как и в других GPCR класса А, при активации ЛГ/ХГ-Р в ТМД меняется суперпозиция ТМ6 и взаимодействующих с ней ТМ5 и ТМ7. Изменение расположения ТМ и конфигурации внутренней полости ТМД является триггером конформационных изменений в G-белке, ассоциированном с цитоплазматическими петлями рецептора. Эти изменения способствуют ГДФ/ГТФ-обмену в α -субъединице G-белка и ослабляют ее ассоциацию с G $\beta\gamma$ -димером, что приводит к активации зависимых от G-белков внутриклеточных каскадов. При связывании чХГ с ЛГ/ХГ-Р наблюдается перемещение С-концевого сегмента спирали ТМ6 наружу, и это сопровождается небольшим смещением наружу спирали ТМ5 и сдвигу внутрь спирали ТМ7 [41]. Оценка расстояния между сегментами ТМ6 и ТМ7 показала, что при связывании ЛГ/ХГ-Р с чХГ расстояние между ними увеличивается как в области внешнего вестибуля ТМД, так и в центральной его части, и это сопровождается увеличением объема внутренней полости ТМД [57]. Расширение входа в трансмембранный тоннель происходит и при связывании небольших лигандов с ТМД большого числа GPCR [118]. Результатом увеличения объема внутренней полости ТМД и изменения суперпозиции образующих его ТМ является изменение конформации проксимальных к мембране цитоплазматических участков второй и третьей цитоплазматических петель (ICL2, ICL3) и цитоплазматического С-концевого домена рецептора. Эти участки содержат основные детерминанты, ответственные за взаимодействие с G-белками и β -аррестинами, играющими ключевую роль в ЛГ/ХГ-Р-опосредуемой сигнальной трансдукции.

В основе изменений суперпозиции ТМ при активации ЛГ/ХГ-Р гонадотропином лежит изменение взаимодействия между LRR-субдоменом и шарнирной областью эктодомена, с одной стороны, и ТМД, в первую очередь внеклеточными петлями (ECL), формирующими внешний вестибуль трансмембранного тоннеля с другой [57]. В отсутствие гормональной активации взаимодействие между LRR-субдоменом и ТМД обеспечивает нахождение последнего в неактивном состоянии. После связывания с гонадотропином взаимодействие LRR-субдомена с ТМД ослабляется, на что указывает увеличение расстояния между ними. LRR-субдомен переходит в вертикальное по отношению к ТМД положение. Шарнирная область, напротив, в результате ее вращения сближается с внеклеточным вестибулем ТМД, одновременно удаляясь от LRR-субдомена [65]. При активации ЛГ/ХГ-Р

расстояние между LRR-субдоменом и ТМД повышается с 60 до 88 ангстрем, в то время как расстояние между шарнирной областью и ТМД сокращается с 79 до 48 ангстрем [65]. Ключевую роль в ассоциации эктодомена и ТМД ЛГ/ХГ-Р играют взаимодействия между спиралью шарнирной области и спиралью, образуемой средней частью ECL1, а также взаимодействия между С-концевым сегментом P10 шарнирной области и внешним вестибулем трансмембранного тоннеля, образованного внеклеточными окончаниями ТМ1, ТМ2 и ТМ7 [41, 57, 107]. Изменение характера этих взаимодействий при связывании ЛГ/ХГ-Р с гонадотропином влияет на взаимное расположение спиралей ТМ5, ТМ6 и ТМ7 и конформацию ТМД, что активирует внутриклеточный сигналинг.

Среди расположенных в эктодоме ЛГ/ХГ-Р детерминант, опосредующих его активацию ЛГ и ХГ, важную роль играет остаток Tyr³³¹, который подвергается сульфатированию и приобретает отрицательный заряд. Он расположен в середине шарнирной области и окружен отрицательно заряженными АКО, образуя кластер с высокой плотностью отрицательного заряда. Tyr³³¹ и соседние с ним Asp³³⁰ и Glu³³² электростатически взаимодействуют с положительно заряженными кластерами чХГ, контролируя взаимное расположение шарнирной области и ТМД. Их замены на другие АКО, нарушающие целостность анионного кластера, препятствуют взаимодействию с гонадотропином [33]. Другой важной детерминантой является Ser²⁷⁷, участвующий в формировании спирали Pro²⁷²–Asn²⁸⁰, локализованной в N-концевой части шарнирной области. Он опосредует взаимодействие этой спирали с ECL1 и модулирует устойчивость комплекса между эктодоме и ТМД. Гидроксильная группа Ser²⁷⁷ способна образовывать водородную связь с Asn³⁵¹, расположенным в высококонсервативном участке P10 [41], который рассматривают как внутренний агонист ЛГ/ХГ-Р [17].

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ КАСКАДЫ, МИШЕНИ ЛГ И ЧХГ

Специфическое связывание $\alpha\beta$ -гетеродимеров ЛГ и чХГ с внеклеточным доменом ЛГ/ХГ-Р индуцирует в нем изменения, результатом чего являются перестройки, затрагивающие шарнирную область и контактирующие с ней ECL2 и ECL3. Взаимное расположение и конформационная подвижность ECL2 и ECL3 непосредственно влияют на структуру ТМД и на взаимодействие ICL2, в особенности ICL3 с G-белками и β -аррестинами. Используя многоступенчатый механизм конформационных перестроек, гонадотропины регулируют внутриклеточные каскады как посредством активации G-белков, так и путем рекрутирования в комплекс с рецептором адаптерных и регуляторных

белков, в первую очередь β -аррестинов. Встроенные в мембрану ЛГ/ХГ-Р способны образовывать как гомодимерные (гомоолигомерные), так и гетеродимерные (гетероолигомерные) комплексы с другими GPCR, в том числе с ФСГР, что оказывает существенное влияние на механизмы и избирательность сигнальной трансдукции. Важную роль играет трансактивация ЛГ/ХГ-Р, когда гормон связывается с одним из протомеров комплекса, а трансдукция сигнала к внутриклеточным белкам осуществляется через другой протомер, причем последний может быть протомером другого GPCR, например ФСГР.

Определяющую роль в реализации гонадотропинового сигналинга, реализуемого через ЛГ/ХГ-Р, играют два пути [27, 68, 104]: цАМФ-зависимый – ЛГ/ХГ-Р- G_s -белок–аденилатциклаза–цАМФ–протеинкиназа А (РКА)/факторы Ерас-семейства, и фосфолипидный – ЛГ/ХГ-Р- $G_{q/11}$ -белок–фосфолипаза $C\beta$ (PLC β)–диацилглицерин (DAG)/инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3)–протеинкиназа С (PKC)/кальциевый сигналинг. В клетках репродуктивной системы они участвуют в гонадотропин-индуцированной регуляции стероидогенеза, контроле пролиферации, ангиогенеза, апоптоза и других клеточных процессов. Существенную роль играют и β -аррестинные пути, через которые стимулируется каскад митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК) и модулируется цАМФ-сигналинг. Предпочтительность выбора сигнального пути определяется соотношением активных конформаций рецептора, в которых он образует более прочный комплекс с определенным типом G-белка или β -аррестина. Различаются и молекулярные детерминанты, вовлеченные в формирование таких комплексов [26, 28, 101, 113]. Так, в рецепторе ЛГ/ХГ-Р за взаимодействие с G_s -белком в большей степени отвечает С-концевой участок третьей цитоплазматической петли, за взаимодействие с $G_{q/11}$ -белком – его вторая цитоплазматическая петля, за взаимодействие с β -аррестинами – проксимальные к мембране участки С-хвостового домена, хотя в каждом случае связывающая поверхность может включать и другие сегменты цитоплазматических петель и их интерфейсов с ТМД. Немаловажную роль для селективности выбора G-белка играет образование рецепторных комплексов, в том числе гетерокомплексов ЛГ/ХГ-Р с ФСГР-Р [25] (рис. 2).

В случае цАМФ-зависимого пути G_s -опосредуемая активация АЦ гонадотропином приводит к синтезу цАМФ, вторичного посредника, который взаимодействует со специфичными к нему эффекторными белками, в первую очередь с РКА и факторами Ерас-семейства. Основной мишенью РКА являются цАМФ-регулируемые транскрипционные факторы, в том числе фактор CREB, контролирующей экспрессию множества генов. Мишенями факторов Ерас-семейства является

как CREB [141], так и другие эффекторные белки, в том числе Ca^{2+} -кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CaMKII) [96], фосфатидилинозитол-3-киназа [87], компоненты каскада MAPK [63]. Все это расширяет спектр их физиологических эффектов в ответ на стимуляцию цАМФ. Помимо эффекторных компонентов цАМФ-сигналинга, важную, а в ряде случаев и определяющую роль в его регуляции играют фосфодиэстеразы (PDE), вызывающие деградацию цАМФ, тем самым терминирующие передачу цАМФ-сигнала внутрь клетки, а также scaffold-белки, формирующие микродомены, обеспечивающие тесное взаимодействие между компонентами цАМФ-путей. При этом активность PDE может определяться многими факторами, среди которых степень активации АЦ и вызванная этим повышение уровня цАМФ в клетке (короткая отрицательная обратная связь), изменение кальциевого сигналинга и стимуляция форбол-чувствительных изоформ PKC, а также изменение паттерна и активности MAPK, в том числе индуцированных гонадотропинами. В клетках мужской и женской репродуктивной системы присутствуют PDE4, PDE7 и PDE8, которые высоко селективны по отношению к цАМФ и осуществляют гидролиз цАМФ до АМФ. В яичниках изоформы PDE8A и PDE8B в значительных количествах обнаруживаются в клетках теки и ооцитах, PDE4A – в ооцитах и соединительной ткани, PDE4C и PDE4D – в фолликулах, PDE7A и PDE7B – в ооцитах, PDE4B – в наружном слое клеток теки [100]. В клетках Лейдига показана высокая активность изоформ PDE8A и PDE8B, вовлеченных в регуляцию и модуляцию стероидогенных эффектов гонадотропинов. Их ингибирование усиливает трансдукцию ЛГ-сигнала, подобно тому, как это происходит при гормональной стимуляции [109].

В случае фосфолипидного пути, реализуемого при активации $G_{q/11}$ -белка, происходит активация фосфоинозитид-специфичной PLC β , результатом чего является гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата и генерация двух вторичных посредников – мембранно-связанного DAG и водорастворимого IP3. DAG активирует форбол-чувствительные изоформы PKC, в то время как IP3 мобилизует ионы кальция из внутриклеточных депо [86, 142]. Регуляторные эффекты IP3 реализуются путем его связывания с IP3-рецепторами, локализованным в мембране эндоплазматического ретикула, что приводит к утечке ионов кальция из внутриклеточных депо, повышению их концентрации в примембранном пространстве эндоплазматического ретикула и, как следствие, к активации Ca^{2+} -активируемых рианодинных рецепторов, имеющих высокую проводимость для Ca^{2+} [126]. Стремительное повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле приводит к активации большого числа Ca^{2+} -регулируемых белков, в первую

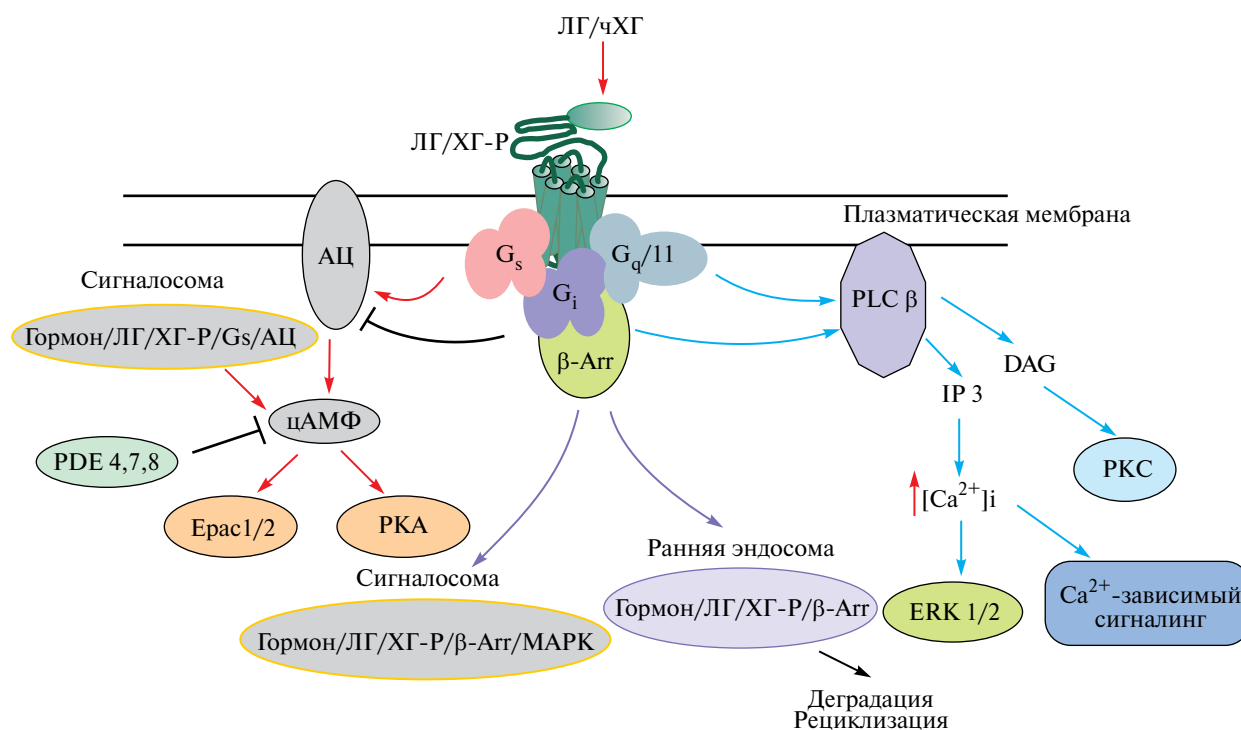


Рис. 2. Сигнальные пути, реализуемые через ЛГ/ХГ-Р, а также эндосомальный сигналинг, осуществляемый с участием гонадотропин-связанного ЛГ/ХГ-Р. *Обозначения:* ЛГ/ХГ-Р – рецептор ЛГ и чХГ; АЦ – аденилатциклаза; цАМФ – 3'-5'-циклический аденозинмонофосфат; PKA – протеинкиназа A; PDE4,7,8 – цАМФ-активируемые фосфодиэстеразы типов 4, 7 и 8; Ерас1/2 – обменные белки типов 1 и 2, активируемые циклическим АМФ; G_s , G_i , $G_{q/11}$ – $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримерные белки, стимулирующие (G_s) или ингибирующие (G_i) АЦ и активирующие кальциевый сигналинг ($G_{q/11}$); β -Арр – β -аррестин; ERK1/2 – киназы типов 1 и 2, регулируемые внеклеточными сигналами; PLC β – фосфоинозитид-специфическая фосфолипаза β ; DAG – диацилглицерин; IP3 – инозитол-3,4,5-трифосфат; $[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация Ca^{2+} ; PKC – форболчувствительные изоформы протеинкиназы C.

очередь Ca^{2+} -кальмодулин-зависимых, среди которых ключевую роль играют различные изоформы Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназы II [86].

Адаптерные белки β -аррестины, которые, как и G-белки, взаимодействуют с ICL и ориентированным внутрь клетки vestibuleм трансмембранного тоннеля, присутствуют во всех типах клеток и тканей и вовлечены в контроль многих физиологических процессов [78, 131]. Важное значение для сигналинга, реализуемого через ЛГ/ХГ-Р, имеют две формы β -аррестинов – β arr1 и β arr2. Их основной функцией является способность нарушать взаимодействие лиганд-активированного GPCR с G-белком и вызывать интернализацию лиганд-рецепторного комплекса в составе ранней эндосомы внутрь клетки [29]. Наряду с этим β -аррестины образуют с GPCR активный комплекс, наделенный собственными сигнальными функциями, который опосредует активацию ряда внутриклеточных эффекторов, в том числе ERK1/2, компонентов MAPK [131].

β -Аррестин-опосредуемая десенситизация GPCR обусловлена взаимодействием β -аррестина с сайтами рецептора, которые после гормональной активации подвергаются фосфорилированию либо специфичными GPCR-киназами (GRK), либо низкоспецифичными PKA и PKC. В цитоплазматических участках GPCR, включая ЛГ/ХГ-Р, имеются несколько сайтов-мишеней для фосфорилирования протеинкиназами, и паттерн фосфорилирования зависит от множества факторов. Это структурные особенности активной, гормон-связанной, конформации рецептора, его способность образовывать комплексы, тип и соотношение G-белков, типовая принадлежность воздействующих на рецептор протеинкиназ, включая различные изоформы GRK. Паттерн фосфорилирования GPCR является “фосфокодом”, предопределяющим дальнейшие сигнальные события с участием β -аррестинов. Тем самым, предпочтительными становятся либо интернализация и последующая деградация или рециклизация GPCR, либо формирование сигналосомы, включающей комплекс GPCR– β -аррестины.

Следует, однако, отметить, что структурные различия ЛГ и чХГ, в том числе в связи с различиями в гликозилировании, и многоцентровое (помимо внеклеточного ортостерического сайта) их взаимодействие с молекулой рецептора, в том числе включающее контакты, прямые или опосредованные, с аллостерическими сайтами, приводят к существенным различиям воздействия обоих гормонов на ЛГ/ХГ-Р и к различиям в их физиологических эффектах. Основные черты сходства и различий сигналинга, индуцированного ЛГ и чХГ, обусловленные аллостерическими механизмами их влияния на активность ЛГ/ХГ-Р, будут рассмотрены ниже.

СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЯ ЭФФЕКТОВ ЧХГ И ЛГ НА СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ

цАМФ-сигналинг

Еще в начале 1990-х гг. было показано, что ЛГ и чХГ стимулируют активность АЦ и повышают уровень цАМФ в ооцитах лягушки и в культуре L-клеток кишечника с экспрессированным ЛГ/ХГ-Р мыши [54, 55]. Они также стимулировали фосфолипазный каскад и вызывали мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Оба процесса были независимы, что свидетельствовало об отсутствии значимого взаимодействия между сигнальными каскадами, реализуемыми через G_s - и $G_{q/11}$ -белки [54, 55]. Повышение уровня цАМФ и подъем внутриклеточной концентрации Ca^{2+} после активации гонадотропинами происходили достаточно быстро, в среднем через 1 мин, что указывает на сходную кинетику этих процессов [4, 120]. G_i -белки, с которыми также способен взаимодействовать ЛГ/ХГ-Р, могут быть вовлечены как в негативную регуляцию АЦ после ее стимуляции гонадотропином (короткая отрицательная обратная связь), так и быть донорами $G\beta\gamma$ -димера, вовлеченного в активацию $\text{PLC}\beta 2$ и $\text{PLC}\beta 3$, ответственных за активацию кальциевого сигналинга и различных изоформ PKC [61]. Активация АЦ с помощью ЛГ и чХГ повышала фосфорилирование фактора CREB и усиливала зависимость от него экспрессию гена, кодирующего холестерин-транспортирующий белок StAR, катализирующий первую стадию стероидогенеза [104]. Тем самым, механизмы влияния ЛГ и чХГ на АЦ характеризуются определенным сходством. Однако эффективность такого влияния различается и весьма существенно [22, 104].

Большинство данных, полученных с использованием клеточных культур, демонстрируют более высокий потенциал чХГ в сравнении с ЛГ в отношении активации АЦ и PKA. В COS-7-клетках с экспрессированным ЛГ/ХГ-Р показано, что ED_{50} для стимулирующего АЦ эффекта чХГ составляет 107 ± 14 пмоль/л, в то время как соответствующий показатель для ЛГ в 5 раз выше [22]. При этом

кинетика активации АЦ имела другой характер, и при использовании чХГ максимальное повышение уровня цАМФ в клетке достигалось через 1 ч и более, в то время как при использовании ЛГ это происходило всего через 10 мин [22]. Повышение уровня цАМФ в НЕК-293 клетках при воздействии чХГ по величине было также существенно выше, чем при воздействии ЛГ [80]. В наибольшей степени различия в эффективности ЛГ и чХГ были выражены в клетках гранулы яичников [26]. Обработка первичной культуры клеток гранулы яичников человека в течение 36 ч с помощью чХГ вызывала более выраженное и устойчивое во времени повышение уровня цАМФ в сравнении с обработкой рекомбинантным ЛГ, взятым в той же дозе. В результате в культуре с обработкой чХГ продукция прогестерона была значимо выше, чем в контроле и в культуре с обработкой ЛГ, что свидетельствует о более выраженной стимуляции овариального стероидогенеза, вызываемого чХГ [22]. Сходные результаты были получены при обработке гонадотропинами культивируемых клеток гранулы яичников козы, где чХГ с существенно большей эффективностью, чем ЛГ, повышал внутриклеточный уровень цАМФ и активировал PKA [56]. Стимулирующий эффект чХГ на уровень цАМФ и цАМФ-зависимое фосфорилирование ERK1/2 при обработке культуры клеток Лейдига также значительно превышал соответствующие эффекты ЛГ, в случае стимуляции продукции цАМФ – почти в 10 раз [104].

Следует отметить, что такие зависимые от цАМФ показатели, как фосфорилирование CREB и экспрессия гена белка StAR в культуре клеток Лейдига и в НЕК273-клетках, обработанных чХГ и ЛГ, значимо не различались [26, 104]. Это может быть обусловлено контррегуляторными влияниями, которые запускаются при длительном повышении концентрации цАМФ, среди которых значимую роль имеет повышение активности цАМФ-специфичных PDE. Не менее интересен тот факт, что продукция прогестерона в различных типах клеток, обработанных чХГ, была существенно выше, чем при обработке ЛГ, в то время как уровни тестостерона при этом различались слабо [105]. Такое нивелирование различий на уровне концентрации тестостерона обусловлено тем, что при воздействии ЛГ для синтеза тестостерона в большей степени реализуется путь, включающий вместо прогестерона в качестве промежуточного метаболита 17-гидроксипрогестерон ($\Delta 5$ -путь), в то время как чХГ обеспечивает синтез больших количеств прогестерона, выполняющего функцию “продукта параллельного накопления”, который затем поступает в менее эффективный $\Delta 4$ -путь синтеза андрогенов. Результатом является выравнивание продукции тестостерона, вызываемое обоими гонадотропинами, на более поздних стадиях тестикулярного

стероидогенеза, несмотря на значительно большее количество прогестерона, накапливаемого в клетках, обработанных чХГ [105].

Изучение эффектов чХГ и ЛГ в гранулезно-лютеиновых клетках человека показало, что чХГ не только с большей эффективностью в сравнении с ЛГ стимулирует фосфорилирование фактора CREB и повышает экспрессию гена, кодирующего StAR, но и в большей степени стимулирует проапоптотические процессы [24]. В отношении регуляции экспрессии гена ароматазы ситуация обратная, и стимулирующий эффект ЛГ через 72 ч после обработки превосходил таковой чХГ, что обуславливало повышение ароматазной активности и стимуляцию конверсии андрогенов в эстрогены, необходимых для поддержания роста фолликулов и ооцита и повышающих выживаемость гранулезно-лютеиновых клеток [24]. Необходимо отметить, что ЛГ также более эффективно в сравнении с чХГ повышал экспрессию генов, кодирующих антиапоптотический белок XIAP и циклин D2, оказывая выраженный антиапоптотический эффект [24]. Это указывает на то, что ЛГ-стимулированные цАМФ-зависимые пути характеризуются в большей степени антиапоптотическим потенциалом, в то время как соответствующие пути, активируемые чХГ, являются триггерами проапоптотических каскадов.

Важным обстоятельством является то, что стимулирующие АЦ эффекты чХГ и ЛГ по-разному модулируются ФСГ. Это обусловлено как гетероди(олиго)меризацией ЛГ/ХГ-Р и структурно близкого ему ФСГР, что меняет эффективность и паттерн их активации гонадотропинами, так и кросс-взаимодействием внутриклеточных каскадов, активируемых ФСГ и гонадотропинами с ЛГ-активностью. С использованием гранулезно-лютеиновых клеток человека показано, что в присутствии ФСГ способность чХГ усиливать продукцию цАМФ повышается в 5 раз, что ведет к усилению фосфорилирования CREB и стероидогенного ответа на чХГ [25]. АЦ эффект рекомбинантного ЛГ в присутствии ФСГ существенно не менялся, вследствие чего совместная обработка клеток с помощью рекомбинантного ЛГ и ФСГ не приводила к значимому повышению фосфорилирования CREB и продукции стероидных гормонов. Интересно, что ФСГ потенцирует стимулирующие эффекты ЛГ (но не чХГ) на активность ERK1/2, ключевого звена каскада MAPK, и на активность Akt-киназы, важнейшего медиатора антиапоптотических процессов, что повышает выживаемость клеток [25]. Эффект ФСГ на чХГ- и ЛГ-индуцированный сигналинг хорошо согласуется с мощным пролиферативным потенциалом эндогенного ЛГ в фолликулярную фазу и после образования трофобласта, а также с сильно выраженным стероидогенным эффектом плацентарного чХГ, что необходимо для

поддержания беременности после выхода из лютеиновой фазы.

При длительном стимулирующем воздействии гонадотропинов на клетки-мишени (от нескольких часов до нескольких дней в зависимости от объекта исследования) отмечается значительное снижение плотности ЛГ/ХГ-Р на поверхности клеток, в основе лежит интернализация лиганд-рецепторных комплексов в составе ранних эндосом во внутриклеточные компартменты. Фактором, который ускоряет процесс интернализации ЛГ/ХГ-Р, является образование значительных по размеру ЛГ/ХГ-Р-содержащих агрегатов [64]. Такие агрегаты значительно быстрее и в больших количествах образуются при связывании ЛГ/ХГ-Р с чХГ, чем при их связывании с ЛГ, и это обуславливает более высокую скорость и интенсивность десенситизации и даун-регуляции ЛГ/ХГ-Р при активации чХГ [62]. В клетках без обработки чХГ значительная часть ЛГ/ХГ-Р локализовалась в крупных мембранных структурах, которые были способны эффективно встраиваться в плазматическую мембрану. Как только чХГ удаляли из среды, крупные агрегаты постепенно диссоциировали и высвобождавшиеся из них ЛГ/ХГ-Р перемещались в мембранные везикулы, обретая способность транслоцироваться в плазматическую мембрану и связываться с гормоном [65]. При этом ЛГ с меньшей интенсивностью индуцировал образование больших ЛГ/ХГ-Р агрегатов, что обеспечивало менее выраженное снижение чувствительности клеток-мишеней к гонадотропинам с ЛГ-активностью и к более быстрому ее восстановлению после десенситизации ЛГ/ХГ-Р, вызванной длительным воздействием гонадотропина [105].

Фосфолипазные пути

Как в семенниках, так и в яичниках, активируемые гонадотропинами фосфолипазные пути, реализуемые через $G_{q/11}$ -белки, играют не менее важную роль в ЛГ-опосредуемом сигналинге, чем цАМФ-зависимые пути [68]. $G_{q/11}$ -опосредуемая активация PLC β необходима для нормального протекания овуляции, обеспечивая надлежащую активацию рецепторов прогестерона и разрыв фолликула [84]. В то же время необходимо отметить, что такие важные для овуляции процессы, как возобновление мейоза, разрастание слоя кумулюсных клеток и овариальный ангиогенез, опосредуемые в основном через ЛГ-активируемые цАМФ-пути, нормально протекают в клетках гранулезы, дефицитных по генам $G_{q/11}$ -субъединиц, т. е. непосредственно от фосфолипазного сигналинга не зависят [84].

В отличие от цАМФ-сигналинга для активации фосфолипазных путей требуются существенно более высокие концентрации гонадотропинов. ЕС₅₀

для чХГ, обеспечивающее активацию PLC β и IP3-опосредуемую мобилизацию кальция из внутриклеточных депо, в 20 раз выше EC₅₀ для чХГ, требуемого для полумаксимальной активации АЦ [146]. Стимулирующее влияние чХГ на накопление IP3 в большей степени выражено при высокой плотности ЛГ/ХГ-Р и снижается при их низкой плотности, что указывает на предпочтительность взаимодействия гормон-активированного ЛГ/ХГ-Р с G_s-, но не с G_{q/11}-белком. Эффективность стимулирующего влияния чХГ на мобилизацию Ca²⁺ через 1 мин после обработки была существенно выше, чем таковая для ЛГ, но со временем различия нивелировались, что обусловлено активацией откачки Ca²⁺ из цитозоля. Вследствие этого интегрированные значения для повышения концентрации Ca²⁺ в цитозоле в ответ на чХГ и ЛГ в течение трехминутного интервала различались слабо [80].

Необходимо различать механизмы, обусловленные активацией PLC β -путей, от механизмов, включающих активацию кальциевых каналов плазматической мембраны L-типа, которые вносят значимый вклад в стероидогенные эффекты гонадотропинов. Важно отметить, что активация этих каналов реализуется в основном через $\beta\gamma$ -димер G-белка, донатором которых являются G_i-белки, также являющиеся мишенями ЛГ и чХГ [70]. При этом вход Ca²⁺ в клетку необходим для пополнения запасов Ca²⁺ во внутриклеточных депо. Первые данные об участии кальциевых каналов плазматической мембраны в стимулирующем эффекте чХГ на экспрессию стероидогенных белков и стероидогенез были получены в эксперименте на опухолевых клетках Лейдига мыши [81]. В Ca²⁺-обогатщенной среде стимулирующий эффект чХГ на экспрессию гена, кодирующего StAR, усиливался в 1.7 раза, и это было ассоциировано со значительным повышением продукции прогестерона. При добавлении во внеклеточную среду комплексобразователей, связывающих Ca²⁺, или блокатора кальциевых каналов верапамила отмечали резкое снижение чХГ-индуцированной стимуляции стероидогенеза [81]. В дальнейшем роль кальциевых каналов L-типа в модуляции гонадотропин-стимулированного стероидогенеза была показана на клетках гранулезы крысы. Было продемонстрировано ингибирующее влияние амфетамина, снижающего концентрацию внутриклеточного Ca²⁺, на стимулированную гонадотропинами экспрессию стероидогенных белков в яичниках и на овариальный стероидогенез в целом [30].

Внутриклеточный кальциевый сигналинг вовлечен не только в стероидогенные эффекты ЛГ и чХГ, но и в реализацию их пролиферативных эффектов, как это показано для ЛГ при действии на клетки эпителиального рака яичников OV207 и OVCAR-3 [85]. В основе пролиферативных эффектов ЛГ лежит активация каскада MAPK, в том

числе его конечного звена ERK1/2, причем ЛГ-индуцированная стимуляция ERK1/2 осуществляется как путем активации кальциевых каналов L-типа, так и через стимуляцию одного из конечных компонентов фосфолипидного пути — протеинкиназы С δ . Индуцированная ЛГ миграция и пролиферация клеток рака яичников подавлялась при ингибировании стимулирующего ERK1/2 эффекта гонадотропина, что может быть достигнуто снижением концентрации Ca²⁺ во внеклеточной среде с помощью комплексобразователей, ингибированием кальциевого тока через плазматическую мембрану с помощью блокатора кальциевых каналов верапамила и путем подавления выброса Ca²⁺ из внутриклеточных депо с помощью дантролена. Стимулирующие эффекты ЛГ на ERK1/2 подавлялись также ингибиторами протеинкиназы С δ [85].

Поскольку чХГ с гораздо более высокой эффективностью активирует цАМФ-пути, то не удивительно, что он с существенно меньшей эффективностью влияет на фосфолипидные пути и ассоциированную с ними активность ERK1/2 и, соответственно, имеет низкий пролиферативный потенциал, более того, он наделен антипролиферативной активностью. В пользу этого свидетельствуют результаты сравнительного исследования длительной экспозиции первичной культуры клеток гранулезы козы с ЛГ и чХГ [56]. ЛГ в значительной степени стимулирует активность DAG-чувствительной PKC и значительно повышает фосфорилирование ERK1/2, что ассоциировано с активацией ERK1/2-опосредуемой пролиферации фолликулярных клеток, в то время как чХГ на эти показатели не влияет и, напротив, снижает пролиферацию клеток гранулезы, действуя через цАМФ-зависимые механизмы [56]. Эти данные свидетельствуют о различном паттерне воздействия ЛГ и чХГ на фосфолипидные пути, вовлеченные в контроль клеточного роста и дифференцировки.

Индукционное чХГ и ЛГ взаимодействие рецептора ЛГ/ХГ с β -аррестинами

После активации ЛГ/ХГ-Р гонадотропином запускается процесс рекрутирования β -аррестинов, результатом чего является интернализация лиганд-рецепторного комплекса в составе ранних эндосом внутрь клетки. Это приводит либо к деградации ЛГ/ХГ-Р, либо к индукции внутриклеточного сигналинга [26]. Механизмы взаимодействия с β -аррестинами для ЛГ/ХГ-Р отличаются от таковых в случае ФСГР, поскольку ЛГ/ХГ-Р способен рекрутировать β -аррестины, находясь в нефосфорилированном состоянии, вследствие чего ЛГ-регулируемые β -аррестинные пути не являются зависимыми от паттерна и активности киназ GRK-семейства [89]. Во взаимодействии ЛГ/ХГ-Р с β -аррестинами вовлечены ICL3 этого рецептора и АДФ-рибозилирующий фактор 6 (ARF6) [28, 89]. В

неактивным, ГДФ-связанном состоянии ARF6 связывается с β -аррестином, и образовавшийся комплекс закоривается в плазматической мембране, будучи доступен для взаимодействия с цитоплазматическими участками ЛГ/ХГ-Р. После активации ЛГ/ХГ-Р гонадотропином происходит образование транзитного комплекса между рецептором и ARF6, что приводит к обмену ГДФ на ГТФ в нуклеотидсвязывающем сайте ARF6. При этом происходит реорганизация комплекса между активной, ГТФ-связанной, формой ARF6 и β -аррестином, в результате чего последний высвобождается из комплекса с ARF6 и связывается с ICL3 ЛГ/ХГ-Р, что и обеспечивает даун-регуляцию и интернализацию лиганд-рецепторного комплекса [116].

Сравнительный анализ влияния ЛГ и чХГ на рекрутирование β -аррестин-опосредуемые эффекты значительно быстрее и при более низких концентрациях. На это указывает EC_{50} для чХГ-индуцированного рекрутирования β arг2 в опухолевых клетках Лейдига мыши (10 нМ), которое в 13 раз ниже, чем для ЛГ (130 нМ). Исходя из величины стимулирующего эффекта на рекрутирование β -аррестина, ЛГ определяют как частичный агонист ЛГ/ХГ-Р, в отличие от чХГ, демонстрирующего активность полного агониста β -аррестин-специфичного сигналинга [105]. Как отмечалось выше, ключевую роль в стимуляции стероидогенеза играют цАМФ-пути, и чХГ является более эффективным активатором стероидогенеза в сравнении с ЛГ, включая стадию синтеза прогестерона. В связи с этим представляет интерес, что β -аррестины положительно регулируют синтез прогестерона гонадотропинами, поскольку снижение их экспрессии с помощью микроРНК ингибирует продукцию этого гормона, прекурсора андрогенов и эстрогенов [105]. Поскольку чХГ более эффективно стимулирует рекрутирование β -аррестинов, то этот его эффект, наряду с более выраженной стимуляцией АЦ, может обеспечивать более высокую стероидогенную активность чХГ, которая, однако, ограничивается стадией синтеза прогестерона.

Более низкая активность ЛГ в отношении β -аррестинов позволяет предотвратить или снизить интернализацию и даун-регуляцию ЛГ/ХГ-Р при длительном воздействии даже сравнительно высоких концентраций ЛГ, сохраняя тем самым чувствительность клеток к эндогенным гонадотропинам и препятствуя истощению пула активных ЛГ/ХГ-Р в плазматической мембране и во внутриклеточных компартментах. Активирующие мутации в ЛГ/ХГ-Р, такие как замена локализованного в ICL3 Asp⁵⁶⁴ на глицин или тирозин, вызывают значительное (в случае Asp⁵⁶⁴Gly пятикратное) повышение интернализации конститутивно активного ЛГ/ХГ-Р внутрь клетки [16]. Активирующие мутации индуцируют те же конформации ЛГ/ХГ-Р, что и чХГ, о

чем свидетельствует отсутствие влияния чХГ на перераспределение мутантных ЛГ/ХГ-Р в мембранных микродоменах, обусловленное взаимодействием с β -аррестинами [77].

Все вышесказанное можно обобщить в виде табл. 1, демонстрирующей черты сходства и различий сигнальных механизмов действия ЛГ и чХГ на клетки-мишени.

N- И O-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ГОНАДОТРОПИНОВ КАК ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

*Число, структура и заряд N-гликанов
и их влияние на функциональную активность
гонадотропинов и их физиологические эффекты*

Ключевую роль для активности гонадотропинов и их сигнальных каскадов играет N-гликозилирование и, в случае чХГ и других ХГ, также O-гликозилирование. Как отмечалось выше (см. рис. 1), α -субъединица, общая для ЛГ и ХГ, подвергается N-гликозилированию по двум сайтам (Asn⁵², Asn⁷⁸), в то время как β -ЛГ и β -ХГ имеют, соответственно, один и два сайта. Наряду с различиями в степени гликозилирования и локализации гликанов в α - и β -субъединицах не менее важную роль в гонадотропин-индуцированной сигнальной трансдукции играют природа и заряд олигосахаридных цепей. Так, в α - и β -субъединицах ЛГ и гипофизарной формы чХГ значительная часть олигосахаридных цепей содержат терминальные остатки сульфатированного GalNAc, которые несут значительный отрицательный заряд, в плацентарном чХГ и в α - и β -субъединицах ФСГ на концах N-гликанов локализованы в основном остатки сиаловых кислот, отрицательный заряд которых менее выражен [15]. При этом суммарный заряд N-гликана определяется количеством и соотношением концевых гликозильных остатков, что, в свою очередь, зависит от степени разветвленности N-гликана. N-гликаны в α - и β -субъединицах ЛГ и чХГ менее разветвленные, чем в ФСГ, и это не только вносит значительный вклад в результирующий заряд этих субъединиц, но и определяет их пространственную конфигурацию и способность связываться с ЛГ/ХГ-Р.

Структура N-гликанов в α - и β -субъединицах, образующих димерный гонадотропин, может сильно различаться, что обусловлено различиями в их посттрансляционном процессинге, в том числе в машинерии их N-гликозилирования, а также в интенсивности обмена и реассоциации этих субъединиц. С учетом высокой вариабельности гликозилирования α - и β -субъединиц гонадотропинов [19, 34, 49], общее число гликоформ $\alpha\beta$ -гетеродимеров ЛГ и ХГ может даже у одного организма быть очень

Таблица 1. Сходство и различия в активации сигнальных путей ЛГ и чХГ в клетках-мишенях

Путь	Сходство	Различия
цАМФ-сигнальный путь	Действуя на тестикулярные клетки Лейдига и фолликулярные клетки яичников, ЛГ и чХГ посредством G_s -белков стимулируют АЦ, повышают уровень цАМФ внутри клеток, активируют ПКА и цАМФ-зависимые эффекторные белки и транскрипционные факторы, в том числе фактор CREB	АЦ эффект чХГ более выражен, реализуется в более низких концентрациях, значителен в клетках гранулезы, на которые ЛГ действует слабо. чХГ через цАМФ-зависимые механизмы стимулирует ERK1/2, что обуславливает его проапоптотический эффект, в то время как ЛГ через АЦ-систему не активирует MAPK и демонстрирует антиапоптотический эффект
Фосфолипазный путь	Оба гормона посредством $G_{q/11}$ -белков и PLC β повышают уровень кальция в клетке, стимулируя его выход из внутриклеточных депо, и активируют форбол-чувствительные изоформы PKC. Для активации фосфолипазного пути требуются более высокие концентрации ЛГ и чХГ, чем для активации АЦ-пути	Эффект чХГ на фосфолипазный каскад менее выражен, чем таковой ЛГ, и в значительной степени зависит от концентрации внеклеточного кальция. Активируя $G_{q/11}$ -белки в клетках гранулезы яичников, ЛГ индуцирует PKC-зависимую активацию ERK1/2, результатом чего является его мощный митогенный эффект, который не выявляется у чХГ
β -аррестиновый путь	Оба гонадотропина стимулируют рекрутирование β -аррестинов, что приводит к эндоцитозу активированного гормоном ЛГ/ХГ-Р, а также стимулирует эндосомальный β -аррестиновый сигналинг	Стимулирующий эффект чХГ на рекрутирование β -аррестинов более выражен и реализуется в более низких концентрациях, чем таковой ЛГ. Это приводит к быстрому ослаблению чувствительности ЛГ/ХГ-Р к гормональной стимуляции, а также к деградации рецепторов, в том числе вследствие мощной агрегации в эндосомах

значительным и исчисляться десятками, сотнями и даже тысячами вариантов [49]. Взаимодействие гонадотропинов с ЛГ/ХГ-Р сильно зависит от их гликозилирования, вследствие чего результирующий эффект воздействия гонадотропина на клетку-мишень находится в прямой зависимости от соотношения и паттерна его гликоформ. Учитывая особенности расположения *N*-гликанов в гонадотропинах, а также *O*-гликанов в *C*-концевой части ХГ, имеются основания считать, что гликозильные компоненты способны взаимодействовать с сайтами рецептора, отличными от его ортостерического сайта, тем самым аллостерически влияя на сродство гормона к ЛГ/ХГ-Р, на предвзятость сигналинга и эффективность клеточного ответа [19, 28, 50, 133]. Это имеет большое значение для оценки биологической активности рекомбинантных и природных форм чХГ, в том числе выделенных из различных источников и различными способами, а также в оценке отличий рекомбинантного ЛГ от эндогенного ЛГ при их использовании во вспомогательных репродуктивных технологиях [49].

Необходимость соответствия природным гликоформам рекомбинантных форм ЛГ и чХГ, а также гормонов с ЛГ-активностью, синтезированных химическим путем, является одной из наиболее сложно разрешимых проблем современной фармакологии, будучи основным препятствием для создания физиологически релевантных препаратов ЛГ и чХГ [48, 49].

Большинство данных по влиянию *N*-гликозилирования на связывающие характеристики и активность гонадотропинов получены для ФСГ, что во многом предопределено интенсивной разработкой препаратов ФСГ для использования во вспомогательных репродуктивных технологиях [19]. И эти данные свидетельствуют о том, что *N*-гликаны являются важнейшими аллостерическими модуляторами ФСГ-сигналинга, контролируя его эффективность и предвзятость.

Несмотря на отличия в структурной организации ФСГ и его рецептора, а также *N*-гликанов, модифицирующих α - и β -ФСГ, от таковых ЛГ, чХГ и ЛГ/ХГ-Р, основные закономерности влияния

N-гликозилирования на активность справедливы и для гонадотропинов с ЛГ-активностью. Так, нормально или слабо гликозилированные формы чХГ, с большей эффективностью стимулируют цАМФ-пути, и, как следствие, их действие в основном направлено на стимуляцию стероидогенеза, в то время как гипергликозилированные формы чХГ в этом отношении менее активны [73], а их эффекты реализуются в направлении стимуляции митогенных путей, в которые могут быть вовлечены рецепторы, отличные от ЛГ/ХГ-Р [11]. При этом важную роль играет стабильность чХГ, поскольку нормально или слабо гликозилированные формы гормона имеют более короткое время полужизни в кровотоке, в отличие от гипергликозилированных форм, в которых сайты для протеолитического расщепления экранированы множеством гликозильных групп [31]. Важную информацию дает изучение взаимодействия гликозилированных форм ТТГ с ТТГ-Р, структурно близких ЛГ/ХГ-Р [132]. Интересен тот факт, что гипергликозилированные (но не нормально гликозилированные) формы чХГ способны стимулировать ТТГР, повышая уровень тиреоидных гормонов, чем может быть обусловлен повышенный риск выкидышей и развитие аутоиммунных заболеваний щитовидной железы на ранних сроках беременности [119], особенно в случае экспрессии варианта ТТГР с заменой Val⁵⁹⁷ на изолейцин в ТМД, имеющем гиперчувствительность к чХГ [21].

В пользу аллостерической природы влияния *N*- и *O*-гликозилирования гонадотропинов на их активность свидетельствуют следующие факты.

N-гликаны в молекулах гонадотропинов аллостерически модулируют их связывание с рецептором

Постулируется модулирующая роль *N*-гликанов в процессе связывания гормона с рецептором, без их взаимодействия с ортостерическим сайтом. Предполагается, что высокоаффинное связывание гликопротеинового гормона с ортостерическим сайтом рецептора должно включать почти исключительно специфическое взаимодействие между его АКО и их кластерами, т. е. основываться на принципах белок-белкового взаимодействия [67, 94]. Взаимодействия между *N*-гликаном и полипептидной цепью не могут быть высокоспецифичными и высокоаффинными, поскольку структура *N*-гликанов вариабельна, и потому они могут быть вовлечены во взаимодействие с ортостерическим сайтом лишь опосредованно, модулируя его связывание через аллостерические механизмы. Действительно, дегликозилированные формы гонадотропинов не только сохраняют способность связываться с рецептором, но и в ряде случаев их аффинность превосходит таковую гликозилированных форм [18, 66]. В согласии с вышесказанным

находятся данные об отсутствии *N*-гликанов в области сайтов связывания гипофизарных гликопротеиновых гормонов и их рецепторов. У всех изученных видов позвоночных в рецепторах ЛГ/ХГ-Р, ФСГР и ТТГР имеются четыре области, свободные от *N*-гликанов, в том числе две на вогнутых гранях LRR-субдомена, ответственных за связывание гормона [94]. В то же время имеются основания считать, что *N*-гликаны могут влиять на взаимное расположение и эффективность взаимодействия между связывающими сайтами гормона и рецептора, в том числе путем изменения взаимной ориентации эктодомена и ТМД, и это влияет на паттерн активных конформаций лиганд-рецепторного комплекса [19, 83].

и селективность сигнальной трансдукции N-гликозилирование гонадотропинов влияет на эффективность

N-гликозилирование непосредственно влияет на эффективность регуляторного влияния гонадотропинов на внутриклеточные эффекторы, включая цАМФ-зависимые каскады и кальциевый сигналинг, и, как следствие, на физиологический ответ. Наличие или отсутствие *N*- и (или) *O*-гликанов способно менять фармакологический профиль гонадотропина, что впервые было продемонстрировано еще более 30 лет назад. Было показано, что дегликозилирование приводит к снижению или полной потере специфической активности [106], а в ряде случаев дегликозилированные формы гонадотропинов приобретали свойства антагонистов ЛГ/ХГ-Р [45]. При этом связывание дегликозилированных гонадотропинов с рецептором сохранялось, хотя его аффинность и менялась, и это указывает на аллостерический характер влияния гликанов в молекуле ЛГ или чХГ на активацию ЛГ/ХГ-Р. Одним из механизмов, которые могут лежать в основе влияния степени и паттерна *N*-гликозилирования гонадотропинов на их способность активировать рецептор, является воздействие *N*-гликанов на взаимное расположение эктодомена и ТМД. В случае стабилизации *N*-гликозилированным гонадотропином активной конформации рецептора, в которой обеспечивается эффективное взаимодействие между участками шарнирной области эктодомена и ECL1 и сегментами внешнего вестибуля ТМД, происходит запуск сигнального каскада, и гонадотропин функционирует как полный или частичный агонист. В противном случае, когда гонадотропин с другим паттерном *N*-гликозилирования препятствует такому взаимодействию, он функционирует как антагонист или инверсионный агонист.

Механизмы этого явления подробно изучены для ФСГ-Р и ТТГ-Р [19, 46]. В отношении ЛГ/ХГ-Р установлено, что при его связывании с чХГ происходит вращение эктодомена по механизму,

сходному с таковым у ФСГР и ТТГР. По данным криогенной электронной микроскопии, для ЛГ/ХГ-Р и ТТГР при переходе из активной в неактивную конформацию показаны сходные углы вращения эктодомена — на 45° и 38° соответственно [41, 46]. Соразмерность *N*-гликанов в положении Asn⁵⁶ α -субъединиц ЛГ, чХГ и ТТГ показывает, что они выполняют в процессе активации рецепторов сходную функцию.

N-гликаны влияют на образование
гонадотропиновых комплексов и характер
их взаимодействия с рецепторами

Продemonстрирована важная роль *N*-гликанов в формировании и стабильности гетеродимерных комплексов гонадотропинов, что определяет их аффинность к рецептору, влияет на предвзятость трансдукции, являясь одним из аллостерических механизмов гонадотропинового сигналинга, а также существенно для биодоступности и фармакокинетических характеристик гонадотропинов. Длительная инкубация клеточных культур с гибридом N(56)dg-eLHalpha:eFSHbeta, в котором α -ЛГ лошади дегликозилирована по Asn⁵⁶, приводит к неустойчивому димерному комплексу с β -ФСГ и утрате активности гибридного гонадотропина [20]. В то же время для чХГ, β -субъединица которого была подвержена множественному *O*-гликозилированию, *N*-гликозилирование α -чХГ по Asn⁵⁶ слабо влияло на стабильность чХГ-гетеродимера, хотя было критично для его активности. Константы диссоциации для комплексов β -чХГ с нормальной и дегликозилированной по Asn⁵⁶ α -чХГ были сходными, а данные КД-спектроскопии и ЯМР демонстрировали лишь небольшие различия для этих комплексов, в основном связанные с локальными изменениями пространственной организации кластера АКО в β -чХГ, потенциально контактирующих с *N*-гликаном в сайте Asn⁵⁶ [42]. При этом активность чХГ-гетеродимера с Asn⁵⁶-дегликозилированной α -чХГ была резко снижена, что подтверждает важность *N*-гликана в этой позиции для взаимодействия с рецептором, в соответствии с моделью, предложенной для ФСГР и ТТГР [19, 46].

Гипергликозилирование вносит еще более значимый вклад, чем дегликозилирование, в способность ХГ образовывать гетеродимерные комплексы и играет критическую роль в паттерне его активности [103]. В случае α -субъединицы чХГ показано, что избыточное гликозилирование нарушает ее ассоциацию с β -чХГ [13]. Мономерные α -чХГ, содержащие объемные *N*-гликаны, препятствующие комплексообразованию, секретируются плацентой, гипопизомом, некоторыми опухолями [103], а также в значительных количествах идентифицированы в семенной жидкости [140]. *N*-гликаны в гипергликозилированных субъединицах чХГ,

которыми обогащена семенная жидкость, содержат большое количество остатков фукозы, что существенно меняет конформационную подвижность и гликанов, и субъединиц чХГ [97]. Гипергликозилированные α -ХГ могут функционировать в как в форме мономеров, так и гомодимеров α -ХГ– α -ХГ, что также справедливо для гипергликозилированных β -ХГ. Гипергликозилирование β -ХГ не только нарушает стабильность их комплекса с α -субъединицей, но и способствует генерации свободных форм β -ХГ и их гомодимеров β -ХГ– β -ХГ. При этом гипергликозилированный ХГ, включающий популяцию мономерных β -ХГ, не только с более низким сродством взаимодействует с ЛГ/ХГ-Р [73], но и приобретает способность стимулировать рецепторы трансформирующего фактора роста- β (TGF β) [31, 95]. Стимуляция этих рецепторов, наряду с опосредуемой через ЛГ/ХГ-Р стимуляцией цАМФ-путей и различных изоформ РКС, приводит к активации таких эффекторов, как ERK1/2, Akt-киназа и белки SMAD-семейства [124]. Этим обусловлен мощный митогенный и антиапоптотический потенциал гипергликозилированных форм β -ХГ, который реализуется независимо от сигнальных путей, включающих ЛГ/ХГ-Р, и вносит определяющий вклад в рост и дифференцировку эмбриона на ранних стадиях его развития.

Различная рецепторная специфичность слабо и высоко гликозилированных изоформ чХГ обусловлена различиями в доступности определенных участков молекулы для взаимодействия с ЛГ/ХГ-Р. Антитела В-152, которые специфически опознают *O*-гликаны, привязанные к остатку 132 в С-концевой части β -чХГ, не способны преципитировать с гетеродимерами чХГ [12], что указывает на высвобождение С-концевого участка в гипергликозилированных формах чХГ либо вследствие диссоциации β -чХГ из димерного комплекса, либо вследствие значительного изменения конформации последнего, обеспечивающего презентацию этого участка для взаимодействия с антителами. Гипергликозилирование снижает аффинность чХГ к ЛГ/ХГ-Р и ослабляет его стимулирующие эффекты в отношении эффекторных систем, что может рассматриваться как аллостерическое влияние *N*- и *O*-гликанов на рецепторное связывание и специфическую активность гормона. Так, ЕС₅₀ для активации ЛГ/ХГ-Р в случае нормально гликозилированного плацентарного чХГ составляет 3.3 пМ, в то время как для гипергликозилированных форм — от 7.1 до 14.0 пМ [73]. Тем самым, избыточное количество гликанов в чХГ выполняет функции “связанного” негативного аллостерического модулятора (NAM).

N-гликозилирование гонадотропинов аллостерически влияет на стабильность рецепторных комплексов

N-гликозилирование гонадотропинов также влияет на стабильность гетероди(олиго)мерных комплексов, образуемых их рецепторами. Несмотря на то, что рецепторы гонадотропинов могут функционировать как мономеры, образование гомо- и гетероди(олиго)мерных рецепторных комплексов во многом предопределяет их активность, причем соотношение и структурная организация таких комплексов играют важную роль в паттерне сигнальной трансдукции, особенно для гетеродимеров, образуемых ЛГ/ХГ-Р и ФСГР. В стабилизации рецепторных комплексов могут принимать участие различные типы гликан-опосредуемых взаимодействий, включая взаимодействия типа гликан-белок и гликан-гликан, которые способны стабилизировать или, напротив, дестабилизировать ассоциацию протомеров в составе комплекса или в комплексах более высокого порядка. Для ФСГР показано, что его связывание с высокими концентрациями гипогликозилированных форм ФСГ, содержащих 18 и 21 кДа β -ФСГ, приводит к возрастанию доли мономерных форм ФСГР, до 80% в ФСГ-связанном состоянии, причем этот эффект реализуется через 2 мин и положительно коррелирует с активацией АЦ [1]. Полностью гликозилированный ФСГ, включающий 24 кДа β -ФСГ, в этом отношении менее эффективен, а повышение доли мономерной формы ФСГР и активация АЦ в этом случае достигаются существенно позднее. Дегликозилированная форма ЛГ лошади со смешанной ЛГ- и ФСГ-подобной активностью, включающая α -ЛГ, дегликозилированную по Asn⁵⁶, и β -ЛГ, лишенную C-концевого сегмента 121–149, содержащего сайты для *O*-гликозилирования, напротив, повышает долю олигомерной формы рецептора до 50% и выше. К такому же результату приводит воздействие на ФСГР низких концентраций слабо гликозилированных форм ФСГ [1]. Все это свидетельствует в пользу зависимости степени олигомеризации ФСГР не только от степени *N*-гликозилирования гонадотропина, но и от его концентрации, а также указывает на взаимосвязь между *N*-гликозилированием и кинетическими показателями комплексообразования ФСГР. Все вышесказанное справедливо и для ЛГ/ХГ-Р, особенно в аспекте его гетеродимеризации с ФСГР, и это требует дальнейших исследований.

N-гликозилирование влияет на предвзятость гонадотропинового сигналинга

Степень и паттерн *N*-гликозилирования гонадотропинов может оказывать значимое влияние на предвзятость сигнальной трансдукции, а также предопределять судьбу лиганд-рецепторного комплекса в клетке, которая в значительной степени

зависит от характера взаимодействия лиганд-активированного ЛГ/ХГ-Р и других рецепторов гипофизарных гликопротеиновых гормонов с β -аррестинами. Наибольшее число доказательств по влиянию *N*-гликозилирования на предвзятость внутриклеточного сигналинга и избирательность клеточного ответа, а в более широком смысле на фолликулогенез и оогенез, относится к ФСГ и его сигнальным каскадам [1, 32, 69, 139]. При этом имеются, хотя и косвенные, данные в отношении гонадотропинов с ЛГ-активностью. Так в середине менструального цикла у женщин, на стадии индукции овуляции, наблюдается не только значимое повышение суммарной концентрации ЛГ-гликоформ, но и превалирование доли слабо гликозилированной формы гормона, содержащей только два *N*-гликана в α -субъединице (в среднем 62–65%). Это синхронизировано с мощной активацией ЛГ-зависимых сигнальных путей в овариальных клетках, приводящих к разрыву фолликула [133]. В то же время, в раннюю фолликулярную фазу, а также в лютеальную фазу общая концентрация ЛГ в крови и доля его слабо гликозилированной формы резко снижены, что совпадает с ослаблением ЛГ-сигналинга в яичниках. К 14-му дню цикла меняется соотношение сиаловых кислот и сульфатированного GalNAc в *N*-гликанах, определяющих суммарный отрицательный заряд ЛГ, и это также вносит значительный вклад в их взаимодействие с ЛГ/ХГ-Р [133].

При изучении ЛГ лошади, наделенного как ЛГ-, так и ФСГ-подобной активностью, были получены доказательства предвзятости сигналинга его гликозилированных и дегликозилированных по Asn⁵⁶ форм по отношению к цАМФ-зависимому и β -аррестинному путям, которые опосредуются через активацию ФСГР [129]. При этом дегликозилирование приводило к значительному снижению по сравнению с нативым гормоном, стимулирующего эффекта ЛГ лошади на активность АЦ и нижележащих цАМФ-зависимых каскадов, и в то же время сохраняло и даже потенцировало активацию β -аррестинового пути, результатом чего были активация ERK1/2 и повышение фосфорилирования рибосомального белка рpS6. Фосфорилирование рpS6 при этом осуществлялось независимо от РКА по сигнальному пути, включающему mTOR-опосредуемое фосфорилирование и активацию рибосомальной киназы p70S6K [130].

Таким образом, гликозилирование оказывает значимое влияние на устойчивость гетеродимерных комплексов гонадотропинов и их рецепторов на связывающие характеристики ЛГ/ХГ-Р, на предвзятость сигнальной трансдукции, причем в случае гипергликозилированных форм β -ХГ меняется рецепторная специфичность гонадотропинов, которая при повышении степени гликозилирования смещается от ЛГ/ХГ-Р к рецепторам TGF β . Не

исключено и влияние на образование лиганд-рецепторного комплекса *N*-гликозилирования внеклеточных участков самого ЛГ/ХГ-Р. При этом не всегда возможно разделить аллостерические эффекты гликозилирования от стерических эффектов, влияющих на доступность сайтов взаимодействия гонадотропина и его рецептора, от влияния гликозилирования на посттрансляционный процессинг и секреторную активность гонадотропинов, а также на процессинг и транслокацию в мембрану ЛГ/ХГ-Р. К тому же характер влияния *N*-гликанов в значительной степени определяется не только их количеством и локализацией, но и типом гликозилирования и химической структурой *N*-гликанов (соотношение сиаловой кислоты и сульфатированного GalNAc, определяющее заряд *N*-гликанов, наличие остатков фукозы, определяющих их конформационную жесткость, и др.). Предпринимались попытки разделить функции *N*- и *O*-гликозилирования в регуляции активности и контроле структурной организации гонадотропинов [45], но до сих пор это остается трудноразрешимой задачей.

Важно, что гликозилирование критически влияет на фармакокинетику гонадотропинов и их устойчивость к протеолитической деградации, что также отражается на эффективности их регуляторного влияния на внутриклеточный сигналинг. Кроме того, при осложненной беременности и в условиях репродуктивных дисфункций, а также при приеме различных препаратов, включая контрацептивы, наблюдаются существенные изменения паттерна гликозилирования, что неизбежно сказывается на фармакокинетики, биодоступности и паттерне гонадотропинов с ЛГ-активностью, в первую очередь различных форм чХГ, и опосредует различные эффекты гликоформ ЛГ и чХГ на стероидогенез, фолликулогенез, оогенез и эмбриогенез [43, 134].

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ КАК АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ РЕЦЕПТОРА ЛГ/ХГ

Образование гомо- и гетероди(олиго)мерных комплексов GPCR, а также комплексообразование рецепторов с другими компонентами сигнальной трансдукции (*G*-белки, β -аррестины) играет важную роль в сигнальной трансдукции [110]. Несмотря на то, что большинство этих сведений относятся к GPCR класса C, комплексообразование играет важную роль и для GPCR класса A, к которому относится ЛГ/ХГ-Р. GPCR класса A активны преимущественно в мономерной форме, в то время как образование комплексов обусловлено переходом рецептора в неактивное состояние и(или) необходимо для модуляции связывания гормона и его эффективности [51, 92]. Гомоди(олиго)меризация

может быть вовлечена в процессы десенситизации, процессинга и транслокации рецепторов. Образование комплексов обеспечивает механизм *транс*-активации GPCR, внося существенный вклад в предвзятость сигнальной трансдукции, что в наибольшей степени проявляется при образовании гетерокомплексов. Механизмы, опосредующие эффекты протомеров на активность образуемых ими комплексов, включают в качестве основного компонента аллостерические влияния [51, 92]. Само образование комплексов находится под контролем аллостерических регуляторов различной природы, специфично взаимодействующих с сайтами в протомерах, которые формируют контакты между ними, в том числе с сайтами, взаимодействующими с мембранными липидами [137].

В случае гонадотропинов имеются различные модели, описывающие возможную роль и оценивающие вклад комплексообразования в регуляцию активности их рецепторов. Это иллюстрируется динамичным паттерном мономерных и олигомерных форм ЛГ/ХГ-Р, их взаимными переходами при связывании рецептора с лигандами и в процессе активации [41, 71, 108], а также существованием и специфичной активностью гетеродимерных комплексов, образуемых ЛГ/ХГ-Р и ФСГР [23, 27, 47, 70, 75, 82].

В базальном состоянии основная популяция ЛГ/ХГ-Р (около 60%), как и ФСГР (около 70%), представлена мономерными формами [71]. При активации гормоном доля мономерных форм повышается, хотя и в небольшой степени, и это обусловлено образованием активированного комплекса, в котором ЛГ/ХГ-Р представлен мономером [41]. В неактивном состоянии ЛГ/ХГ-Р образуют преимущественно гомоолигомерные, трех- и тетрамерные комплексы, в то время как доля гомодимеров существенно ниже. Если в мономерном состоянии лиганд-связанный ЛГ/ХГ-Р активирует нижележащие эффекторы по механизму *цис*-активации, то в составе комплексов — по механизму *транс*-активации [71].

Исследование механизмов образования ди- и олигомерных комплексов ЛГ/ХГ-Р показало ключевую роль в этом межспиральных контактов, образуемых ТМ каждого из протомеров, причем для различных комплексов набор таких взаимодействий, хотя и в небольшой степени, отличается. При изучении различных пар протомеров ЛГ/ХГ-Р была показана определяющая роль в комплексообразовании контактов между спиралями ТМ4 и ТМ1, а также межспиральных контактов ТМ3-ТМ3 и ТМ5-ТМ5 [71]. В пользу вовлечения ТМ в стабилизацию гомоди(олиго)мерных комплексов свидетельствуют результаты изучения химерных ЛГ/ХГ-Р, в том числе лишенных эктодомена или его интерфейса с ТМД [98]. Важно, что ТМД также вовлечен в ди(олиго)меризацию ЛГ/ХГ-Р, в том

числе в условиях его активации гонадотропином. Индуцированные гонадотропином конформационные изменения, возникающие в LRR-субдомене и шарнирной области эктодомена, распространяются на ТМД, что меняет паттерн и эффективность взаимодействий между ТМ протомеров, определяя стабильность рецепторного комплекса [147]. В этом случае влияние связанного с ЛГ или чХГ эктодомена одного протомера на свободный от лиганда эктодомен другого протомера осуществляется не напрямую, а через посредство индуцированных связыванием гонадотропина изменений в ТМД протомеров и взаимодействий между ними [147].

В отношении оценки аллостерического влияния комплексообразования на активность ЛГ/ХГ-Р наибольший интерес представляют исследования гетеродимерных комплексов между ЛГ/ХГ-Р и ФСГР, тем более что в их составе активность ЛГ/ХГ-Р существенно варьирует и характеризуется предвзятым сигналингом. Имеются данные, указывающие на образование гетеродимеров между ЛГ/ХГ-Р и ФСГР и на их роль в контроле стероидогенеза и фолликулогенеза [23], хотя до сих пор ведутся споры об образовании стабильных гетеродимеров ФСГР–ЛГ/ХГ-Р [27].

Связывание ФСГ с комплексом ФСГР–ЛГ/ХГ-Р по механизму *транс*-активации вызывает стимуляцию несвязанного с лигандом ЛГ/ХГ-Р, тем самым запуская ЛГ-зависимые каскады даже в отсутствие значимых количеств ЛГ или чХГ. Может реализоваться и обратная ситуация. Функционирование таких комплексов имеет критическое значение для ФСГ-зависимых стадий фолликулогенеза, включая созревание антральных фолликулов. На этих стадиях число ЛГ/ХГ-Р и концентрация ЛГ в крови очень низкие и недостаточны для эффективного синтеза андрогенов. В то же время, андрогены являются прекурсорами для эстрогенов, значительные количества которых необходимы для роста и развития антрального фолликула [144]. На ранних стадиях развития антрального фолликула тека-клетки, которые экспрессируют ЛГ/ХГ-Р и продуцируют андрогены, еще не в полной мере дифференцированы от клеток гранулезы, которые не являются ЛГ-компетентными. Предполагают, что на преантральной стадии фолликулогенеза существуют клетки, которые наделены свойствами и клеток теки, и гранулезных клеток, обогащены ФСГР и экспрессируют лишь небольшие количества ЛГ/ХГ-Р [91]. Поскольку экспрессия ЛГ/ХГ-Р и уровень ЛГ на преантральной стадии не достаточны для обеспечения синтеза такого количества андрогенов, которое необходимо для поддержания высокого уровня эстрогенов, то за ЛГ-подобные эффекты могут отвечать гетерокомплексы, функционирующие по описанному выше принципу

ФСГ-индуцированной *транс*-активации ЛГ/ХГ-Р [23, 27, 47, 70, 75, 82].

В пользу функционирования ФСГР–ЛГ/ХГ-Р гетероди(олиго)меров свидетельствуют следующие факты. У женщин с инактивирующими мутациями в гене β -ЛГ фолликулогенез до стадии антрального фолликула протекает нормально, и это сопровождается нормальным уровнем андрогенов и эстрогенов [3, 102]. В 1990-е гг. были получены данные, что препараты ФСГ вызывают рост и созревание фолликулов и образование желтых тел у гипofизэктомированных крыс и мышей [128], причем нокаут гена, кодирующего ЛГ/ХГ-Р, предотвращал эти эффекты ФСГ [99]. Тем самым, на ранних стадиях развития антрального фолликула ЛГ/ХГ-Р в большей степени, чем гонадотропины с ЛГ-активностью, необходим для поддержания андрогенного статуса, обеспечивающего нормальное протекание фолликулогенеза [23].

Образование гетерокомплексов ФСГР–ЛГ/ХГ-Р было подтверждено с помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии и других методов [47, 68, 75, 82]. Гетеродимер ФСГР–ЛГ/ХГ-Р был стабилизирован, в первую очередь, посредством взаимодействия внешних поверхностей ТМ5, ТМ6 и ТМ7, которые включают ряд аллостерических сайтов, контактирующих с липидной фазой мембраны. Эндогенными регуляторами аллостерических сайтов GPCR, контактирующих с липидной фазой мембраны, могут быть мембранные липиды, холестерин и фосфолипиды, что позволяет через изменение липидного состава мембраны влиять на активность рецепторов, а также на образование ими ди(олиго)мерных комплексов. С другой стороны, вовлечение аллостерических сайтов, расположенных на боковой поверхности ТМД, во взаимодействие между протомерами рецепторного комплекса не только меняет конформацию и подвижность ТМД и его интерфейсов с эктодоменом и ICL, но и экранирует сайты взаимодействия с мембранными липидами и другими гидрофобными молекулами, способными специфично связываться с такими сайтами. Это может лежать в основе взаимосвязи между физико-химическими и структурными особенностями липидного матрикса мембраны и функциональным состоянием GPCR.

Образование гетерокомплексов ФСГР–ЛГ/ХГ-Р влияет на предвзятость сигнальной трансдукции, ослабляя цАМФ-пути и усиливая фосфолипазные пути [47, 70]. Стимуляция гетеродимерных комплексов ФСГР–ЛГ/ХГ-Р с помощью ЛГ или чХГ и с помощью ФСГ приводит к значительному ослаблению стимулирующего АЦ сигнала [47] и при этом усиливает сигналы, осуществляемые через $G_{q/11}$ -белки, опосредующие активацию PLC β [70]. Последнее обусловлено тем, что при ассоциации лиганд-активированного ЛГ/ХГ-Р с ФСГР происходит реорганизация комплекса ЛГ–ЛГ/

ХГ-Р- $G_{q/11}$ -белок, обеспечивающая более эффективное проведение сигнала по этому пути [70]. Наряду с $G_{q/11}$ -субъединицей, при гетеродимеризации ФСГР-ЛГ/ХГ-Р в ЛГ-индуцированную стимуляцию кальциевого сигналинга вовлечен и $G\beta\gamma$ -димер, причем его действие реализуется путем открытия кальциевых каналов плазматической мембраны, хотя не исключены и другие, независимые от $G\beta\gamma$ -димера, механизмы активации. В пользу значительного вклада внеклеточного Ca^{2+} в эффекты ЛГ в условиях ассоциации ЛГ/ХГ-Р с ФСГР свидетельствуют ослабление эффекта гонадотропина на кальциевый сигналинг при снижении концентрации Ca^{2+} во внеклеточном пространстве, а также ингибирующее влияние на этот эффект ингибиторов кальциевых каналов [70]. Тем самым, свободный от лиганда ФСГР является РАМ для ЛГ-индуцированной стимуляции $G_{q/11}$ -белка и одновременно с этим НАМ для активации АЦ системы, демонстрируя свойства предвзятого аллостерического модулятора.

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ ЛГ/ХГ-Р

Помимо ортостерического сайта, вовлеченного в высокоаффинное связывание гонадотропинов, в ЛГ/ХГ-Р имеются аллостерические сайты, локализованные в различных локусах молекулы, в том числе в верхней половине ТМД, которые при связывании ЛГ и чХГ остаются свободными [75, 110]. Внутри трансмембранного тоннеля ЛГ/ХГ-Р локализованы два аллостерических сайта — основной и модулирующий его активность [2, 60]. Первый сформирован внутренними поверхностями ТМ4, ТМ5, ТМ6 и ТМ7 [58, 79], в то время как второй образован ТМ1, ТМ2, ТМ3 и ТМ7 [2]. Оба сайта физически перекрываются между собой. Следствием этого является обеспечение широкого фармакологического диапазона аллостерической регуляции ЛГ/ХГ-Р. В процессе разработки низкомолекулярных лигандов трансмембранных аллостерических сайтов ЛГ/ХГ-Р выявлены наделенные как собственной активностью полные и инверсионные агонисты, так и аллостерические модуляторы, которые по фармакологической активности могут быть отнесены к РАМ и НАМ [75, 110]. Наряду с этим выявлены аллостерические регуляторы с активностью аго-РАМ [110].

Первые низкомолекулярные лиганды ЛГ/ХГ-Р были разработаны голландскими учеными в 2002 г., которые синтезировали производные тиено[2,3-*d*]пиримидина (ТП) с активностью агонистов, в том числе наиболее активное соединение Org43553 [127]. В дальнейшем Org43553 стал прототипом для большого числа ТП с активностью аллостерических регуляторов ЛГ/ХГ-Р [8, 10, 35, 36, 88, 110, 112, 121, 122]. Нами была разработана

серия ТП с активностью агонистов/аго-РАМ ЛГ/ХГ-Р, в том числе наиболее активные *in vivo* соединения 5-амино-*N*-*трет*-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТР03) и 5-амино-*N*-*трет*-бутил-4-(3-(1-метил-1*H*-пиразол-4-карбоксамидо)фенил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТР4/2) [8, 10, 35, 36, 38, 112].

При изучении Org43553 было показано, что оно специфично связывается с ЛГ/ХГ-Р (K_d , 2.4 нМ), причем в его присутствии связывание гонадотропинов с ортостерическим сайтом ЛГ/ХГ-Р и их стимулирующее влияние на АЦ сохраняется, что указывает на несовпадение локализации аллостерического и ортостерического сайтов [60]. Результатом связывания Org43553 с ЛГ/ХГ-Р была стимуляция АЦ и фактора CREB, хотя эффективность Org43553 была ниже таковой ЛГ [125]. Разработанные нами соединения ТР01, ТР03, ТР4/2, ТР21, ТР23 и ТР37 также стимулировали АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из семенников и яичников крыс [7, 8, 10, 35, 36, 39, 112]. ТР03 и ТР4/2 при действии на первичные культуры клеток Лейдига грызунов повышали в них внутриклеточный уровень цАМФ и усиливали стероидогенез, что приводило к дозозависимому усилению продукции тестостерона [9, 112].

Org43553 и разработанные нами ТП, стимулируя активность АЦ, слабо влияли на $G_{q/11}$ -белки и фосфолипазные пути [39, 112, 125]. Org43553 даже в сравнительно высоких концентрациях стимулировал PLC β лишь на 33–37 %, что составляет менее 5% от соответствующего эффекта ЛГ [125]. Имеются основания полагать, что ТП также слабо влияют на активность β -аррестина, о чем свидетельствуют отсутствие их эффекта на каскад MAPK и низкая интенсивность эндоцитоза ЛГ/ХГ-Р [125]. Даже при курсовом введении крысам ТП слабо влияют на экспрессию гена, кодирующего ЛГ/ХГ-Р, и на плотность ЛГ/ХГ-Р в клетках-мишенях, что предотвращает резистентность к действию эндогенных гонадотропинов с ЛГ-активностью [8–10].

Исследование комплекса Org43553 с трансмембранным аллостерическим сайтом ЛГ/ХГ-Р с помощью криоэлектронной микроскопии показало, что этот агонист занимает верхнюю часть образованного этим сайтом кармана. Морфолиновое кольцо Org43553 направлено наружу, к границе между шарнирной областью и внеклеточной частью ТМД, в то время как *трет*-бутиламинная группа направлена вглубь трансмембранного тоннеля. Сам аллостерический сайт включает АКО, принадлежащие спиральям ТМ3, ТМ5, ТМ6 и ТМ7, петлям ECL2 и ECL3 и граничащего с ТМ1 сегмента шарнирной области. Показана важность гидрофобных взаимодействий между Org43553 и аллостерическим сайтом ЛГ/ХГ-Р [41]. Используя

методы гомологического моделирования и молекулярной динамики, нами были оценены параметры связывания TR4/2 и других разработанных ТП с ЛГ/ХГ-Р и показано, что гидрофобные взаимодействия играют определяющую роль в стабилизации комплекса низкомолекулярного агониста с трансмембранным аллостерическим сайтом, в то время как кулоновские взаимодействия и водородные связи менее значимы [8]. Как и в случае Org43553, 1-метил-1Н-пиразол-4-ильная группа TR4/2 была направлена к внеклеточному входу в трансмембранный тоннель, а *трет*-бутиламинная группа — к центральной его части. Сниженная способность TR4/2 взаимодействовать с трансмембранным аллостерическим сайтом ТТГР хорошо согласуется с данными об отсутствии значимого влияния этого соединения и его аналогов на ТТГ-стимулированную активность АЦ в мембранах щитовидной железы и в условиях *in vivo* на уровне тиреоидных гормонов и экспрессию генов, ответственных за их синтез [6, 8, 39].

Крайне важно, что Org43553 и разработанные нами ТП активны не только *in vitro*, но и *in vivo*, причем они эффективны как при парентеральных, так и при пероральном способах введения [8, 10, 35, 36, 38, 39, 52, 121–123]. Сохранение активности при пероральном введении свидетельствует о хорошем всасывании ТП в желудочно-кишечном тракте и их высокой биодоступности при таком способе доставки. Одним из подходов для предотвращения осложнений терапии с помощью ЛГ или чХГ является снижение их дозы, но это приводит к ослаблению эффективности препаратов и недостижению требуемого эффекта. Нами и другими авторами продемонстрирована частичная аддитивность эффектов низких доз гонадотропинов и ТП на активность АЦ и продукцию тестостерона в условиях *in vitro* [39, 125]. Это позволило высказать гипотезу об их аддитивности и потенцировании в условиях *in vivo*. В подтверждение этого нами показано, что предобработка самцов крыс с помощью TR03 в дозах от 7.5 до 25 мг/кг почти в 2 раза повышала стероидогенный эффект чХГ и снижала его эффективную дозу, а также меняла чХГ-стимулированный паттерн экспрессии стероидогенных генов [111].

Наряду со взаимным влиянием ортостерического и аллостерического сайтов важную роль в эффекте потенцирования могут играть присущие аллостерическим агонистам ЛГ/ХГ-Р свойства низкомолекулярных шаперонов, что хорошо проявляется для мутантных форм рецептора со сниженной способностью к транслокации в плазматическую мембрану. Так, ЛГ/ХГ-Р с мутациями Ala⁵⁹³Pro и Ser⁶¹⁶Tyr в ТМД не способны к транслокации, оставаясь в эндоплазматическом ретикулуме, пребывая в неактивном состоянии, несмотря на способность связываться с ЛГ и чХГ. Org42599

с активностью ЛГ/ХГ-Р-агониста, трифторацетат Org 43553, восстанавливало активность мутантных ЛГ/ХГ-Р с заменами Ala⁵⁹³Pro и Ser⁶¹⁶Tyr [93]. Инкубация клеток, в которых были экспрессированы мутантные ЛГ/ХГ-Р, с Org42599 повышала экспрессию мутантного рецептора, долю ЛГ/ХГ-Р с правильной укладкой полипептидной цепи и подходящей топологией в мембране, увеличивала плотность ЛГ/ХГ-Р на поверхности клетки. Этот эффект был связан со способностью Org42599 проникать через плазматическую мембрану клеток Лейдига и специфично связываться с аллостерическим сайтом расположенного в ретикулярной мембране ЛГ/ХГ-Р, что обеспечивало правильную укладку рецептора и его транслокацию в мембрану [93]. Шапероноподобным эффектом ТП может быть опосредован не только их потенцирующий эффект на эффекты гонадотропинов, но и сохранение высокой эффективности ТП, как это показано нами для TR03, при стимуляции стероидогенеза у крыс с различными моделями сахарного диабета [8, 10].

Наряду с полными агонистами и(или) РАМ, были разработаны аллостерические лиганды для ЛГ/ХГ-Р с активностью NAMs, нейтральных антагонистов и инверсионных агонистов, среди которых наибольший интерес представляют производные терфенила [59], тетрагидро-1,6-нафтиридина [136], пиримидо[4,5,6-*de*][1,6]нафтиридина и пиридо[3,4-*d*]пиримидина [37], бензамида [5], а также дихлородифенилтрихлорэтана [90]. Эти препараты могут быть применены для лечения гормон-зависимых опухолей и для контрацепции, а также для коррекции гипергонадотропного гипогонадизма.

Помимо лигандов трансмембранного аллостерического сайта, перспективными являются лиганды цитоплазматических аллостерических сайтов, включающих в качестве молекулярных детерминант участки, вовлеченные во взаимодействие ЛГ/ХГ-Р с G-белками и β -аррестинами. В качестве таких лигандов могут использоваться синтетические пептиды, соответствующие участкам ICL2, ICL3 и проксимальному сегменту С-хвостового домена ЛГ/ХГ-Р. Основываясь на том, что С-концевая половина ICL3 участвует во взаимодействии с G_s-белком, что косвенно указывает на ее перекрывание и(или) взаимодействие с внутриклеточным аллостерическим G_s-компетентным сайтом, нами был синтезирован и исследован пальмитилированный с С-конца пептид NKDTKIAKK-Nle-A(562–572)-K(Pal)A, который соответствовал участку 562–572 ЛГ/ХГ-Р [40, 113, 114]. В условиях *in vitro* в микромолярных концентрациях он повышал активность АЦ и ГТФ-связывание в тестискулярных мембранах, а при интратестикулярном введении самцам крыс стимулировал у них тестискулярный стероидогенез и повышал продукцию тестостерона [40, 113]. При этом он в значительной

степени ингибировал стимулирующие эффекты чХГ на активность АЦ системы *in vitro* и на продукцию тестостерона *in vivo*, что указывает на его фармакологический профиль, как РАМ-антагониста [40, 113]. Следует, однако, отметить, что при подкожном и внутривенном введении пептид 562–572 ЛГ/ХГ-Р имел низкую стабильность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе эволюции позвоночных, наряду с усложнением механизмов регуляции репродуктивных функций, происходило повышение сложности и гибкости управления этими механизмами, в том числе на уровне сигнальной системы, регулируемой гонадотропинами с ЛГ-активностью. Для повышения информационной емкости ЛГ-системы, расширения спектра сигнальных каскадов и эффекторных белков, активируемых гонадотропинами, а также для обеспечения таргетности ЛГ-сигналинга и его тонкой настройки в конкретных физиологических условиях реализовывались сразу несколько стратегий. Одни из них состояли в изменении структуры гонадотропинов с ЛГ-активностью, без существенного изменения структуры связывающего сайта. С этой целью на уровне генома генерировались различные формы гонадотропинов, которые у человека и некоторых приматов представлены двумя молекулами – ЛГ и ХГ, а также варьировался их статус гликозилирования. Тем самым, не только достигались требуемые в определенных физиологических условиях эффективность и предвзятость гонадотропин-индуцированной сигнальной трансдукции, но и обеспечивались дополнительные уровни ее регуляции. Другие стратегии состояли в “гонадотропин-независимом” влиянии на конформационные характеристики рецептора и его способность взаимодействовать с гонадотропином, и эти стратегии основаны исключительно на аллостерических механизмах. И наиболее важным здесь было комплексообразование ЛГ/ХГ-Р – как его гомоди(олиго)меризация, так и образование гетерокомплексов с ФСГР. Образование рецепторных комплексов может приводить к ослаблению или даже предотвращению гонадотропинового сигнала (гомодимеризация ЛГ/ХГ-Р) или влиять на его предвзятость. В случае ЛГ/ХГ-Р–ФСГР-гетерокомплекса, вследствие *транс*-активации, реализуется запуск ЛГ-зависимых внутриклеточных каскадов с помощью ФСГ. Совмещение аллостерических эффектов образования ЛГ/ХГ-Р-комплексов на ЛГ-сигналинг с такими различными комбинациями гонадотропиновых субъединиц и их гликоформ приводит, с одной стороны, к еще большему разнообразию потенциальных эффектов гонадотропинов в клетке-мишени, и, с другой стороны, позволяет тонко регулировать избирательность и интенсивность гормонального

сигнала, что имеет решающее значение для разработки препаратов с ЛГ-активностью с целью их применения в репродуктивной медицине. Присутствие в молекуле ЛГ/ХГ-Р аллостерических сайтов, локализованных в ТМД и в ICL, создает хорошие предпосылки для создания низкомолекулярных аллостерических регуляторов ЛГ/ХГ-Р с широким спектром фармакологической активности, что в настоящее время реализуется в ходе разработки ТП, лигандов трансмембранного аллостерического сайта ЛГ/ХГ-Р.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-20122 и его продолжение № 23-75-31003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agwuegbo U.T., Colley E., Albert A.P. et al. Differential FSH Glycosylation Modulates FSHR Oligomerization and Subsequent cAMP Signaling // *Front Endocrinol. (Lausanne)*. 2021. V. 12. 765727. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.765727>
2. Arey B.J. Allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors: Discovery and therapeutic potential // *Endocrine*. 2008. V. 34. № 1–3. P. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9098-2>
3. Arnhold I.J., Lofrano-Porto A., Latronico A.C. Inactivating mutations of luteinizing hormone beta-subunit or luteinizing hormone receptor cause oligo-amenorrhea and infertility in women // *Horm. Res.* 2009. V. 71. № 2. P. 75–82. <https://doi.org/10.1159/000183895>
4. Ayoub M.A., Landomiel F., Gallay N. et al. Assessing Gonadotropin Receptor Function by Resonance Energy Transfer-Based Assays // *Front Endocrinol. (Lausanne)*. 2015. V. 6. 130. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00130>
5. Ayoub M.A., Yvinec R., Jégot G. et al. Profiling of FSHR negative allosteric modulators on LH/CGR reveals biased antagonism with implications in steroidogenesis // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016. V. 436. P. 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.07.013>
6. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O. Thienopyrimidine derivatives specifically activate testicular steroidogenesis but do not affect thyroid functions // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2019. V. 55. № 1. P. 30–39. <https://doi.org/10.1134/S0022093019010046>

7. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Stepochkina A.M., Shpakov A.O.* A low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor stimulates adenylyl cyclase in the testicular membranes and steroidogenesis in the testes of rats with type 1 diabetes // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology*. 2019. V. 13. № 4. P. 301–309.
<https://doi.org/10.1134/S1990747819040032>
8. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Gureev M.A. et al.* Comparative Study of the Steroidogenic Effects of Human Chorionic Gonadotropin and Thieno[2,3-D]pyrimidine-Based Allosteric Agonist of Luteinizing Hormone Receptor in Young Adult, Aging and Diabetic Male Rats // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 20. 7493.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207493>
9. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Romanova I.V. et al.* Effect of low-molecular-weight allosteric agonists of the luteinizing hormone receptor on its expression and distribution in rat testes // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2021. V. 57. № 2. P. 208–220.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021020034>
10. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Sorokoumov V.N. et al.* The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 23. № 1. 198.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010198>
11. *Berndt S., Blacher S., Munaut C. et al.* Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin stimulates angiogenesis through TGF- β receptor activation // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 4. P. 1309–1321.
<https://doi.org/10.1096/fj.12-213686>
12. *Birken S.* Specific measurement of o-linked core 2 sugar-containing isoforms of hyperglycosylated human chorionic gonadotropin by antibody b152 // *Tumour. Biol.* 2005. V. 26. № 3. P. 131–141.
<https://doi.org/10.1159/000086484>
13. *Blithe D.L.* N-linked oligosaccharides on free alpha interfere with its ability to combine with human chorionic gonadotropin-beta subunit // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 35. P. 21951–21956.
14. *Bousfield G.R., Butnev V.Y., Butnev V.Y.* Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin beta and equine luteinizing hormone ss by solid-phase Edman degradation // *Biol. Reprod.* 2001. V. 64. № 1. P. 136–147.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.136>
15. *Bousfield G.R., Dias J.A.* Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2011. V. 12. № 4. P. 289–302.
<https://doi.org/10.1007/s11154-011-9191-3>
16. *Bradbury F.A., Menon K.M.* Evidence that constitutively active luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors are rapidly internalized // *Biochemistry.* 1999. V. 38. № 27. P. 8703–8712.
<https://doi.org/10.1021/bi990169t>
17. *Brüser A., Schulz A., Rothmund S. et al.* The Activation Mechanism of Glycoprotein Hormone Receptors with Implications in the Cause and Therapy of Endocrine Diseases // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 2. P. 508–520.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701102>
18. *Butnev V.Y., Butnev V.Y., May J.V. et al.* Production, purification, and characterization of recombinant hFSH glycoforms for functional studies // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015. V. 405. P. 42–51.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.026>
19. *Butnev V.Y., May J.V., Brown A.R. et al.* Human FSH Glycoform α -Subunit Asparagine⁵² Glycans: Major Glycan Structural Consistency, Minor Glycan Variation in Abundance // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022. V. 13. 767661.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.767661>
20. *Butnev V.Y., Singh V., Nguyen V.T., Bousfield G.R.* Truncated equine LH beta and asparagine(56)-deglycosylated equine LH alpha combine to produce a potent FSH antagonist // *J. Endocrinol.* 2002. V. 172. № 3. P. 545–555.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1720545>
21. *Caron P., Broussaud S., Galano-Frutos J.J., Sancho J., Savagner F.* New variant (Val597Ile) in transmembrane region of the TSH receptor with human chorionic gonadotropin hypersensitivity in familial gestational hyperthyroidism // *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2020. V. 93. № 3. P. 339–345.
<https://doi.org/10.1111/cen.14215>
22. *Casarini L., Lispi M., Longobardi S. et al.* LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signaling // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 10. e46682.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046682>

23. Casarini L., Paradiso E., Lazzaretti C. et al. Regulation of antral follicular growth by an interplay between gonadotropins and their receptors // *J. Assist Reprod Genet.* 2022. V. 39. № 4. P. 893–904.
<https://doi.org/10.1007/s10815-022-02456-6>
24. Casarini L., Riccetti L., De Pascali F. et al. Estrogen Modulates Specific Life and Death Signals Induced by LH and hCG in Human Primary Granulosa Cells In Vitro // *Int J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 5. 926.
<https://doi.org/10.3390/ijms18050926>
25. Casarini L., Riccetti L., De Pascali F. et al. Follicle-stimulating hormone potentiates the steroidogenic activity of chorionic gonadotropin and the anti-apoptotic activity of luteinizing hormone in human granulosa-lutein cells in vitro // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016. V. 422. P. 103–114.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.008>
26. Casarini L., Santi D., Brigante G., Simoni M. Two Hormones for One Receptor: Evolution, Biochemistry, Actions, and Pathophysiology of LH and hCG // *Endocr. Rev.* 2018. V. 39. № 5. P. 549–592.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00065>
27. Casarini L., Santi D., Simoni M., Potì F. ‘Spare’ Luteinizing Hormone Receptors: Facts and Fiction // *Trends Endocrinol Metab.* 2018. V. 29. № 4. P. 208–217.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.01.007>
28. Casarini L., Simoni M. Recent advances in understanding gonadotropin signaling // *Fac Rev.* 2021. V. 10. 41.
<https://doi.org/10.12703/r/10-41>
29. Chaturvedi M., Maharana J., Shukla A.K. Terminating G-Protein Coupling: Structural Snapshots of GPCR-β-Arrestin Complexes // *Cell.* 2020. V. 180. № 6. P. 1041–1043.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.047>
30. Chen C.Y., Chen C.R., Chen C.N. et al. Amphetamine-Decreased Progesterone and Estradiol Release in Rat Granulosa Cells: The Regulatory Role of cAMP- and Ca²⁺-Mediated Signaling Pathways // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 5. 493.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9050493>
31. Cole L.A. Proportion hyperglycosylated hCG: a new test for discriminating gestational trophoblastic diseases // *Int J. Gynecol Cancer.* 2014. V. 24. № 9. P. 1709–1714.
<https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000280>
32. Converse A., Liu Z., Patel J.C. et al. Oocyte quality is enhanced by hypoglycosylated FSH through increased cell-to-cell interaction during mouse follicle development // *Development.* 2023. V. 150. № 22. dev202170.
<https://doi.org/10.1242/dev.202170>
33. Costagliola S., Panneels V., Bonomi M. et al. Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 4. P. 504–513.
<https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.504>
34. Davis J.S., Kumar T.R., May J.V., Bousfield G.R. Naturally Occurring Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation Variants // *J. Glycomics Lipidomics.* 2014. V. 4. № 1. e117.
<https://doi.org/10.4172/2153-0637.1000e117>
35. Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtyukov A.A., Lobanov P.S., Shpakov A.O. In vitro and in vivo studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology.* 2016. V. 10. № 4. P. 294–300.
<https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
36. Derkach K.V., Dar'in D.V., Lobanov P.S., Shpakov A.O. Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats // *Dokl. Biol. Sci.* 2014. V. 459. № 1. P. 326–329.
<https://doi.org/10.1134/S0012496614060040>
37. Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O. Low-Molecular-Weight Ligands of Luteinizing Hormone with the Activity of Antagonists // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology.* 2020. V. 14. № 3. P. 223–231.
<https://doi.org/10.1134/S1990747820030034>
38. Derkach K.V., Lebedev I.A., Morina I.Y. et al. Comparison of Steroidogenic and Ovulation-Inducing Effects of Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor in Immature Female Rats // *Int J. Mol Sci.* 2023. V. 24. № 23. 16618.
<https://doi.org/10.3390/ijms242316618>
39. Derkach K.V., Legkoduikh A.S., Dar'in D.V., Shpakov A.O. The stimulating effect of thienopyrimidines structurally similar to Org 43553 on adenylate cyclase activity in the testes and on testosterone production in male rats // *Cell Tissue Biol.* 2017. V. 11. № 1. P. 73–80.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X17010035>
40. Derkach K.V., Shpakova E.A., Shpakov A.O. Palmitoylated peptide 562-572 of luteinizing

- hormone receptor increases testosterone level in male rats // *Bull Exp. Biol. Med.* 2014. V. 158. № 2. P. 209–212.
<https://doi.org/10.1007/s10517-014-2724-5>
41. Duan J., Xu P., Cheng X. *et al.* Structures of full-length glycoprotein hormone receptor signalling complexes // *Nature*. 2021. V. 598. № 7882. P. 688–692.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03924-2>
42. Erbel P.J., Haseley S.R., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F. Studies on the relevance of the glycan at Asn-52 of the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin in the alphabeta dimer // *Biochem J.* 2002. V. 364. Pt 2. P. 485–495.
<https://doi.org/10.1042/BJ20011482>
43. Eriksson K., Wide L. Gonadotropin Glycoforms Circulating in Women Using Progestins of the Levonorgestrel Family for Contraception // *J. Endocr Soc.* 2020. V. 4. № 11.
<https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa128>
44. Fanis P., Neocleous V., Papapetrou I., Phylactou L.A., Skordis N. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor (GnRHR) and Hypogonadotropic Hypogonadism // *Int J. Mol Sci.* 2023. V. 24. № 21.
<https://doi.org/10.3390/ijms242115965>
45. Fares F. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: Development of agonists and antagonists // *Biochim Biophys Acta.* 2006. V. 1760. № 4. P. 560–567.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.12.022>
46. Faust B., Billesbølle C.B., Suomivuori C.M. *et al.* Autoantibody mimicry of hormone action at the thyrotropin receptor // *Nature*. 2022. V. 609. № 7928. P. 846–853.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05159-1>
47. Feng X., Zhang M., Guan R., Segaloff D.L. Heterodimerization between the lutropin and follitropin receptors is associated with an attenuation of hormone-dependent signaling // *Endocrinology*. 2013. V. 154. № 10. P. 3925–3930.
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1407>
48. Fernández-Tejada A., Vadola P.A., Danishefsky S.J. Chemical synthesis of the β -subunit of human luteinizing (hLH) and chorionic gonadotropin (hCG) glycoprotein hormones // *J Am Chem Soc.* 2014. V. 136. № 23. P. 8450–8458.
<https://doi.org/10.1021/ja503545r>
49. Fournier T. Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production // *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016. V. 77. № 2. P. 75–81.
<https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.012>
50. Fournier T., Guibourdenche J., Evain-Brion D. Review: hCGs: different sources of production, different glycoforms and functions // *Placenta*. 2015. V. 36. Suppl 1. P. 60–65.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.02.002>
51. Fuxe K., Borroto-Escuela D.O. Heteroreceptor Complexes and their Allosteric Receptor-Receptor Interactions as a Novel Biological Principle for Integration of Communication in the CNS: Targets for Drug Development // *Neuropsychopharmacology*. 2016. V. 41. № 1. P. 380–382.
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.244>
52. Gerrits M., Mannaerts B., Kramer H., Addo S., Hanssen R. First evidence of ovulation induced by oral LH agonists in healthy female volunteers of reproductive age // *J. Clin Endocrinol Metab.* 2013. V. 98. № 4. P. 1558–1566.
<https://doi.org/10.1210/jc.2012-3404>
53. Grzesik P., Kreuchwig A., Rutz C. *et al.* Differences in Signal Activation by LH and hCG are Mediated by the LH/CG Receptor's Extracellular Hinge Region // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015. V. 6. 140.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00140>
54. Gudermann T., Birnbaumer M., Birnbaumer L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 7. P. 4479–4488.
55. Gudermann T., Nichols C., Levy F.O., Birnbaumer M., Birnbaumer L. Ca^{2+} mobilization by the LH receptor expressed in *Xenopus* oocytes independent of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate formation: evidence for parallel activation of two signaling pathways // *Mol. Endocrinol.* 1992. V. 6. № 2. P. 272–278.
<https://doi.org/10.1210/mend.6.2.1314958>
56. Gupta C., Chapekar T., Chhabra Y. *et al.* Differential response to sustained stimulation by hCG & LH on goat ovarian granulosa cells // *Indian J. Med. Res.* 2012. V. 135. № 3. P. 331–340.
57. He X., Duan J., Ji Y. *et al.* Hinge region mediates signal transmission of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin receptor // *Comput*

- Struct Biotechnol J. 2022. V. 20. P. 6503–6511.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.039>
58. *Heitman L.H., Kleinau G., Brussee J., Krause G., Ijzerman A.P.* Determination of different putative allosteric binding pockets at the lutropin receptor by using diverse drug-like low molecular weight ligands // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012. V. 351. № 2. P. 326–336.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.010>
 59. *Heitman L.H., Narlawar R., de Vries H. et al.* Substituted terphenyl compounds as the first class of low molecular weight allosteric inhibitors of the luteinizing hormone receptor // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. № 7. P. 2036–2042.
<https://doi.org/10.1021/jm801561h>
 60. *Heitman L.H., Oosterom J., Bongers K.M. et al.* [³H]Org 43553, the first low-molecular-weight agonistic and allosteric radioligand for the human luteinizing hormone receptor // *Molecular pharmacology.* 2008. V. 73. P. 518–524.
<https://doi.org/10.1124/mol.107.039875>
 61. *Herrlich A., Kühn B., Grosse R. et al.* Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 28. P. 16764–16772.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.28.16764>
 62. *Horvat R.D., Barisas B.G., Roess D.A.* Luteinizing hormone receptors are self-associated in slowly diffusing complexes during receptor desensitization // *Mol. Endocrinol.* 2001. V. 15. № 4. P. 534–542.
<https://doi.org/10.1210/mend.15.4.0622>
 63. *Hoy J.J., Salinas Parra N., Park J. et al.* Protein kinase A inhibitor proteins (PKIs) divert GPCR-Gas-cAMP signaling toward EPAC and ERK activation and are involved in tumor growth // *FASEB J.* 2020. V. 34. № 10. P. 13900–13917.
<https://doi.org/10.1096/fj.202001515R>
 64. *Hunzicker-Dunn M., Barisas G., Song J., Roess D.A.* Membrane organization of luteinizing hormone receptors differs between actively signaling and desensitized receptors // *J. Biol. Chem.* 2003, V. 278. № 44. P. 42744–42749.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M306133200>
 65. *Jardón-Valadez E., Ulloa-Aguirre A.* Tracking conformational transitions of the gonadotropin hormone receptors in a bilayer of (SDPC) polyunsaturated lipids from all-atom molecular dynamics simulations // *PLoS Comput Biol.* 2024. V. 20. № 1. e1011415.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011415>
 66. *Jiang X., Fischer D., Chen X. et al.* Evidence for Follicle-stimulating Hormone Receptor as a Functional Trimer // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 20. P. 14273–14282.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.549592>
 67. *Jiang X., Liu H., Chen X. et al.* Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. V. 109. № 31. P. 12491–12496.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1206643109>
 68. *Johnson G.P., Jonas K.C.* Mechanistic insight into how gonadotropin hormone receptor complexes direct signaling // *Biol. Reprod.* 2020. V. 102. № 4. P. 773–783.
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioz228>
 69. *Johnson G.P., Onabanjo C.G.A., Hardy K. et al.* Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation Variants Distinctly Modulate Pre-antral Follicle Growth and Survival // *Endocrinology.* 2022. V. 163. № 12. bqac161.
<https://doi.org/10.1210/endo/bqac161>
 70. *Jonas K.C., Chen S., Virta M. et al.* Temporal reprogramming of calcium signalling via cross-talk of gonadotrophin receptors that associate as functionally asymmetric heteromers // *Sci Rep.* 2018. V. 8. № 1. 2239.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20722-5>
 71. *Jonas K.C., Fanelli F., Huhtaniemi I.T., Hanyaloglu A.C.* Single molecule analysis of functionally asymmetric G protein-coupled receptor (GPCR) oligomers reveals diverse spatial and structural assemblies // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 7. P. 3875–3892.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.622498>
 72. *Kara E., Dupuy L., Bouillon C., Casteret S., Maurel M.C.* Modulation of Gonadotropins Activity by Antibodies // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019. V. 10. 15.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00015>
 73. *Koistinen H., Koel M., Peters M. et al.* Hyperglycosylated hCG activates LH/hCG-receptor with lower activity than hCG // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2019. V. 479. P. 103–109.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.09.006>
 74. *Lapthorn A.J., Harris D.C., Littlejohn A. et al.* Crystal structure of human chorionic gonadotropin // *Nature.* 1994. V. 369. № 6480. P. 455–461.
<https://doi.org/10.1038/369455a0>
 75. *Lazzaretti C., Simoni M., Casarini L., Paradiso E.* Allosteric modulation of gonadotropin receptors // *Front Endocrinol (Lausanne).*

2023. V. 14. 1179079.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1179079>
76. Lee S.Y., Byambargchaa M., Choi S.H. et al. Roles of N-linked and O-linked glycosylation sites in the activity of equine chorionic gonadotropin in cells expressing rat luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor and follicle-stimulating hormone receptor // BMC Biotechnol. 2021. V. 21. № 1. 52.
<https://doi.org/10.1186/s12896-021-00712-8>
77. Lei Y., Hagen G.M., Smith S.M. et al. Constitutively-active human LH receptors are self-associated and located in rafts // Mol. Cell Endocrinol. 2007. V. 260–262. P. 65–72.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.046>
78. Maharana J., Banerjee R., Yadav M.K., Sarma P., Shukla A.K. Emerging structural insights into GPCR- β -arrestin interaction and functional outcomes // Curr. Opin Struct. Biol. 2022. V. 75.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102406>
79. Manglik A., Kobilka B.K., Steyaert J. Nanobodies to Study G Protein-Coupled Receptor Structure and Function // Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2017. V. 57. P. 19–37.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104710>
80. Mann O.N., Kong C.S., Lucas E.S. et al. Expression and function of the luteinizing hormone choriogonadotropin receptor in human endometrial stromal cells // Sci. Rep. 2022. V. 12. № 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-12495-9>
81. Manna P.R., Pakarinen P., El-Hefnawy T., Huhtaniemi I.T. Functional assessment of the calcium messenger system in cultured mouse Leydig tumor cells: Regulation of human chorionic gonadotropin-induced expression of the steroidogenic acute regulatory protein // Endocrinology. 1999. V. 140. № 4. P. 1739–1751.
<https://doi.org/10.1210/endo.140.4.6650>
82. Mazurkiewicz J.E., Herrick-Davis K., Barroso M. et al. Single-molecule analyses of fully functional fluorescent protein-tagged follitropin receptor reveal homodimerization and specific heterodimerization with lutropin receptor // Biol. Reprod. 2015. V. 92. № 4. 100.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125781>
83. Meher B.R., Dixit A., Bousfield G.R., Lushington G.H. Glycosylation Effects on FSH-FSHR Interaction Dynamics: A Case Study of Different FSH Glycoforms by Molecular Dynamics Simulations // PLoS One. 2015. V. 10. № 9. e0137897.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137897>
84. Mejia R., Waite C., Ascoli M. Activation of Gq/11 in the mouse corpus luteum is required for parturition // Mol. Endocrinol. 2015. V. 29. № 2. P. 238–246.
<https://doi.org/10.1210/me.2014-1324>
85. Mertens-Walker I., Bolitho C., Baxter R.C., Marsh D.J. Gonadotropin-induced ovarian cancer cell migration and proliferation require extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation regulated by calcium and protein kinase C $\{\delta\}$ // Endocr Relat Cancer. 2010. V. 17. № 2. P. 335–349.
<https://doi.org/10.1677/ERC-09-0152>
86. Mishra S., Ling H., Grimm M. et al. Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling // J. Cardiovasc Pharmacol. 2010. V. 56. № 6. P. 598–603.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181e1d263>
87. Misra U.K., Kaczowka S., Pizzo S.V. The cAMP-activated GTP exchange factor, Epac1 upregulates plasma membrane and nuclear Akt kinase activities in 8-CPT-2-O-Me-cAMP-stimulated macrophages: Gene silencing of the cAMP-activated GTP exchange Epac1 prevents 8-CPT-2-O-Me-cAMP activation of Akt activity in macrophages // Cell Signal. 2008. V. 20. № 8. P. 1459–1470.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.04.002>
88. Moore S., Jaeschke H., Kleinau G. et al. Evaluation of small-molecule modulators of the luteinizing hormone/choriogonadotropin and thyroid stimulating hormone receptors: structure-activity relationships and selective binding patterns // J. Med. Chem. 2006. V. 49. № 13. P. 3888–3896.
<https://doi.org/10.1021/jm060247s>
89. Mukherjee S., Gurevich V.V., Preninger A. et al. Aspartic acid 564 in the third cytoplasmic loop of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is crucial for phosphorylation-independent interaction with arrestin2 // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 20. P. 17916–17927.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110479200>
90. Munier M., Ayoub M., Suteau V. et al. In vitro effects of the endocrine disruptor p,p'DDT on human choriogonadotropin/luteinizing hormone receptor signaling // Arch Toxicol. 2021. V. 95. № 5. P. 1671–1681.
<https://doi.org/10.1007/s00204-021-03007-1>

91. *Nascimento D.R., Barbalho E.C., Gondim Barrozo L. et al.* The mechanisms that control the preantral to early antral follicle transition and the strategies to have efficient culture systems to promote their growth *in vitro* // *Zygote*. 2023. V. 31. № 4. P. 305–315.
<https://doi.org/10.1017/S0967199423000254>
92. *Nchourapouo K.W.T., Nde J., Ngouongo Y.J.W., Zekeng S.S., Fongang B.* Evolutionary Couplings and Molecular Dynamic Simulations Highlight Details of GPCRs Heterodimers' Interfaces // *Molecules*. 2023. V. 28. № 4. 1838.
<https://doi.org/10.3390/molecules28041838>
93. *Newton C.L., Whay A.M., McArdle C.A. et al.* Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2011. V. 108. P. 7172–7176.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1015723108>
94. *Núñez Miguel R., Sanders J., Furmaniak J., Rees Smith B.* Glycosylation pattern analysis of glycoprotein hormones and their receptors // *J. Mol. Endocrinol.* 2017. V. 58. № 1. P. 25–41.
<https://doi.org/10.1530/JME-16-0169>
95. *Nwabuobi C., Arlier S., Schatz F. et al.* hCG: Biological Functions and Clinical Applications // *Int J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 10.
<https://doi.org/10.3390/ijms18102037>
96. *Oestreich E.A., Malik S., Goonasekera S.A. et al.* Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 3. P. 1514–1522.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M806994200>
97. *Olejnik B., Kratz E.M., Zimmer M., Ferens-Sieczkowska M.* Glycoprotein fucosylation is increased in seminal plasma of subfertile men // *Asian J. Androl.* 2015. V. 17. № 2. P. 274–280.
<https://doi.org/10.4103/1008-682X.138187>
98. *Osuga Y., Hayashi M., Kudo M. et al.* Co-expression of defective luteinizing hormone receptor fragments partially reconstitutes ligand-induced signal generation // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 40. P. 25006–25012.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.40.25006>
99. *Pakarainen T., Zhang F.P., Nurmi L., Poutanen M., Huhtaniemi I.* Knockout of luteinizing hormone receptor abolishes the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse graafian follicles // *Mol. Endocrinol.* 2005. V. 19. № 10. P. 2591–2602.
<https://doi.org/10.1210/me.2005-0075>
100. *Petersen T.S., Kristensen S.G., Jeppesen J.V. et al.* Distribution and function of 3',5'-Cyclic-AMP phosphodiesterases in the human ovary // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015. V. 403. P. 10–20.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.004>
101. *Puett D., Li Y., DeMars G., Angelova K., Fanelli F.* A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007. V. 260–262. P. 126–136.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.05.009>
102. *Qiao J., Han B.* Diseases caused by mutations in luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2019. V. 161. P. 69–89.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.09.007>
103. *Querat B.* Unconventional Actions of Glycoprotein Hormone Subunits: A Comprehensive Review // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.731966>
104. *Riccelli L., De Pascali F., Gilioli L. et al.* Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells *in vitro* // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2017. V. 15. № 1–2.
<https://doi.org/10.1186/s12958-016-0224-3>
105. *Riccelli L., Yvinec R., Klett D. et al.* Human Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin Display Biased Agonism at the LH and LH/CG Receptors // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. 940.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01078-8>
106. *Sairam M.R.* Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction // *FASEB J.* 1989. V. 3. № 8. P. 1915–1926.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.3.8.2542111>
107. *Schulze A., Kleinau G., Neumann S. et al.* The intramolecular agonist is obligate for activation of glycoprotein hormone receptors // *FASEB J.* 2020. V. 34. № 8. P. 11243–11256.
<https://doi.org/10.1096/fj.202000100R>
108. *Segaloff D.L.* Regulatory processes governing the cell surface expression of LH and FSH receptors // *Subcell Biochem.* 2012. V. 63. P. 113–129.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-4765-4_7
109. *Shimizu-Albergine M., Tsai L.C., Patrucco E., Beavo J.A.* cAMP-specific phosphodiesterases 8A and 8B, essential regulators of Leydig cell

- steroidogenesis // *Mol. Pharmacol.* 2012. V. 81. № 4. P. 556–566.
<https://doi.org/10.1124/mol.111.076125>
110. *Shpakov A.O.* Allosteric Regulation of G-Protein-Coupled Receptors: From Diversity of Molecular Mechanisms to Multiple Allosteric Sites and Their Ligands // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 7.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076187>
111. *Shpakov A.O., Bakhtyukov A.A., Dar'in D.V., Derkach K.V.* Pretreatment of rats with an allosteric luteinizing hormone receptor agonist augments chorionic gonadotropin-induced stimulation of testosterone production // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2019. V. 55. № 6. P. 510–514.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019060115>
112. *Shpakov A.O., Dar'in D.V., Derkach K.V., Lobanov P.S.* The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenylyl cyclase systems in the rat testes // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2014. V. 456. P. 104–107.
<https://doi.org/10.1134/S1607672914030065>
113. *Shpakova E.A., Derkach K.V., Shpakov A.O.* Biological activity of lipophilic derivatives of peptide 562–572 of rat luteinizing hormone receptor // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2013. V. 452. № 1. P. 248–250.
<https://doi.org/10.1134/S1607672913050116>
114. *Shpakova E.A., Sorokoumov V.N., Akent'ev A.V. et al.* The Relationship between Micelle Formation and Biological Activity of Peptide 562–572 of Luteinizing Hormone Receptor Modified with Decanoyl Radicals // *Cell tissue Biol.* 2017. V. 11. P. 227–233.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X17030105>
115. *Slosky L.M., Caron M.G., Barak L.S.* Biased Allosteric Modulators: New Frontiers in GPCR Drug Discovery // *Trends Pharmacol Sci.* 2021. V. 42. № 4. P. 283–299.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.12.005>
116. *Sposini S., Hanyaloglu A.C.* Driving gonadotrophin hormone receptor signalling: the role of membrane trafficking // *Reproduction.* 2018. V. 156. № 6. P. R195–R208.
<https://doi.org/10.1530/REP-18-0423>
117. *Stevenson H., Bartram S., Charalambides M.M. et al.* Kisspeptin-neuron control of LH pulsatility and ovulation // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022. V. 13. 951938.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.951938>
118. *Tan Y., Xu P., Huang S. et al.* Structural insights into the ligand binding and G_i coupling of serotonin receptor 5-HT_{5A} // *Cell Discov.* 2022. V. 8. № 1. 50.
<https://doi.org/10.1038/s41421-022-00412-3>
119. *Toulis K.A., Goulis D.G., Venetis C.A. et al.* Thyroid autoimmunity and miscarriages: the corpus luteum hypothesis // *Med. Hypotheses.* 2009. V. 73. № 6. P. 1060–1062.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.05.012>
120. *Trehan A., Rotgers E., Coffey E.T., Huhtaniemi I., Rivero-Müller A.* CANDLES, an assay for monitoring GPCR induced cAMP generation in cell cultures // *Cell Commun Signal.* 2014. V. 12. <https://doi.org/10.1186/s12964-014-0070-x>
121. *Van de Lagemaat R., Raafs B.C., van Koppen C. et al.* Prevention of the onset of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in the rat after ovulation induction with a low molecular weight agonist of the LH receptor compared with hCG and rec-LH // *Endocrinology.* 2011. V. 152. № 11. P. 4350–4357.
<https://doi.org/10.1210/en.2011-1077>
122. *Van de Lagemaat R., Timmers C.M., Kelder J. et al.* Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor // *Hum Reprod.* 2009. V. 24. № 3. P. 640–648.
<https://doi.org/10.1093/humrep/den412>
123. *Van de Lagemaat R., van Koppen C.J., Krajnc-Franken M.A. et al.* Contraception by induction of luteinized unruptured follicles with short-acting low molecular weight FSH receptor agonists in female animal models // *Reproduction.* 2011. V. 142. № 6. P. 893–905.
DOI: 10.1530/REP-11-0234
124. *Vander Ark A., Cao J., Li X.* TGF-β receptors: In and beyond TGF-β signaling // *Cell Signal.* 2018. V. 52. P. 112–120.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.002>
125. *Van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M. et al.* A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor // *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2008. V. 378. № 5. P. 503–514.
<https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
126. *Van Petegem F.* Ryanodine receptors: allosteric ion channel giants // *J. Mol. Biol.* 2015. V. 427. № 1. P. 31–53.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.004>
127. *Van Straten N.C., Schoonus-Gerritsma G.G., van Someren R.G. et al.* The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor:

- thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction. *Chembiochem*. 2002. V. 3. № 10. P. 1023–1026.
[https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20021004\)3:10<1023::AID-CBIC1023>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20021004)3:10<1023::AID-CBIC1023>3.0.CO;2-9)
128. Wang X.N., Greenwald G.S. Human chorionic gonadotropin or human recombinant follicle-stimulating hormone (FSH)-induced ovulation and subsequent fertilization and early embryo development in hypophysectomized FSH-primed mice // *Endocrinology*. 1993. V. 132. № 5. P. 2009–2016.
<https://doi.org/10.1210/endo.132.5.8477652>
 129. Wehbi V., Decourtye J., Piketty V. et al. Selective modulation of follicle-stimulating hormone signaling pathways with enhancing equine chorionic gonadotropin/antibody immune complexes // *Endocrinology*. 2010. V. 151. № 6. P. 2788–2799.
<https://doi.org/10.1210/en.2009-0892>
 130. Wehbi V., Tranchant T., Durand G. et al. Partially deglycosylated equine LH preferentially activates beta-arrestin-dependent signaling at the follicle-stimulating hormone receptor // *Mol. Endocrinol.* 2010. V. 24. № 3. P. 561–573.
<https://doi.org/10.1210/me.2009-0347>
 131. Wess J., Oteng A.B., Rivera-Gonzalez O., Gurevich E.V., Gurevich V.V. β -Arrestins: Structure, Function, Physiology, and Pharmacological Perspectives // *Pharmacol Rev.* 2023. V. 75. № 5. P. 854–884.
<https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000302>
 132. Wide L., Eriksson K. Molecular size and charge as dimensions to identify and characterize circulating glycoforms of human FSH, LH and TSH // *Ups. J. Med. Sci.* 2017. V. 122. № 4. P. 217–223.
<https://doi.org/10.1080/03009734.2017.1412373>
 133. Wide L., Eriksson K. Low-glycosylated forms of both FSH and LH play major roles in the natural ovarian stimulation // *Ups. J. Med. Sci.* 2018. V. 123. № 2. P. 100–108.
<https://doi.org/10.1080/03009734.2018.1467983>
 134. Wide L., Eriksson K., Sluss P.M., Hall J.E. Determination of Half-lives of Circulating FSH and LH Glycoforms in Women During GnRH Receptor Blockade // *J. Clin Endocrinol Metab.* 2022. V. 107. № 10. e4058–e4062.
<https://doi.org/10.1210/clinem/dgac434>
 135. Wolf-Ringwall A.L., Winter P.W., Roess D.A., George Barisas B. Luteinizing hormone receptors are confined in mesoscale plasma membrane microdomains throughout recovery from receptor desensitization // *Cell Biochem Biophys*. 2014. V. 68. № 3. P. 561–569.
<https://doi.org/10.1007/s12013-013-9738-x>
 136. Wortmann L., Lindenthal B., Muhn P. et al. Discovery of BAY-298 and BAY-899: Tetrahydro-1,6-naphthyridine-Based, Potent, and Selective Antagonists of the Luteinizing Hormone Receptor Which Reduce Sex Hormone Levels in Vivo // *J. Med. Chem.* 2019. V. 62. № 22. P. 10321–10341.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01382>
 137. Wu A., Salom D., Hong J.D. et al. Structural basis for the allosteric modulation of rhodopsin by nanobody binding to its extracellular domain // *Nat Commun.* 2023. V. 14. № 1. 5209.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-40911-9>
 138. Wu H., Lustbader J.W., Liu Y., Canfield R.E., Hendrickson W.A. Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein // *Structure*. 1994. V. 2. № 6. P. 545–558.
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)00054-x](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)00054-x)
 139. Zariñán T., Butnev V.Y., Gutiérrez-Sagal R. et al. In Vitro Impact of FSH Glycosylation Variants on FSH Receptor-stimulated Signal Transduction and Functional Selectivity // *J. Endocr. Soc.* 2020. V. 4. № 5.
<https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa019>
 140. Zenzmaier C., Gerth R., Gruschwitz M. et al. Decreased levels of genuine large free hCG alpha in men presenting with abnormal semen analysis // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011. V. 9.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-114>
 141. Zhang H., Kong Q., Wang J., Jiang Y., Hua H. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer // *Exp. Hematol. Oncol.* 2020. V. 9. № 1. 32. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00191-1>
 142. Zhang L., Shi G. Gq-Coupled Receptors in Autoimmunity // *J. Immunol. Res.* 2016. V. 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/3969023>
 143. Zhang M., Chen T., Lu X. et al. G protein-coupled receptors (GPCRs): Advances in structures, mechanisms, and drug discovery // *Signal Transduct Target Ther.* 2024. V. 9. № 1.
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01803-6>
 144. Zheng M., Cadenas J., Pors S.E. et al. Reducing 3D Hydrogel Stiffness, Addition of Oestradiol in a Physiological Concentration and Increasing FSH Concentration Improve In Vitro Growth

- of Murine Preantral Follicles // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 15. 12499.
<https://doi.org/10.3390/ijms241512499>
145. *Zhu C., Lan X., Wei Z., Yu J., Zhang J.* Allosteric modulation of G protein-coupled receptors as a novel therapeutic strategy in neuropathic pain // *Acta Pharm Sin B.* 2024. V. 14. № 1. P. 67–86.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.07.020>
146. *Zhu X., Gilbert S., Birnbaumer M., Birnbaumer L.* Dual signaling potential is common among G_s -coupled receptors and dependent on receptor density // *Mol. Pharmacol.* 1994. V. 46. № 3. P. 460–469.
147. *Zoenen M., Urizar E., Swillens S., Vassart G., Costagliola S.* Evidence for activity-regulated hormone-binding cooperativity across glycoprotein hormone receptor homomers // *Nat Commun.* 2012. V. 3. 1007.
<https://doi.org/10.1038/ncomms1991>

Multiple Mechanisms of Allosteric Regulation of the Luteinizing Hormone Receptor

A. O. Shpakov*, K. V. Derkach**

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, 194223 Russia*

**E-mail: alex_shpakov@list.ru*

***E-mail: derkach_k@list.ru*

Abstract – The regulatory effects of luteinizing hormone (LH) and chorionic gonadotropin (CG) are realized through the activation of the G-protein coupled LH/CG receptor (LH/CG-R). The result of this is the activation of various types of G proteins, which leads to stimulation (G_s) or inhibition (G_i) of the cAMP-dependent pathway and stimulation of calcium signaling ($G_{q/11}$, G_i), and the recruitment of β -arrestins, which prevent G protein signaling through receptor internalization and downregulation, but can also activate the mitogen-activated protein kinase cascade. Despite a certain similarity in the effects of LH and CG, there are differences between them both in efficiency and in the pattern of regulation of LH/CG-R. This is a consequence of differences in the affinity of LH and CG to the orthosteric site of the receptor, as well as differences at the level of allosteric regulation of the receptor, which is due to the presence of a C-terminal extension in the β -subunit of CG, including sites for O-glycosylation, and the variability of N-glycosylation of α - and β -subunits of gonadotropins. Moreover, the number of N-glycans, the degree of their branching and charge differ, which leads to different efficiency of activation of intracellular cascades, affecting the physiological response of the reproductive system to gonadotropins. Of great importance is the formation of homodi(oligo)meric complexes of LH/CG-R and its heterocomplexes with the follicle-stimulating hormone receptor, where protomers allosterically influence the efficiency of LH/CG-R activation and the bias of signal transduction. Taking into account the large number of allosteric sites in LH/CG-R, the development of low-molecular allosteric regulators is underway, including agonists based on thieno[2,3-d]-pyrimidine and peptides derived from the cytoplasmic loops of LH/CG-R. These regulators can become prototypes of drugs for correcting the functions of the reproductive system. This review is devoted to the analysis of data on the similarities and differences in the signaling and physiological effects of gonadotropins with LH activity, the role of allosteric mechanisms in this, and the prospects for creating allosteric regulators of LH/CG-R.

Keywords: luteinizing hormone receptor, human chorionic gonadotropin, allosteric site, reproductive system, folliculogenesis, ovulation, steroidogenesis