

## ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ГЕТЕРОТРИМЕРНЫХ G-БЕЛКОВ ХОРИОНИЧЕСКИМ ГОНАДОТРОПИНОМ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ АГОНИСТОМ РЕЦЕПТОРА ЛУТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

© К. В. Деркач,<sup>1</sup> А. А. Бахтюков,<sup>1</sup> А. А. Шпаков,<sup>2</sup> Д. В. Дарьин,<sup>2</sup> А. О. Шпаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223, и

<sup>2</sup>С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 198504;

\* электронный адрес: alex\_shpakov@list.ru

Важнейшими регуляторами репродуктивной системы являются лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его гомолог — хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), которые, связываясь со специфичным к ним рецептором ЛГ-ХГЧ, стимулируют различные типы G-белков, в первую очередь G<sub>s</sub>- и G<sub>q</sub>-белки, что ведет к активации аденилатциклазы (АЦ) и фосфолипазы С соответственно. Предполагается, что многие побочные эффекты ЛГ и ХГЧ связаны с низкой селективностью их действия на G-белки. Низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ-ХГЧ, разработанные на основе тиенопиримидиновых производных, не вызывают этих побочных эффектов, и одной из причин этого могут быть различия во взаимодействии с G-белками. Для проверки этого было проведено сравнительное изучение влияния ХГЧ и синтезированного нами тиенопиримидина — 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил) тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксиамида (ТР03) — на активность АЦ и на ГТФ-связывание G-белков в плазматических мембранах, выделенных из яичников и семенников крыс. Для селективного выключения из сигнальной трансдукции G<sub>s</sub>- и G<sub>i/o</sub>-белков использовали холерный (ХТ) и коклюшный (КТ) токсины, для подавления G<sub>q</sub>-зависимых каскадов — пептид, соответствующий С-концевому сегменту 349—359 G<sub>αq</sub>-субъединицы. Показано, что обработка овариальных и тестикулярных мембран ХТ приводила к подавлению стимулирующих эффектов ТР03 и ХГЧ на активность АЦ, но по-разному влияла на стимуляцию ими ГТФ-связывания — полностью блокировала его при действии 10<sup>-6</sup> М ТР03 и на 45—46 % снижала в случае ХГЧ (10<sup>-8</sup> М). Преинкубация мембран с пептидом 349—359 на 34 (яичники) и 45 % (семенники) снижала стимулирующий эффект ХГЧ на ГТФ-связывание, но не влияла на соответствующий эффект 10<sup>-6</sup> М ТР03. Преинкубация с пептидом 349—359 также снижала стимулирующий ГТФ-связывание эффект 10<sup>-4</sup> М ТР03, но в небольшой степени. Полученные данные указывают на то, что в отличие от ХГЧ, мишенями которого в яичниках и семенниках в одинаковой степени являются G<sub>s</sub>- и G<sub>q</sub>-белки, действие ТР03 направлено в основном на G<sub>s</sub>-белки. И только в концентрации, которая на два порядка превышает значение EC<sub>50</sub>, ТР03 приобретает способность, хотя и сравнительно слабо, активировать G<sub>q</sub>-белки. Обработка мембран КТ не влияла на эффекты ТР03 и ХГЧ, что указывает на отсутствие их эффективного взаимодействия с G<sub>i/o</sub>-белками. Таким образом, значительным преимуществом низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ-ХГЧ перед гонадотропинами является избирательность активации ими G<sub>s</sub>-зависимых каскадов, ответственных за синтез и продукцию стероидных гормонов.

**Ключевые слова:** гетеротримерный G-белок, низкомолекулярный агонист, гонадотропин, рецептор лютеинизирующего гормона, ГТФ-связывание, аденилатциклаза, тиенопиримидин, холерный токсин.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, КТ — коклюшный токсин, ЛГ — лютеинизирующий гормон, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, ХТ — холерный токсин, GppNHP — β,γ-имидогуанозин-5'-трифосфат, ТР03 — 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксиамид, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

Регуляторные эффекты лютеинизирующего гормона (ЛГ) и его структурного и функционального гомолога — хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), который вырабатывается только в период беременности, осуществляются через посредство высокоспецифичного к ним рецептора ЛГ-ХГЧ. Связывание гонадотропина со значительным по размеру внеклеточным доменом (эктодоме-ном) этого рецептора индуцирует в нем конформационные изменения, в том числе в его цитоплазматических

петлях, взаимодействующих с различными типами гетеротримерных G-белков. Результатом этого является стимуляция обмена ГДФ на ГТФ в гуаниннуклеотидсвязывающем сайте α-субъединиц G-белков, их переход в активированное, ГТФ-связанное, состояние и запуск зависимых от G-белков внутриклеточных сигнальных каскадов (Puett et al., 2007). Установлено, что активированный гормоном рецептор ЛГ-ХГЧ взаимодействует как с G<sub>s</sub>-белками, через которые осуществляется активация

аденилатциклазы (АЦ), катализирующей образование вторичного посредника — цАМФ, так и с  $G_{q/11}$ -белками, через которые осуществляется активация фосфолипазы C, следствием чего является повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  (Gilchrist et al., 1996; Kleinau, Krause, 2009; Troppmann et al., 2013). Активирующее влияние ЛГ и ХГЧ на цАМФ-зависимые и  $Ca^{2+}$ -зависимые внутриклеточные каскады лежит в основе всех физиологических эффектов гонадотропинов, реализуемых при их действии на репродуктивную систему мужчин и женщин. Оба каскада, хотя и в различной степени, участвуют в регуляции синтеза и секреции стероидных гормонов, а также в контроле дифференцировки клеток репродуктивной системы. Следует отметить, что в экспериментах *in vitro* показана способность рецептора ЛГ-ХГЧ активировать  $G_{i/o}$ -белки, но функциональное значение такого сопряжения остается неизученным.

В последние годы ведется интенсивная разработка низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ-ХГЧ на основе гетероциклических соединений, которые в отличие от гонадотропинов проникают внутрь трансмембранного канала рецептора и связываются с расположенным там аллостерическим сайтом (Heitman, Ijzerman, 2008). Наиболее эффективными среди них являются тиенопиримидиновые производные (Van Koppen et al., 2008; Деркач и др., 2014, 2016; Шпаков и др., 2014а, 2014б; Шпаков, 2015; Nataraja et al., 2015). В отличие от ЛГ и ХГЧ они активны не только при парентеральном, но и при пероральном способе введения, что связано с их устойчивостью и эффективным всасыванием в желудочно-кишечном тракте. Не менее важным преимуществом тиенопиримидиновых производных является то, что их применение не приводит к развитию ряда побочных эффектов, характерных для гонадотропинов. Так, тиенопиримидины не вызывают синдрома гиперстимуляции яичников — тяжелого осложнения, которое часто возникает при индукции овуляции с помощью ХГЧ или рекомбинантного ЛГ (Van de Lagemaat et al., 2009, 2011; Gerrits et al., 2013). Предполагается, что одной из причин этого являются различия в активирующем влиянии гонадотропинов и низкомолекулярных агонистов на различные типы G-белков, сопряженных с рецептором ЛГ-ХГЧ. Для проверки этого предположения нами было проведено сравнительное изучение влияния ХГЧ, эндогенного агониста рецептора ЛГ-ХГЧ, и синтезированного и изученного нами ранее тиенопиримидинового производного — 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)-тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТР03) — на активность АЦ и ГТФ-связывание различных типов G-белков в плазматических мембранах, выделенных из яичников и семенников крыс. Для селективного выключения из сигнальной трансдукции  $G_s$ - и  $G_{i/o}$ -белков использовали АДФ-рибозилтрансферазы холерного (ХТ) и коклюшного (КТ) токсинов, для подавления  $G_q$ -зависимых каскадов — пептид Leu-Gln-Leu-Asn-Leu-Lys-Glu-Tyr-Asn-Leu-Val<sup>349–359</sup>, который соответствует С-концевому сегменту  $G\alpha_q$ -субъединицы крысы (Chillar et al., 2010).

## Материал и методика

В экспериментах использовали ХГЧ,  $\beta$ , $\gamma$ -имидагуанозин-5'-трифосфат (GppNHP), ГТФ, АТФ, цАМФ, креатинфосфат, креатинфосфокиназу из мышц кролика, ХТ, КТ,

тимидин, НАД, НАДФ и дитиотреитол (Sigma-Aldrich, США), а также радиоактивные изотопы: для определения активности АЦ —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  (150 ГБк/ммоль) (Всероссийское объединение «Изотоп», Россия), для определения ГТФ-связывания G-белков —  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{GppNHP}$  (5 ГБк/ммоль) (Amersham, Англия). Для разделения смеси меченых адениновых нуклеотидов использовали нейтральную окись алюминия (Sigma, США), для сорбции связывающих  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{GppNHP}$  белков — нитроцеллюлозные фильтры (тип НА, 0.45 мкм) (Millipore, США).

Соединение ТР03 синтезировали, используя реакцию 1.0 эквивалента 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид с 1.1 эквивалента никотиновой кислоты в присутствии 1.1 эквивалента 1-[бис(диметиламино)метил]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиривидиний 3-оксид гексафторфосфата (НАТУ) и 1.2 эквивалента *N,N*-диизопротилэтиламина в сухом *N,N*-диметилформамиде. Синтез проводили в течение 5 ч при комнатной температуре, целевые продукты очищали перекристаллизацией из этанола, затем использовали колоночную хроматографию. Структуру ТР03 подтверждали с помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии (спектрометр Bruker Avance III 400, Bruker, Германия) и масс-спектрометрии высокого разрешения (electrospray ionization — time of flight, ESI-TOF, спектрометр micrOTOF, Bruker, Германия). Соединение ТР03 ( $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ ) имело следующий спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMCO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м. д. (*J*, Гц): 1.37 (9H, с, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.62 (3H, с, SCH<sub>3</sub>); 6.14 (2H, с, NH<sub>2</sub>); 6.98 (1H, с, NH-*t*-Bu); 7.42 (1H, д, *J*=7.8, 4'-H); 7.57—7.64 (2H, м, 5'-H и 5''-H); 8.04 (1H, д, *J*=8.2, 2'-H); 8.08 (1H, с, 6'-H); 8.33 (1H, д, *J*=7.7, 4''-H); 8.78 (1H, д, *J*=4.8, 6''-H); 9.14 (1H, с, 2''-H); 10.72 (1H, с, 3'-NH). По данным масс-спектрометрии, мол. масса ТР03 составила 515.1304 (вычислено для  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  — 515.1294). При проведении экспериментов соединение ТР03 растворяли в диметилсульфоксиде (DMCO). Пептид Leu-Gln-Leu-Asn-Leu-Lys-Glu-Tyr-Asn-Leu-Val<sup>349–359</sup> синтезировали с помощью твердофазной стратегии методом последовательного наращивания цепи на *para*-метилбензгидриламиной смоле (емкость 1.16 ммоль/г) с использованием защищенных *N* <sup>$\alpha$</sup> -трет-бутилоксикарбонильными группами аминокислот. После деблокирования и снятия пептидов с полимерного носителя, для чего использовали трифторметансульфокислоту в трифторуксусной кислоте в присутствии тиоанизола и этандитиола, пептид очищали с помощью гель-хроматографии (Sephadex G-10, 10%-ная уксусная кислота, детектирование при 230 нм) и затем с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка Supelco C8, 25×212 мм, градиент 0—50 % ацетонитрила в системе растворителей вода—ацетонитрил—0.1%-ная трифторуксусная кислота, детектирование при 230 нм). Структуру пептида 349—359 подтверждали с помощью аминокислотного анализа с использованием прибора ААТ339М (Mikrotechna-Praha, Чехия) и масс-спектрометрии высокого разрешения (micrOTOF, Bruker, Германия).

Фракции плазматических мембран из яичников самок ( $n = 9$ ) и семенников самцов ( $n = 6$ ) крыс Wistar выделяли, как описано ранее (Шпаков и др., 2014б). Все эксперименты выполняли в соответствии с правилами, разработанными и утвержденными этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии РАН, и правилами и требованиями, изложенными в документах European Communities Council Directive 1986

(86/609/ЕЕС) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Измельченные ткани яичников или семенников гомогенизировали на холоде в 40 мМ Tris-HCl-буфере, рН 7.5, содержащем 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10%-ную (w/v) сахарозу и ингибиторы протеаз (500 мкМ *O*-фенантролин, 2 мкМ пепстатин и 1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Гомогенат центрифугировали при 1500 *g* в течение 10 мин, после чего супернатант центрифугировали при 20 000 *g* в течение 30 мин. Осадок ресуспендировали в буфере без сахарозы и повторно центрифугировали в том же режиме. Полученные мембраны ресуспендировали в 40 мМ Tris-HCl-буфере, рН 7.5, и использовали для изучения активности АЦ и ГТФ-связывания G-белков.

Активность АЦ определяли, как описано ранее (Derkach et al., 2015). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 50 мМ Tris-HCl, рН 7.5, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 37 кБк [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 50—80 мкг мембранного белка. Реакцию проводили в течение 12 мин при 37 °С, останавливали 100 мкл 0.5 М HCl. Пробы кипятили в течение 6 мин, кислоту нейтрализовали 100 мкл 1.5 М имидазола. Образовавшийся [<sup>32</sup>P]цАМФ отделяли от других меченых нуклеотидов с помощью хроматографии на Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, используя в качестве элюента 10 мМ имидазол-HCl-буфер, рН 7.4. Радиоактивность измеряли на счетчике LKB 1209/1215 RackBeta (Швеция). Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка.

Определение ГТФ-связывания G-белков проводили, как описано ранее (Shpakov et al., 2010), используя радиоактивно меченный негидролиземый аналог ГТФ — [8-<sup>3</sup>H]GppNHp. Инкубационная смесь содержала 25 мМ Tris-HCl-буфер, рН 7.4, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитол, 0.1 % БСА, 1 мкМ немеченого GppNHp и 18 кБк [8-<sup>3</sup>H]GppNHp. Реакцию начинали внесением в каждую пробу 50—80 мкг мембранного белка. После инкубации (45 мин, 30 °С) реакцию останавливали 100 мкл 0.1 % Lubrol-PX в 20 мМ K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-фосфатном буфере, рН 8.0. Пробы фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры (NA, 0.45 мкм, Millipore, США), фильтры дважды промывали 4 мл 20 мМ фосфатного буфера, рН 8.0, высушивали и помещали в вials со сцинтилляционной смесью, содержащей 0.4 % 2.5-дифенилоксазола и 0.02 % 1-4бис-2-5-фенилоксазолилбензола. Радиоактивность измеряли на счетчике LKB 1209/1215 RackBeta (Швеция). Специфическое ГТФ-связывание определяли как разность между связыванием [8-<sup>3</sup>H]GppNHp в отсутствие и в присутствии 10 мМ ГТФ и выражали в пмоль [8-<sup>3</sup>H]-GppNHp на 1 мг белка. Преинкубацию мембран с пептидом 349—359 проводили при 4 °С в течение 10 мин.

Реакцию АДФ-рибозилирования мембран с помощью бактериальных токсинов проводили, как описано ранее (Shpakov et al., 2010). Фракции мембран (концентрация белка около 1 мг/мл) инкубировали (45 мин, 37 °С) со 100 мкг/мл ХТ или 10 мкг/мл КТ в 400 мкл 50 мМ Tris-HCl-буфера, рН 7.8, содержащего 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ дитиотреитол, 0.1 мМ НАД, 1 мМ АДФ, 0.1 мМ GppNHp (для ХТ) или ГТФ (для КТ), 1 мМ АТФ, 10 мМ тимидин и коктейль ингибиторов протеаз. Предварительно АДФ-рибозилтрансферазы активировали (15 мин, 37 °С) с помощью 20 мМ дитиотреитола и 0.1 % додецилсульфата натрия (при использовании ХТ) или 1 мМ АТФ и 0.1 % Lubrol-PX (при использовании КТ). После окончания реакции суспензию мембран разводили до объема 5 мл охлажденным до 4 °С 50 мМ Tris-HCl-бу-

фером, рН 7.5, содержащим 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, центрифугировали (37 000 *g*, 15 мин), осадок ресуспендировали в том же буфере и использовали для экспериментов. Сходным образом обрабатывали контрольные мембраны, но без токсинов.

Статистический анализ данных проводили с использованием метода ANOVA (Manugistics Inc., США). Каждый эксперимент выполняли трехкратно. Данные представлены в виде средних величин и их среднестатистических ошибок из нескольких независимых экспериментов. Различия между пробами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента как достоверные при *p* < 0.05. Графические изображения и расчет значений EC<sub>50</sub> анализировали с использованием программы анализа GraphPad Prism.

## Результаты

В контрольных мембранах TP03 стимулировал базальную активность АЦ и базальный уровень ГТФ-связывания G-белков, причем в семенниках стимулирующий эффект был выражен в большей степени, чем в яичниках (рис. 1). Значения EC<sub>50</sub> для стимулирующего эффекта TP03 на активность АЦ в семенниках и яичниках составили 442 и 375 нМ соответственно. Своего максимума стимулирующий эффект TP03 на активность АЦ достигал в концентрации 10<sup>-5</sup> М. В случае стимуляции ГТФ-связывания было выявлено небольшое по величине повышение эффекта TP03 в концентрациях выше 10<sup>-5</sup> М. В дальнейшем было показано, что это связано со стимуляцией G<sub>q</sub>-белков, функционально не сопряженных с АЦ. Полученные данные свидетельствуют об эффективности стимулирующего влияния TP03 на компоненты аденилатциклазной системы в клетках репродуктивной системы крыс.

На следующем этапе с помощью бактериальных токсинов и С-концевого пептида 349—359 Gα<sub>q</sub>-субъединицы изучали селективность стимулирующего влияния TP03 на различные типы G-белков. Инкубация мембран с ХТ приводит к выключению из сигнальной трансдукции G<sub>s</sub>-белков, что обусловлено АДФ-рибозилированием их Gα<sub>s</sub>-субъединицы по остатку Arg<sup>189</sup>. Такая модификация ведет к неспособности этой субъединицы гидролизовать ГТФ и как следствие — к переходу G<sub>s</sub>-белка в перманентно активированное состояние, в котором он нечувствителен к гормонам. Инкубация с КТ приводит к ингибированию G<sub>i/o</sub>-белков, что связано с АДФ-рибозилированием остатка цистеина, который расположен в С-концевом сегменте Gα<sub>i/o</sub>-субъединицы, ответственном за взаимодействие с активированным рецептором (Gudermann et al., 1996). В свою очередь С-концевой пептид 349—359 конкурирует с С-концевым участком Gα<sub>q</sub>-субъединицы за связывание с активированным рецептором, в результате чего нарушается его взаимодействие с G<sub>q</sub>-белком и подавляются G<sub>q</sub>-зависимые сигнальные каскады (Chillar et al., 2010).

В мембранах яичников и семенников, обработанных ХТ, стимулирующий эффект TP03 на АЦ подавлялся (рис. 2). При этом стимулирующий эффект 10<sup>-6</sup> М TP03 на ГТФ-связывание при обработке ХТ блокировался, в то время как в более высокой концентрации TP03 (10<sup>-4</sup> М) этот эффект ингибировался в меньшей степени и составил 29 (семенники) и 20 (яичники) % от такового в контрольных мембранах (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что основной пул G-белков, активируемых

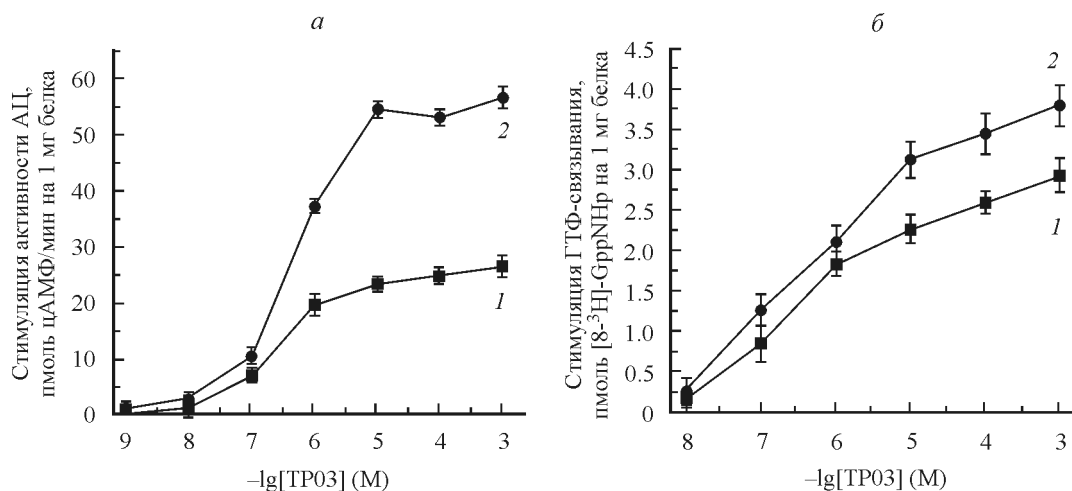


Рис. 1. Стимулирующий эффект TRP3 на базальную активность аденилатциклазы (а) и уровень ГТФ-связывания (б) в мембранах, выделенных из яичников и семенников крыс.

1 — яичники, 2 — семенники. По оси ординат: а — прирост активности АЦ, пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка; б — прирост ГТФ-связывания, пмоль [8-<sup>3</sup>H]-GppNHp на 1 мг белка. По оси абсцисс — отрицательный десятичный логарифм концентрации TRP3, М. Базальная активность АЦ в яичниках и семенниках составила  $28.4 \pm 0.9$  и  $20.8 \pm 1.0$  пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка, базальный уровень ГТФ-связывания в яичниках и семенниках —  $3.47 \pm 0.23$  и  $2.82 \pm 0.22$  пмоль [8-<sup>3</sup>H]-GppNHp на 1 мг белка соответственно.

TRP3 в концентрации  $10^{-6}$  М, составляют G<sub>s</sub>-белки, через которые осуществляется стимуляция АЦ, в то время как в концентрации  $10^{-4}$  М начинает выявляться стимулирующее действие TRP3 на G-белки, нечувствительные к ХТ. В случае ХГЧ в обработанных ХТ мембранах отмечали блокирование его эффекта на АЦ, в то время как прирост ГТФ-связывания в яичниках и семенниках снижался лишь на 45 и 46 % (рис. 2, 3).

В овариальных и тестикулярных мембранах обработка КТ существенно не влияла на стимулирующие эффекты TRP3 и ХГЧ на активность АЦ. Только в тестикулярных мембранах отмечали небольшое снижение прироста ГТФ-связывания, вызванного обработкой ХГЧ, но различия с контролем не были статистически значимыми (рис. 2, 3). Это свидетельствует в пользу того, что сопряжение рецептора ЛГ-ХГЧ с G<sub>i/o</sub>-белками не вносит существенного вклада в сигнальную трансдукцию, вызывае-

мую гонадотропинами, а также того, что G<sub>i/o</sub>-белки не являются мишенями для тиенопиримидинов.

На основании представленных выше данных было высказано предположение, что неполное ингибирование стимулирующего эффекта TRP3 ( $10^{-4}$  М) и ХГЧ ( $10^{-8}$  М) в мембранах, обработанных ХТ, связано с активацией G<sub>q</sub>-белков, через которые осуществляется регуляция фосфолипазы С и зависимых от нее каскадов. Для доказательства этого использовали пептид 349—359, нарушающий сопряжение G<sub>q</sub>-белков с активированным рецептором. Стимулирующий эффект TRP3 и гонадотропина на активность АЦ в мембранах, преинкубированных с пептидом, статистически значимо не отличался от такового в контрольных мембранах (рис. 2). В то же время преинкубация овариальных и тестикулярных мембран с пептидом приводила к снижению на 45 и 34 % стимулирующего эффекта ХГЧ на ГТФ-связывание. В случае TRP3 неболь-

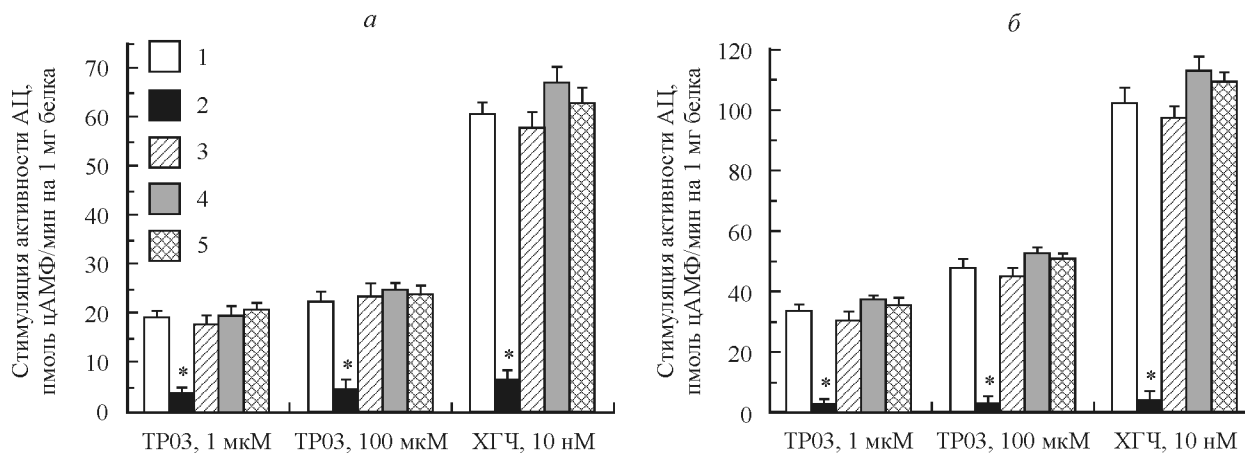


Рис. 2. Стимулирующий эффект TRP3 ( $10^{-6}$  и  $10^{-4}$  М) и ХГЧ ( $10^{-8}$  М) на активность АЦ в мембранах, которые были обработаны бактериальными токсинами или инкубированы с пептидом 349—359 Gα<sub>q</sub>-субъединицы.

Мембраны выделяли из яичников (а) и семенников (б) крыс. 1 — контрольные мембраны, без обработки токсинами (контроль № 1), 2 — мембраны, обработанные ХТ, 3 — мембраны, обработанные КТ, 4 — контрольные мембраны, инкубированные без пептида (контроль № 2), 5 — мембраны, инкубированные с пептидом 349—359. Различия между эффектами TRP3 и ХГЧ на активность АЦ в контрольных мембранах (1) и в мембранах, обработанных токсинами (\*), статистически значимы при  $p < 0.05$ .

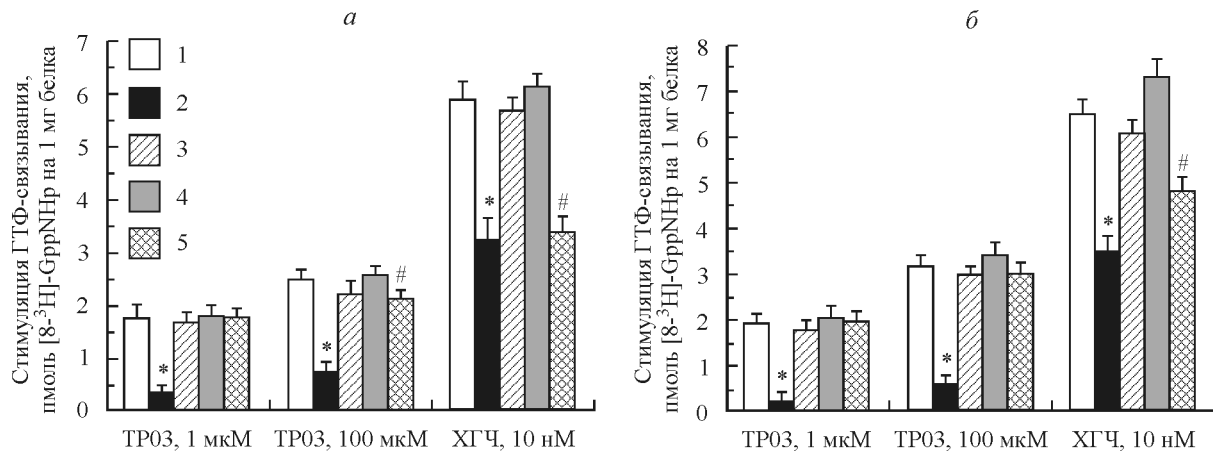


Рис. 3. Стимулирующий эффект ТР03 ( $10^{-6}$  и  $10^{-4}$  М) и ХГЧ ( $10^{-8}$  М) на ГТФ-связывание G-белков в мембранах, которые были обработаны бактериальными токсинами или инкубированы с пептидом 349—359 Gα<sub>q</sub>-субъединицы.

Мембраны выделяли из яичников (а) и семенников (б) крыс. 1 — контрольные мембраны, без обработки токсинами (контроль № 1), 2 — мембраны, обработанные ХТ, 3 — мембраны, обработанные КТ, 4 — контрольные мембраны, инкубированные без пептида (контроль № 2), 5 — мембраны, инкубированные с пептидом 349—359. Различия между эффектами ТР03 и ХГЧ на ГТФ-связывание в контрольных мембранах (1) и в мембранах, обработанных токсинами (\*), и между соответствующими эффектами в контрольных мембранах (4) и в мембранах, инкубированных с пептидом (#), статистически значимы при  $p < 0.05$ .

шое по величине снижение эффекта на ГТФ-связывание отмечали только при его концентрации  $10^{-4}$  М (рис. 3). Эти данные указывают на то, что в отличие от ХГЧ, мишенями которого в одинаковой степени являются G<sub>s</sub>- и G<sub>q</sub>-белки, действие тиенопиримидиновых производных направлено в основном на G<sub>s</sub>-белки. И только в относительно высокой концентрации, которая на два порядка превосходит значение EC<sub>50</sub> для стимулирующего эффекта ТР03 на АЦ, выявляется хотя и слабо выраженная его способность активировать G<sub>q</sub>-белки.

## Обсуждение

Тиенопиримидиновые производные с активностью низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ-ХГЧ имеют ряд преимуществ перед гонадотропинами: это отсутствие присущей гонадотропинам иммуногенности, устойчивость при хранении, более низкая стоимость, а также сохранение специфической биологической активности при пероральном введении. Эффективность перорального способа доставки тиенопиримидинов обусловлена их устойчивостью к деградации в желудочно-кишечном тракте, способностью легко всасываться в кровь и преодолевать гематоовариальный и гематотестикулярный барьеры, что обеспечивает их адресную доставку к клеткам-мишеням. Однако одним из наиболее важных преимуществ является отсутствие у тиенопиримидиновых производных характерных для гонадотропинов побочных эффектов, таких как быстрое развитие резистентности к действию ЛГ и ХГЧ, что после отмены препаратов приводит к длительному нарушению функций гонадной оси, и развитие синдрома гиперстимуляции яичников при использовании гонадотропинов для индукции овуляции у женщин. Этот синдром представляет собой наиболее тяжелое осложнение, возникающее в ходе процедуры экстракорпорального оплодотворения, и часто приводит к женскому бесплодию. Установлено, что применение тиенопиримидиновых производных для индукции овуляции у женщин, а также у экспериментальных животных почти полностью исключает развитие синдрома гиперсти-

муляции яичников (Van de Lagemaat et al., 2009, 2011; Gerrits et al., 2013). Так, при обработке крыс с помощью соединения Org 43553, которое является прототипом для синтезированного и изученного нами соединения ТР03, размеры яичников и проницаемость кровеносных сосудов в них практически не менялись. Согласно данным биохимических исследований, основной причиной этого считают снижение, а не повышение, как в случае использования гонадотропинов, продукции фактора роста эндотелия сосудов зернистыми клетками яичников при обработке животных Org 43553 (Van de Lagemaat et al., 2011). Это делает тиенопиримидиновые производные более перспективными препаратами во вспомогательных репродуктивных технологиях в сравнении с гонадотропинами. Однако молекулярных механизмов, которые лежат в основе дифференцированного влияния гонадотропинов и тиенопиримидинов на синтез и секрецию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), не было установлено.

Можно предположить, что важнейшим механизмом, обуславливающим существенные различия физиологических эффектов, вызываемых гонадотропинами и тиенопиримидинами, является селективность низкомолекулярных агонистов по отношению к внутриклеточным сигнальным каскадам в клетках репродуктивной системы. В пользу этого свидетельствуют данные о механизмах действия соединения Org 43553 на внутриклеточные каскады в культурах клеток, где экспрессируется рецептор ЛГ-ХГЧ. Голландские ученые показали, что в концентрациях  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М соединение Org 43553 с высокой эффективностью стимулирует активность АЦ, но почти не влияет на активность фосфолипазы С. При этом повышение уровня cАМФ в клетках, обработанных Org 43553, составило 62 % от такового при их обработке ЛГ, в то время как стимулирующий эффект тиенопиримидина на активность фосфолипазы С не превышал 5 % от такового для гонадотропина (Van Koppen et al., 2008). На основании этого авторы заключили, что связывание рецептора ЛГ-ХГЧ с соединением Org 43553 лишь незначительно влияет на зависимый от G<sub>q</sub>-белков и фосфолипазы С фосфоинозитидный обмен.

В рамках проведенного исследования нами были получены подтверждающие это доказательства. С помощью селективного выключения  $G_s$ -белков при обработке мембран ХТ и конкурентного ингибирования  $G_q$ -белков с помощью пептида 349—359, соответствующего С-концевому участку  $G\alpha_q$ -субъединицы, было показано, что TR03 как в яичниках, так и в семенниках активирует преимущественно  $G_s$ -белки. При этом стимулирующее действие TR03 на  $G_q$ -белки выявлялось лишь в сравнительно высокой его концентрации ( $10^{-4}$  М), да и то в очень небольшой степени. При низкой концентрации ( $10^{-6}$  М), близкой значению  $EC_{50}$  для стимулирующего эффекта TR03 на активность  $G_s$ -белков, такое влияние вовсе отсутствовало. В свою очередь в мембранах, обработанных ХГЧ, отмечали сопоставимый по величине стимулирующий эффект гонадотропина на активность обоих типов G-белков, что свидетельствует в пользу отсутствия у гонадотропина селективности по отношению к  $G_s$ - и  $G_q$ -сигнальным каскадам.

Отчетливо выраженные стимулирующие эффекты TR03 и ХГЧ на активность  $G_s$ -белков опосредуют активацию ими АЦ и цАМФ-зависимых сигнальных каскадов, которые определяют способность гонадотропинов и низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ-ХГЧ влиять на синтез и секрецию стероидных гормонов. Повышение уровня цАМФ в клетках репродуктивной системы приводит к активации StAR-белка, осуществляющего транспорт холестерина в митохондрии, где осуществляются начальные стадии синтеза стероидных гормонов, и ключевых ферментов стероидогенеза — цитохрома P450<sub>sc</sub>, 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы, цитохрома P450-17 $\alpha$ , обладающего активностью 17 $\beta$ -гидроксилазы и С17,20-лиазы, и 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы (Бахтюков, Шпаков, 2016). Следствием активации системы стероидогенеза является синтез тестостерона клетками Лейдига у мужчин и синтез андростендиона, основного предшественника эстрадиола, в яичниках и прогестерона желтым телом у женщин.

Имеются веские основания полагать, что различия в стимулирующем действии гонадотропинов и тиенопиримидиновых производных на  $G_q$ -белки определяют их способность влиять на функциональную активность VEGF-зависимых сигнальных путей. Как отмечалось выше, способность гонадотропинов (но не низкомолекулярных агонистов) активировать эти пути ведет к развитию синдрома гиперстимуляции яичников. В пользу непосредственного участия  $G_q$ -белков в контроле VEGF-зависимых путей свидетельствуют данные, полученные на клетках эндотелия сосудов. Так, показано, что агонисты  $G_q$ -сопряженных рецепторов активируют не только фосфолипазу С, но и VEGF-сигнальные пути, о чем свидетельствует повышение фосфорилирования рецептора VEGF и зависимых от VEGF нижележащих протеинкиназ. В то же время в клетках, дефицитных по  $G_q$ -белкам, было выявлено как уменьшение мобилизации катионов кальция из внутриклеточных депо, так и снижение фосфорилирования рецептора VEGF, что ослабляло пролиферацию клеток и усиливало в них апоптоз (Zeng et al., 2003; Sivaraj et al., 2015). У мышей, нокаутных по гену для  $G\alpha_q$ -субъединицы, отмечали сильно выраженное снижение чувствительности к VEGF, что приводило к ингибированию VEGF-индуцируемого ангиогенеза и снижало проницаемость сосудов (Sivaraj et al., 2015).

Следует отметить, что специфичность ЛГ и ХГЧ к гетеротримерным G-белкам может в значительной степени

зависеть от модификации их  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц олигосахаридными цепями, как это показано для ФСГ (Jiang et al., 2014; Szkudlinski, 2015). Установлено, что молекулярные механизмы действия гонадотропинов определяются не только интенсивностью N-гликозилирования их субъединиц, но также структурой и зарядом олигосахаридных цепей. Однако до сих пор не удалось идентифицировать те изоформы гонадотропинов, которые были бы специфичны в отношении определенных молекулярных мишеней. Ситуация осложняется тем, что рецепторы гонадотропинов могут функционально взаимодействовать с  $\beta$ -аррестинами, и в этом случае гонадотропины запускают независимые от G-белков сигнальные каскады, через которые они стимулируют каскад митогенактивируемых протеинкиназ (Casarini et al., 2016). Таким образом, можно предположить, что различные изоформы гонадотропинов, связываясь с ортостерическим сайтом рецептора, способны стабилизировать не менее трех его активных конформаций, в которых он эффективно взаимодействует с  $G_s$ -белками,  $G_q$ -белками или  $\beta$ -аррестинами, что ведет к активации соответственно цАМФ-зависимого пути,  $Ca^{2+}$ -зависимого пути и каскада митогенактивируемых протеинкиназ. В то же время тиенопиримидиновые производные, взаимодействующие с аллостерическим сайтом рецептора, обладают большей селективностью и стабилизируют ту конформацию рецептора, в которой он наиболее эффективно взаимодействует с  $G_s$ -белками. Нельзя исключить, что в дальнейшем могут быть разработаны низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ-ХГЧ, специфично запускающие сигнальные каскады, в которые вовлечены  $G_q$ -белки и  $\beta$ -аррестины. Однако в настоящее время скрининг низкомолекулярных агонистов проводится по их способности стимулировать стероидогенез, ключевую роль в котором играют  $G_s$ -белки, вследствие чего  $G_q$ - и  $\beta$ -аррестин-специфичные агонисты исключаются из исследований как неактивные.

Таким образом, с помощью методологии АДФ-риboзилирования бактериальными токсинами и пептидной стратегии, основанной на применении С-концевого пептида  $G\alpha_q$ -субъединицы, установлена селективность действия TR03, низкомолекулярного агониста рецептора ЛГ-ХГЧ, на  $G_s$ -белки, которые являются сопрягающим компонентом аденилатциклазной сигнальной системы, ответственной за стимуляцию стероидогенеза в яичниках и семенниках. В свою очередь гонадотропины (ХГЧ и рекомбинантный ЛГ) не обладают такой селективностью, активируя как  $G_s$ -, так и  $G_q$ -белки, что может приводить к ряду характерных для них побочных эффектов. Разработка селективных регуляторов рецептора ЛГ-ХГЧ на основе тиенопиримидиновых производных является перспективным направлением для создания лекарственных препаратов, которые направленно регулируют стероидогенез и не влияют или слабо влияют на другие физиологические процессы, контролируемые гонадотропинами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00126). ЯМР и масс-спектрометрические исследования проведены с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Магнитно-резонансные методы исследования» и «Методы анализа состава вещества», изучение активности АЦ и уровня ГТФ-связывания выполнены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

## Список литературы

- Бахтюков А. А., Шпаков А. О. 2016. Молекулярные механизмы регуляции стероидогенеза в клетках Лейдига. Цитология. 58 (9) : 666—678. (Bakhtuykov A. A., Shpakov A. O. 2016. The molecular mechanisms of steroidogenesis regulation in Leydig cells. Tsitologiya. 58 (9) : 666—678.)
- Деркач К. В., Дарьин Д. В., Бахтюков А. А., Лобанов П. С., Шпаков А. О. 2016. Изучение функциональной активности новых низкомолекулярных агонистов рецептора лютеинизирующего гормона *in vitro* и *in vivo*. Биол. мембраны. 33 (4) : 263—271. (Derkach K. V., Dar'in D. V., Bakhtuykov A. A., Lobanov P. S., Shpakov A. O. 2016. *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 Biol. 10 (4) : 294—300.)
- Деркач К. В., Дарьин Д. В., Лобанов П. С., Шпаков А. О. 2014. Тиенопиримидиновые производные повышают уровень тестостерона при их интратестикулярном, внутрибрюшинном и пероральном введении самцам крыс. Докл. РАН. 459 (3) : 382—385. (Derkach K. V., Dar'in D. V., Lobanov P. S., Shpakov A. O. 2014. Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. Dokl. Biol. Sci. 459 (1) : 326—329.)
- Шпаков А. О. 2015. Новые достижения в разработке и изучении механизмов действия низкомолекулярных агонистов рецепторов тиреотропного и лютеинизирующего гормонов. Цитология. 57 (3) : 167—176. (Shpakov A. O. 2015. New achievements in the development and study of the mechanisms of action of the low molecular weight agonists of receptors of the thyroid-stimulating and the luteinizing hormones. Tsitologiya. 57 (3) : 167—176.)
- Шпаков А. О., Дарьин Д. В., Деркач К. В., Лобанов П. С. 2014а. Стимулирующее влияние тиенопиримидиновых производных на аденилатциклязную сигнальную систему в семенниках крыс. Докл. РАН. 456 (4) : 494—498. (Shpakov A. O., Dar'in D. V., Derkach K. V., Lobanov P. S. 2014a. The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenylyl cyclase systems in the rat testes. Dokl. Biochem. Biophys. 456 (1) : 104—107.)
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Дарьин Д. В., Лобанов П. С. 2014б. Активация аденилатциклазы тиенопиримидиновыми производными в семенниках и яичниках крыс. Цитология. 56 (5) : 346—352. (Shpakov A. O., Derkach K. V., Dar'in D. V., Lobanov P. S. 2014b. Activation of adenylyl cyclase by thienopyrimidine derivatives in rat testes and ovaries. Cell Tissue Biol. 8 (5) : 400—406.)
- Casarini L., Reiter E., Simoni M. 2016.  $\beta$ -arrestins regulate gonadotropin receptor-mediated cell proliferation and apoptosis by controlling different FSHR or LHCGR intracellular signaling in the hGL5 cell line. Mol. Cell. Endocrinol. 437 : 11—21.
- Chillar A., Wu J., Cervantes V., Ruan K. H. 2010. Structural and functional analysis of the C-terminus of  $G\alpha_q$  in complex with the human thromboxane A2 receptor provides evidence of constitutive activity. Biochemistry. 49 : 6365—6374.
- Derkach K. V., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Bernstein L. M., Shpakov A. O. 2015. The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes. Int. J. Endocrinol. 2015 : 245—459.
- Gerrits M., Mannaerts B., Kramer H., Addo S., Hanssen R. 2013. First evidence of ovulation induced by oral LH agonists in healthy female volunteers of reproductive age. J. Clin. Endocrinol. Metab. 98 : 1558—1566.
- Gilchrist R. L., Ryu K. S., Ji I., Ji T. H. 1996. The luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for cAMP and inositol phosphate signals. J. Biol. Chem. 271 : 19 283—19 287.
- Gudermann T., Kalkbrenner F., Schultz G. 1996. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36 : 429—460.
- Heitman L. H., Ijzerman A. P. 2008. G protein-coupled receptors of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: a case for GnRH, LH, FSH, and GPR54 receptor ligands. Med. Res. Rev. 28 : 975—1011.
- Jiang X., Dias J. A., He X. 2014. Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling. Mol. Cell. Endocrinol. 382 : 424—451.
- Kleinau G., Krause G. 2009. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. Endocr. Rev. 30 : 133—151.
- Nataraja S. G., Yu H. N., Palmer S. S. 2015. Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. Front. Endocrinol. (Lausanne). 6 : 142.
- Puett D., Li Y., DeMars G., Angelova K., Fanelli F. 2007. A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. Mol. Cell. Endocrinol. 260 : 126—136.
- Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V., Vlasov G. P. 2010. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system. Int. J. Pept. Res. Ther. 16 : 95—105.
- Sivaraj K. K., Li R., Albarran-Juarez J., Wang S., Tischner D., Grimm M., Swiercz J. M., Offermanns S., Wettschurek N. 2015. Endothelial  $G\alpha_{q/11}$  is required for VEGF-induced vascular permeability and angiogenesis. Cardiovasc. Res. 108 : 171—180.
- Szkudlinski M. W. 2015. New frontier in glycoprotein hormones and their receptors structure-function. Front. Endocrinol. (Lausanne). 6 : 155.
- Troppmann B., Kleinau G., Krause G., Gromoll J. 2013. Structural and functional plasticity of the luteinizing hormone/choriogonadotrophin receptor. Hum. Reprod. Update. 19 : 583—602.
- Van de Lagemaat R., Raafs B. C., van Koppen C., Timmers C. M., Mulders S. M., Hanssen R. G. 2011. 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. 152 : 4350—4357.
- Van de Lagemaat R., Timmers C. M., Kelder J., van Koppen C., Mosselman S., Hanssen R. G. 2009. Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor. Hum. Reprod. 24 : 640—648.
- Van Koppen C. J., Zaman G. J., Timmers C. M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M. J., Hanssen R. G. 2008. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 378 : 503—514.
- Zeng H., Zhao D., Yang S., Datta K., Mukhopadhyay D. 2003. Heterotrimeric  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  proteins function upstream of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (KDR) phosphorylation in vascular permeability factor/VEGF signaling. J. Biol. Chem. 278 : 20 738—20 745.

FEATURES OF REGULATION OF HETEROTRIMERIC G-PROTEINS BY  
CHORIONIC GONADOTROPIN AND LOW-MOLECULAR WEIGHT  
AGONIST OF LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR

K. V. Derkach,<sup>1</sup> A. A. Bakhtyukov,<sup>1</sup> A. A. Shpakov,<sup>2</sup>  
D. V. Dar'in,<sup>2</sup> A. O. Shpakov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, 194223,  
and <sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 198504;

\* e-mail: alex\_shpakov@list.ru

The luteinizing hormone (LH) and its homolog, human chorionic gonadotropin (hCG), are important regulators of the reproductive system. They specifically bind to LH-hCG receptor and stimulate different types of G-proteins, primarily G<sub>s</sub>- and G<sub>q</sub>-protein, leading to the activation of adenylyl cyclase (AC) and phospholipase C, respectively. It is assumed that many side effects of LH and hCG may be caused by low selectivity of their action on G-proteins. The low-molecular weight agonists of LH-hCG receptor developed on the basis of thienopyrimidine derivatives do not have these side effects. The differences in the interaction with G-proteins may be one reason for this. To verify this, a comparative study of the effect of hCG and synthesized by us earlier thienopyrimidine, 5-amino-*N*-*tert*-butyl-2-(methylsulfanyl)-4-(3-(nicotinamide)phenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine 6-carboxamide (TP03), on the AC activity and the GTP-binding of G-proteins in the plasma membranes isolated from rat ovaries and testes. Cholera (ChT) and pertussis (PT) toxins were used for selective switching off of G<sub>s</sub>- and G<sub>i/o</sub>-proteins from signal transduction, and to suppress G<sub>q</sub>-dependent cascades the peptide corresponding to the C-terminal segment 349—359 of G $\alpha_q$ -subunit was taken. It was shown that the treatment of ovarian and testicular membranes with ChT resulted in complete inhibition of the TP03 and hCG stimulating effects on AC activity, but had different effects on the stimulation of GTP binding by them. It completely suppressed this effect in the case of TP03 (10<sup>-6</sup> M), and decreased by 45—46 % in the case of hCG (10<sup>-8</sup> M). Pre-incubation of membranes with the peptide 349—359 decreased by 34 (ovaries) and 45 % (testes) the stimulating effect of hCG on the GTP-binding, but did not affect the corresponding effect of TP03 (10<sup>-6</sup> M). Pre-incubation with the peptide 349—359 also reduced the stimulating GTP-binding effect of 10<sup>-4</sup> M TP03, but to a small extent. These data indicate that, unlike hCG whose targets in the ovaries and testes are G<sub>s</sub>- and G<sub>q</sub>-protein to the same degree, the TP03 acts mainly on G<sub>s</sub>-proteins. Only at a concentration which exceeds the value of EC<sub>50</sub> by two orders, TP03 has the ability, albeit relatively weak, to activate G<sub>q</sub>-protein. The PT treatment of membranes did not influence the effects of TP03 and hCG, indicating a lack of effective interaction with G<sub>i/o</sub>-proteins. Thus, a significant advantage of low-molecular weight agonists of LH-hCG receptor, as compared with gonadotropins, is selective activation of G<sub>s</sub>-dependent signaling cascades responsible for the synthesis and production of steroid hormones.

**Key words:** heterotrimeric G-protein, low-molecular weight agonist, gonadotropin, luteinizing hormone receptor, GTP-binding, adenylyl cyclase, thienopyrimidine, cholera toxin.