

Основные принципы аллостерической регуляции гормональных рецепторов, сопряженных с G-белками

Шпаков А.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,

Санкт-Петербург, Россия

alex_shpakov@list.ru

Ключевые слова: аллостерическая регуляция; G-белок-сопряженный рецептор; сигнальная трансдукция; трансмембранный домен; ортостерический агонист; рецептор лютеинизирующего гормона; пепдуцин; инверсионный агонист; аутоантитела к рецепторам

Рецепторы, сопряженные с $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримерными G-белками (GPCR), играют ключевую роль в передаче гормональных сигналов к внутриклеточным сигнальным каскадам и потому ответственны за регуляцию экспрессии генов и посттрансляционную модификацию белков, вовлечены в контроль пролиферации, апоптоза, дифференцировки. Для каждого GPCR имеется свой эндогенный регулятор, как правило, гормон или нейромедиатор (ортостерический агонист), который с высоким сродством связывается с лиганд-связывающим ортостерическим сайтом GPCR, переводя рецептор в активное состояние и запуская тем самым процесс сигнальной трансдукции, опосредуемый через различные типы G-белков и β -аррестинов. На протяжении многих лет основные исследования в области фармакологии GPCR были направлены на создание синтетических лигандов ортостерического сайта с определенным спектром биологической активности, вследствие чего значительная часть лекарств, мишенями которых являются GPCR, — это лиганды их ортостерического сайта. В последнее время акцент в изучении GPCR сместился в сторону исследования их аллостерической регуляции, и основной импульс этому придали исследования в области расшифровки пространственной структуры GPCR, стартовавшие в конце 2000-х гг., после открытия 3D структуры β_2 -адренергического рецептора [1]. Сначала считали, что в молекуле GPCR имеется сравнительно мало аллостерических сайтов, от одного до 3–4. Предполагали также, что ортостерический и аллостерический сайты должны быть локализованы в разных субдоменах GPCR и не пересекаться. Однако в дальнейшем было показано, что число аллостерических сайтов в GPCR существенно больше, локализованы они во всех основных субдоменах рецептора и могут физически перекрываться с ортостерическим сайтом [2].

Наиболее характерной локализацией аллостерических сайтов являются внеклеточные субдомены GPCR, в том числе внешний вестибуль трансмембранного (ТМ) канала, формируемый внеклеточными петлями и внешними окончаниями гидрофобных ТМ спиралей [2, 3]. Функции этих субдоменов состоят в первичном опознавании и низкоаффинном связывании гормонов и формировании гомо- и гетеродимерных рецепторных комплексов [4]. Кроме того, в некоторых GPCR, например в рецепторах лютеинизирующего (ЛГ) и тиреотропного (ТТГ) гормонов, имеются значительные по размеру эктодомены, которые содержат высокоаффинные ортостерические сайты и при этом являются мишенями для

аллостерических регуляторов, которые не только модулируют связывающие характеристики GPCR, но и способны сами регулировать их активность, как это показано для аутоантител к рецептору ТТГ [5, 6]. Эндогенными регуляторами внеклеточных аллостерических сайтов, наряду с аутоантителами, могут быть белки, модифицирующие активность рецепторов (RAMP), протомеры других рецепторов, в том числе рецепторы тирозинкиназного типа и ионотропные рецепторы, а также пептидные регуляторы, например агути-подобный пептид в случае МЗ- и М4-меланокортиновых рецепторов. В последние годы разработаны низкомолекулярные соединения, способные связываться с полостью внешнего вестибюля ТМ канала [3]. Они влияют на доступность ортостерического сайта для агонистов, а также способны регулировать активность лиганд-свободного GPCR. Другой локализацией аллостерических сайтов является внутренняя полость ТМ канала, которая доступна для сравнительно небольших молекул и ионов. Внутри нее обычно располагаются несколько аллостерических сайтов, которые могут перекрываться между собой и с ортостерическим сайтом. Эндогенными лигандами аллостерических сайтов, расположенных в ТМ канале, чаще всего являются ионы натрия и некоторых двухвалентных металлов (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+}) [3, 7]. В настоящее время разработано немало низкомолекулярных соединений, которые способны проникать внутрь ТМ канала и связываться с расположенными в нем аллостерическими сайтами. Так, для регуляции рецепторов ЛГ и ТТГ нами были разработаны производные тиено[2,3-d]-пиримидина с активностью как полных и инверсионных агонистов, так и нейтральных антагонистов этих рецепторов [3, 8, 9]. При введении крысам они были активны и при внутрибрюшинном, и при пероральном способе доставки, что указывает на их стабильность и хорошую всасываемость в желудочно-кишечном тракте. Низкомолекулярные аллостерические агонисты не конкурировали с гонадотропинами и ТТГ за связывание с рецептором, тем самым не препятствуя регуляции эндокринных функций эндогенными гормонами.

В ТМ домене аллостерические сайты также могут располагаться на его боковых поверхностях, контактируя с липидной фазой мембраны [2, 7]. Эндогенными лигандами таких сайтов могут быть липиды плазматической мембраны, в первую очередь холестерин и фосфолипиды, а также некоторые стероидные гормоны и их прекурсоры (прогестерон, прегненолон и др.). Взаимодействие липидов с этими аллостерическими сайтами GPCR обеспечивает тесные взаимосвязи между активностью рецепторов, с одной стороны, и липидным составом и физико-химическими свойствами мембраны, с другой [3, 7].

Еще одной локализацией аллостерических сайтов являются цитоплазматические петли и ориентированный вовнутрь клетки вестибюль ТМ канала. Эндогенными регуляторами этих сайтов служат гетеротримерные G-белки и β -аррестины, которые не только функционируют, как трансдукторы гормонального сигнала, но и осуществляют аллостерическую модуляцию активности рецепторов, определяя их аффинность к ортостерическому агонисту и предвзятость внутриклеточного сигналинга [3]. В последние годы ведется интенсивная разработка синтетических аллостерических регуляторов внутриклеточных сайтов – как низкомолекулярных соединений, так и модифицированных гидрофобными радикалами пептидов, производных функционально важных внутриклеточных участков GPCR, называемых пепдуцинами [10]. Нами разработаны модифицированные пальмитатом

пепдуцины NKDTKIAKK-Nle-A(562–572)-K(Palm)A и 612–627(Palm), соответствующие участкам третьей цитоплазматической петли рецепторов ЛГ и ТТГ, которые *in vitro* и *in vivo* проявляли активность частичных агонистов тех рецепторов, производными первичной структуры которых они являлись [3]. В основе действия пепдуцинов лежит изменение конформации внутриклеточных аллостерических сайтов вследствие их специфичного взаимодействия с комплементарными участками цитоплазматических петель рецептора и внутриклеточным вестибюлем ТМ канала.

Наряду с множественностью аллостерических сайтов необходимо принимать во внимание широкий спектр фармакологической активности их лигандов. Эти лиганды могут повышать или снижать сродство ортостерического агониста к рецептору и эффективность его действия, будучи соответственно позитивными (РАМ) или негативными (НАМ) аллостерическими модуляторами [2, 7]. Они могут тонко настраивать сигнальную трансдукцию, влияя на предвзятость действия ортостерического агониста на внутримолекулярные мишени, и тогда их относят к классу «молчащих» аллостерических модуляторов (SAM). Они могут быть наделены собственной активностью полных/частичных агонистов, инверсионных агонистов и нейтральных антагонистов или сочетать в себе свойства аллостерических агонистов и модуляторов (Ago-PAM, Ago-NAM).

Выводы: Таким образом, в основе аллостерической регуляции GPCR лежит множественность аллостерических сайтов, различающихся по локализации, структурно-функциональной организации и эндогенным регуляторам, причем эти сайты способны не только влиять на конформацию и связывающие характеристики ортостерического сайта, но и взаимодействовать между собой. Наряду с такими эндогенными лигандами аллостерических сайтов GPCR, как простые ионы, липиды, аминокислоты, полипептиды, важную роль в аллостерической регуляции GPCR играют процессы образования их комплексов с G-белками, β -аррестинами, RAMP, другими адаптерными и регуляторными белками, а также формирование гомо- и гетероди(олиго)мерных рецепторных комплексов. Все это существенно усложняет и обогащает механизмы GPCR-опосредуемой сигнальной трансдукции и создает мощную теоретическую и практическую базу для создания большого числа различающихся по своей селективности и фармакологическому профилю аллостерических регуляторов. Следует отметить, что такие регуляторы, в отличие от ортостерических агонистов, действуют более мягко, что снижает риски десенситизации GPCR, а также более специфичны по отношению к внутриклеточным эффекторам, что позволяет избежать ряда побочных эффектов, характерных для гормональной терапии. Для некоторых типов GPCR, например для рецептора ТТГ, для которых отсутствуют подходящие фармакологические регуляторы ортостерического сайта, создание аллостерических регуляторов является безальтернативным подходом [3].

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 19-75-20122).

Basic principles of allosteric regulation of hormonal receptors coupled to G proteins

Shpakov A.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, St. Petersburg, Russia
alex_shpakov@list.ru

Key words: allosteric regulation; G-protein coupled receptor; signal transduction; transmembrane domain; orthosteric agonist; luteinizing hormone receptor; gepducin; inverse agonist; receptor autoantibodies

$\alpha\beta\gamma$ -Heterotrimeric G-protein coupled receptors (GPCRs) play a key role in transmitting hormonal signals to intracellular signaling cascades, and are therefore responsible for the regulation of gene expression and post-translational modification of proteins, and are involved in the control of proliferation, apoptosis, and differentiation. Each GPCR has its own endogenous regulator, usually a hormone or neurotransmitter (orthosteric agonist), which binds with high affinity to the ligand-binding orthosteric site of the GPCR. This causes the receptor to transition to an active state and thereby triggers the signal transduction, mediated through different types of G-proteins and β -arrestins. Over the years, the main research in the field of GPCR pharmacology has been aimed at developing synthetic orthosteric site ligands with a specific spectrum of biological activity, as a result of which a significant part of the drugs that target GPCRs are ligands of their orthosteric site. Recently, the emphasis in the study of GPCRs has shifted towards the study of their allosteric regulation, and the main impetus for this was given by research in the field of deciphering the spatial structure of GPCRs, which started in the late 2000s, after the discovery of the 3D structure of the β_2 -adrenergic receptor [1]. At first, it was believed that the GPCR has relatively few allosteric sites, from one to 3–4. It was also assumed that the orthosteric and allosteric sites should be localized in different GPCR subdomains and not overlap. However, it was later shown that the number of allosteric sites in GPCRs is significantly greater; they are localized in all main subdomains of the receptor and can physically overlap with the orthosteric site [2]. The most typical localization of allosteric sites is the extracellular subdomains of GPCRs, including the outer vestibule of the transmembrane (TM) channel, formed by extracellular loops and the outer ends of hydrophobic TM helices [2, 3]. The functions of these subdomains are the primary recognition and low-affinity binding of hormones and the formation of homo- and heterodimeric receptor complexes [4]. In addition, some GPCRs, such as the receptors of luteinizing hormone (LH) and thyroid-stimulating hormone (TSH), have large ectodomains that contain high-affinity orthosteric sites. These ectodomains are targets for allosteric regulators, which not only modulate the binding characteristics of GPCRs, but also are capable of regulating their activity, as shown for autoantibodies to the TSH receptor [5, 6]. Endogenous regulators of extracellular allosteric sites, along with autoantibodies, can be receptor activity-modifying proteins (RAMPs), protomers of other receptors, including tyrosine kinase-type receptors and ionotropic receptors, as well as peptide regulators, for example, agouti-like peptide in the case of M3- and M4-melanocortin receptors. In recent years, low-molecular compounds have been developed that can bind to the cavity of the outer

vestibule of the TM channel [3]. They influence the accessibility of the orthosteric site for agonists and are able to regulate the activity of ligand-free GPCR.

Another localization of allosteric sites is the internal cavity of the TM channel, which is accessible to relatively small molecules and ions. Within this cavity there are usually several allosteric sites, which may overlap with each other and with the orthosteric site. Endogenous ligands of allosteric sites located in the TM channel are most often sodium ions and some divalent metals (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , and Cu^{2+}) [3, 7]. Currently, many low-molecular weight compounds have been developed that are able to penetrate inside the TM channel and bind to allosteric sites located in it. Thus, to regulate the LH and TSH receptors, we have developed thieno[2,3-d]-pyrimidine derivatives with the activity of both full and inverse agonists and neutral antagonists of these receptors [3, 8, 9]. When administered to rats, they were active both by intraperitoneal and oral routes of delivery, indicating their stability and good absorption in the gastrointestinal tract. Low-molecular weight allosteric agonists did not compete with gonadotropins and TSH for binding to the receptor, thereby not interfering with the regulation of endocrine functions by endogenous hormones.

In the TM domain, allosteric sites can also be located on its lateral surfaces, in contact with the lipid phase of the membrane [2, 7]. Endogenous ligands of such sites can be plasma membrane lipids, primarily cholesterol and phospholipids, as well as some steroid hormones and their precursors (progesterone, pregnenolone, etc.). The interaction of lipids with these allosteric GPCR sites provides a close relationship between receptor activity, on the one hand, and the lipid composition and physicochemical properties of the membrane, on the other [3, 7].

Another localization of allosteric sites is the cytoplasmic loops and the TM channel vestibule oriented inward to the cell. The endogenous regulators of these sites are heterotrimeric G-proteins and β -arrestins, which not only function as hormonal signal transducers, but also carry out allosteric modulation of receptor activity, determining their affinity for the orthosteric agonist and the bias of intracellular signaling [3]. In recent years, there has been intensive development of synthetic allosteric regulators of intracellular sites – both low-molecular compounds and peptides modified by hydrophobic radicals, derivatives of functionally important intracellular sites of GPCR, called pepducins [10]. We have developed palmitate-modified pepducins NKDTKIACK-Nle-A(562–572)-K(Palm)A and 612–627(Palm), corresponding to regions of the third cytoplasmic loop of the LH and TSH receptors, which *in vitro* and *in vivo* exhibited the activity of partial agonists of those receptors, derivatives of the primary structure of which they were [3]. The action of pepducins is based on a change in the conformation of intracellular allosteric sites due to their specific interaction with the complementary regions of the cytoplasmic loops of the receptor and the intracellular vestibule of the TM channel.

Along with the multiplicity of allosteric sites, it is necessary to take into account the wide range of pharmacological activities of their ligands. These ligands can increase or decrease the affinity of the orthosteric agonist for the receptor and the effectiveness of its action, being positive (PAM) or negative (NAM) allosteric modulators respectively [2, 7]. They can fine-tune signal transduction by biasing the action of the orthosteric agonist on intramolecular targets, and are then classified as silent allosteric modulators (SAMs). They can be endowed with their own activity as full/partial agonists, inverse agonists and neutral antagonists, or combine the properties of allosteric agonists and modulators (Ago-PAM, Ago-NAM).

Conclusion: Thus, the allosteric regulation of GPCRs is based on a multiplicity of allosteric sites that differ in localization, structural and functional organization, and endogenous regulators. These sites can influence not only the conformation and binding characteristics of the orthosteric site, but also interact with each other. Along with such endogenous ligands of allosteric GPCR sites as simple ions, lipids, amino acids, and polypeptides. The processes of formation of their complexes with G-proteins, β -arrestins, RAMPs, other adapter and regulatory proteins, as well as the formation of homo- and heterodi(oligo)meric receptor complexes are important in the allosteric regulation of GPCRs. All this significantly complicates and enriches the mechanisms of GPCR-mediated signal transduction, and creates a significant theoretical and practical basis for the creation of a large number of allosteric regulators that differ in their selectivity and pharmacological profile. It should be noted that such regulators, unlike orthosteric agonists, act more mildly, which reduces the risks of GPCR desensitization, and are also more specific to intracellular effectors, which avoids a number of side effects characteristic of hormonal therapy. For some types of GPCRs, for example, for the TSH receptor, for which there are no suitable pharmacological regulators of the orthosteric site, the creation of allosteric regulators is the only approach [3].

Funding: The study is supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 19-75-20122).

Список литературы/References

1. Cherezov V. et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*. 2007;318(5854):1258-1265. doi 10.1126/science.115057
2. Hedderich J.B. et al. The Pocketome of G-Protein-Coupled Receptors Reveals Previously Untargeted Allosteric Sites. *Nat Commun*. 2022;13:2567. doi 10.1038/s41467-022-29609-6
3. 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;24(7):6187. doi 10.3390/ijms24076187
4. Liu L. et al. Allosteric Ligands Control the Activation of a Class C GPCR Heterodimer by Acting at the Transmembrane Interface. *Elife*. 2021;10:e70188. doi 10.7554/eLife.70188
5. Duan J. et al. Structures of full-length glycoprotein hormone receptor signalling complexes. *Nature*. 2021;598(7882):688-692. doi 10.1038/s41586-021-03924-2
6. Kleinau G. et al. Structural-Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work. *Front Endocrinol*. 2017;8:86. doi 10.3389/fendo.2017.00086
7. Grundmann M., Bender E., Schamberger J., Eitner F. Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors and Their Allosteric Modulators. *Int J Mol Sci*. 2021;22:1763. doi 10.3390/ijms22041763
8. Derkach K.V. 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;24(23):16618. doi 10.3390/ijms242316618
9. Derkach K.V. et al. The Study of Biological Activity of a New Thieno[2,3-D]-Pyrimidine-Based Neutral Antagonist of Thyrotropin Receptor. *Bull Exp Biol Med*. 2022;172(6):713-717. doi 10.1007/s10517-022-05462-x
10. Ortiz Zacarias N.V. et al. Intracellular Receptor Modulation: Novel Approach to Target GPCRs. *Trends Pharmacol Sci*. 2018;39:547-559. doi 10.1016/j.tips.2018.03.002