

УДК 616-001.18:612.014.462:612.55

DOI: 10.36604/1998-5029-2022-84-32-36

## МОДИФИКАЦИЯ ЛИГАНДА TRPM8

П.Д.Тимкин, Э.А.Тимофеев, Е.А.Бородин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95

**РЕЗЮМЕ. Введение.** Методы *in silico* позволяют выявлять низкомолекулярные лиганды, обладающие высоким сродством к белку, но не могут ответить на вопрос: является ли лиганд его агонистом или антагонистом. **Цель.** Использование виртуальной модификации агониста TRPM8 ментола для решения указанной задачи. **Материалы и методы.** Модификацию структуры ментола осуществляли с использованием программы для компьютерного моделирования PyMol, удаляя гидрокси-группу в мета-положении и добавляли две новые гидрокси-группы в орто-положении. Для выявления особенностей стыковки ментола и его модифицированного производного в молекулярном кармане TRPM8 использовали сервис виртуальной молекулярной лаборатории Galaxy7TM, позволяющий с помощью методов гибкого межмолекулярного докинга определить, с какими аминокислотными остатками взаимодействует лиганд. **Результаты.** Ментол и его модифицированное производное образуют устойчивые комплексы с TRPM8, но водородные связи гидрокси-групп лигандов возникают с различными аминокислотными остатками. **Заключение.** Методами *in silico* удалось модифицировать структуру ментола и получить лиганд, связывающийся с TRPM8 иначе, чем природный. Модифицированный лиганд не связывается с ключевой аминокислотой активного центра TRPM8 тирозином 745 и в силу этого должен проявлять свойства антагониста. Предложенная стратегия является универсальной, позволит ускорить поиск лигандов к различным белкам и будет способствовать ускоренному поиску потенциальных лекарственных веществ методами *in silico*.

*Ключевые слова:* методы *in silico*, TRPM8, межмолекулярный докинг, ментол, агонисты, антагонисты.

## TRPM8 LIGAND MODIFICATION

P.D.Timkin, E.A.Timofeev, E.A.Borodin

Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

**SUMMARY. Introduction.** *In silico* methods make it possible to detect low molecular weight ligands with a high affinity for a protein, but cannot answer the question of whether the ligand is its agonist or antagonist. **Aim.** Use of a virtual modification of the TRPM8 agonist menthol to solve this problem. **Materials and methods.** The structure of menthol was modified using the PyMol computer simulation program, removing the hydroxy group in the meta position and adding two new hydroxy groups in the ortho positions. To identify the features of the docking of menthol and its modified derivative in the TRPM8 molecular pocket, the Galaxy7TM virtual molecular laboratory service was used, which allows to determine which amino acid residues the ligand interacts with by using flexible intermolecular docking methods. **Results.** Menthol and its modified derivative form stable complexes with TRPM8, but the hydrogen bonds of the hydroxyl groups of the ligands occur with different amino acid residues. **Conclusion.** Using *in silico* methods, it was possible to modify the structure of menthol and obtain a ligand that binds to TRPM8 differently than natural. The modified ligand does not bind to the key amino acid of the TRPM8 active site, tyrosine 745, and therefore should exhibit antagonist properties. The proposed strategy is universal, will accelerate the search for ligands to various proteins and will facilitate the accelerated search for potential drugs by *in silico* methods.

*Key words:* *in silico* methods, TRPM8, intermolecular docking, menthol, agonists, antagonists.

### Контактная информация

Евгений Александрович Бородин, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой химии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 675000, Россия, г. Благовещенск, ул. Горького, 95. E-mail: borodin54@mail.ru

### Correspondence should be addressed to

Evgeny A. Borodin, MD, PhD, DSc (Med.), Professor, Head of Department of Chemistry, Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: borodin54@mail.ru

### Для цитирования:

Тимкин П.Д., Тимофеев Э.А., Бородин Е.А. Модификация лиганда TRPM8 // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2022. Вып.84. С.32–36. DOI: 10.36604/1998-5029-2022-84-32-36

### For citation:

Timkin P.D., Timofeev E.A., Borodin E.A. TRPM8 ligand modification. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2022; (84):32–36 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2022-84-32-36

В развитии гиперчувствительности бронхов к низким температурам важная роль принадлежит рецепторному белку TRPM8 [1], который должен стать мишенью для лекарственных средств, предназначенных для профилактики и лечения гиперреактивности бронхов к действию холода [2, 3]. При создании новых лекарственных средств находят применение методы *in silico* [4, 5]. Ранее нами опубликованы результаты поиска лигандов к TRPM8 с помощью глубоких нейронных сетей и жесткого межмолекулярного докинга с использованием программы AutoDock [6]. Указанный подход позволяет выявлять низкомолекулярные лиганды, обладающие высоким сродством к белку, но не может ответить на вопрос: является ли лиганд агонистом или антагонистом белка. В настоящей работе приводятся результаты использования виртуальной модификации структуры классического агониста TRPM8 ментола для решения указанной задачи.

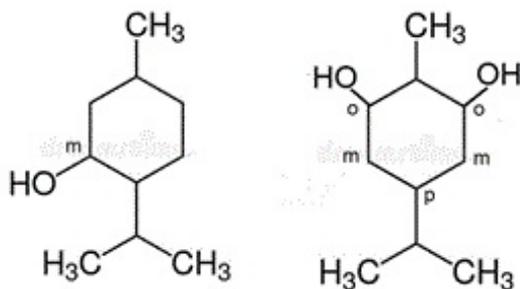


Рис. 1. Ментол и его модифицированное производное. о, m, p – положения в цикле.

### Материалы и методы исследования

Данные о первичной структуре мономера TRPM8 были взяты с ресурса UniProt [7]. 3D-модель белка мы смоделировали на сервере Swissmodel [8]. Созданная модель для цепи из 1094 аминокислот не могла быть использована для гибкого докинга, так как предназначенная для этого программа Galaxy7TM [9] не воспринимала модель вследствие большой длины аминокислотной цепи. Поэтому мы оптимизировали 3D-модель, взяв участок цепи со 194 по 980 аминокислотные остатки. В качестве лиганда TRPM8 использовали его классический агонист – ментол [10]. 3D-структуру ментола брали на сервере PubChem [11]. При модификации ментола удаляли гидроксигруппу в мета-положении и добавляли две новые гидроксигруппы в орто-положении (рис. 1), предполагая, что модифицированное производное ментола может вести себя как антагонист TRPM8.

Модификация лиганда выполнялась с использованием специальной программы для компьютерного мо-

делирования PyMol [12], инструментарий которой позволяет проводить изменения структуры любого химического соединения. Для выявления особенностей стыковки ментола и его модифицированного производного в молекулярном кармане TRPM8 использовали сервис виртуальной молекулярной лаборатории Galaxy7TM [9], позволяющий с помощью методов гибкого межмолекулярного докинга определить, с какими аминокислотными остатками взаимодействует лиганд. В настройках гибкого докинга был указан молекулярный карман (аминокислотная последовательность полипептидной цепи TRPM8 с тирозина 745 (Y745) по аргинин 842 (R842), в котором происходила стыковка.

### Результаты исследования и их обсуждение

На рисунке 2 представлена оптимизированная 3D-модель мономера TRPM8. Ментол взаимодействует с рецептором через молекулярный карман, в состав которого входят Y745 и R842. При образовании комплекса возникает водородная связь между гидроксигруппой ментола в мета-положении и остатком Y745 [10]. По-видимому, метильные радикалы ментола в данном молекулярном кармане играют роль стабилизаторов, отталкиваясь от других аминокислотных остатков и позволяя гидроксигруппе лиганда образовывать водородную связь с гидроксигруппой тирозина [10]. Проведенная стыковка рецептора и ментола показала характерные для него свойства агониста, а именно, образование водородных связей между гидроксигруппой в мета-положении и аминокислотным остатком Y745 в нескольких возможных конформациях (рис. 3).

Межмолекулярный докинг между рецептором и модифицированным производным ментола также выявил образование комплекса в данном молекулярном кармане, но в образовании комплекса участвовал не Y745, а другие аминокислотные остатки (рис. 4). Из-за симметричного расположения гидроксигрупп в орто-положениях модифицированной молекулы, лиганд вынужден образовывать связи с близлежащими аминокислотными остатками (аспарагиновой кислотой 802, фенилаланином 839 либо R842), игнорируя Y745. Благодаря образованию водородных связей с указанными аминокислотными остатками, лиганд перекрывает доступ к Y745, главной аминокислоте в активном центре, отвечающей за работу ионного канала, и ведет себя скорее как антагонист – конкурентный ингибитор природного лиганда (ментола). Поскольку энергия связи у модифицированного лиганда с рецептором выше, чем у ментола [6] можно заключить, что модифицированный лиганд будет связываться с рецептором эффективней природного и препятствовать действию ментола в качестве агониста TRPM8.

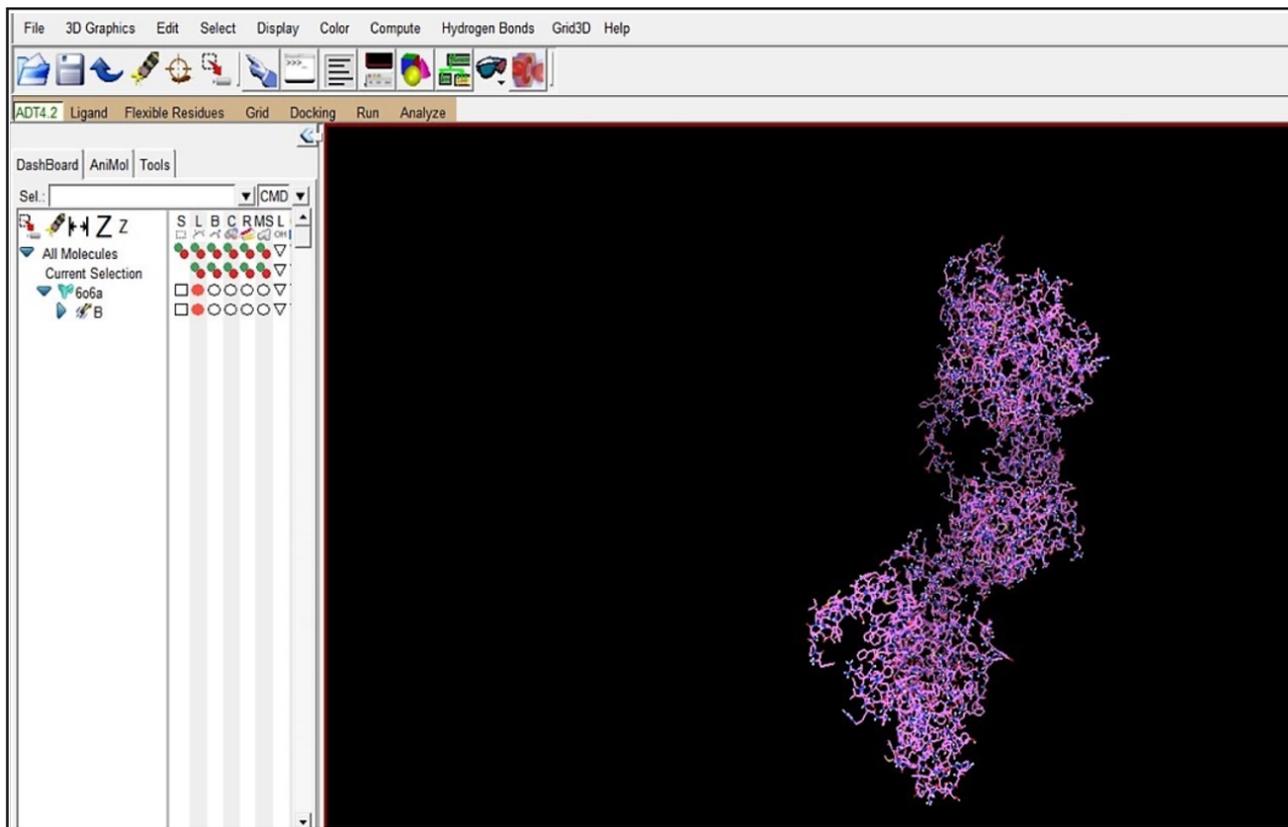


Рис. 2. 3D-структура мономера TRPM8.

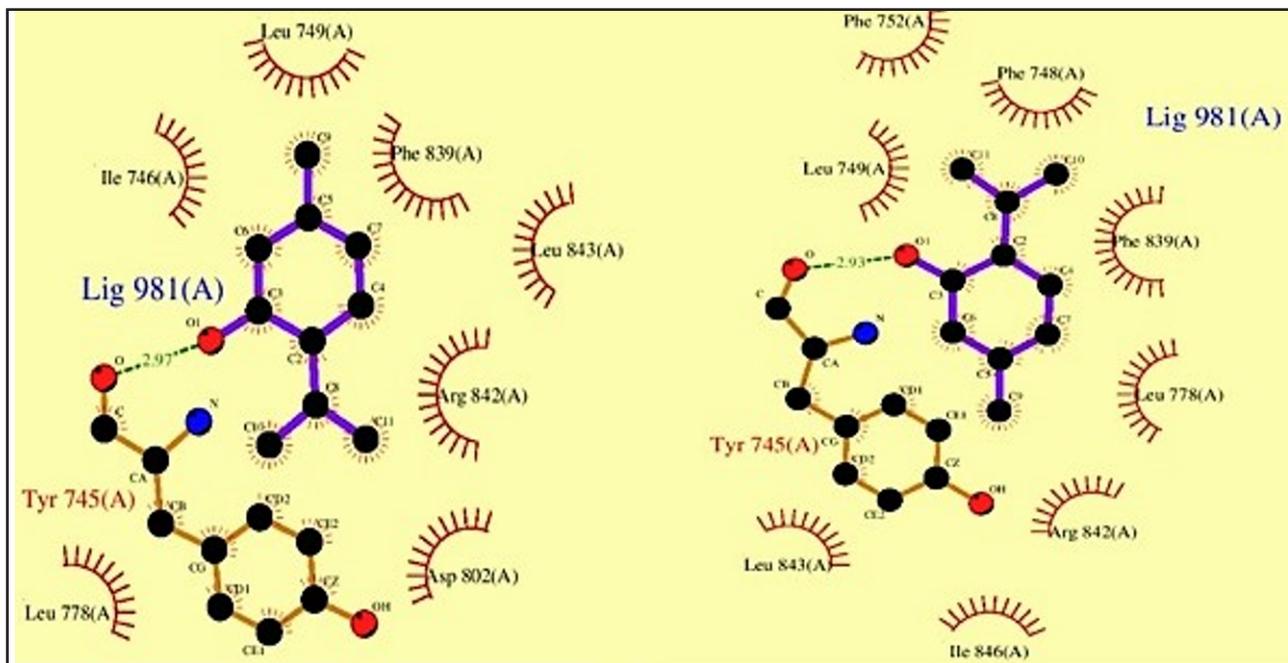


Рис. 3. Схематичное изображение возможных конформаций комплекса ментола и TRPM8 в его молекулярном кармане. Зеленым пунктиром обозначены водородные связи между гидрокси-группой ментола и остатком Y745.

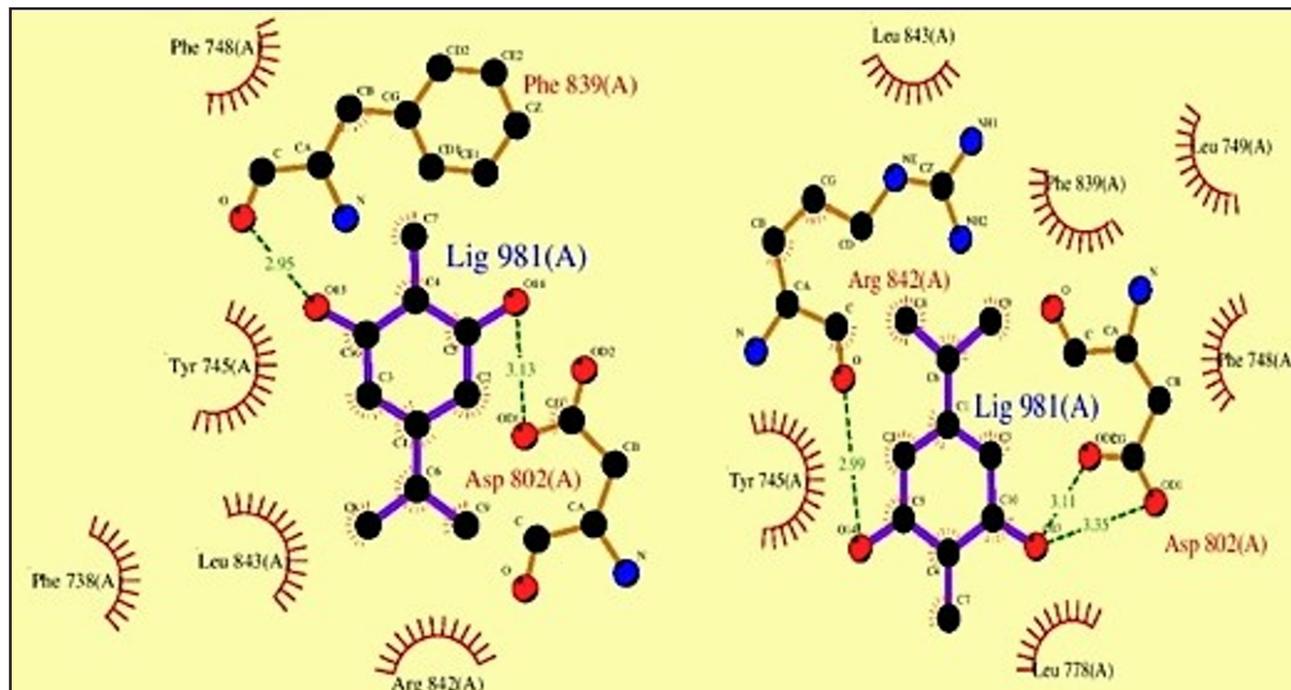


Рис. 4. Схематичное изображение возможных конформаций комплексов модифицированного ментола и TRPM8. Зеленым пунктиром указаны водородные связи между гидрокси-группами лиганда и аминокислотных остатков, находящихся вблизи тирозина Y745.

### Заключение

В ходе проведенного исследования методами *in silico* удалось модифицировать 3D-структуру ментола и получить лиганд, связывающийся с TRPM8 иначе, чем природный. Модифицированный лиганд не связывается с ключевой аминокислотой активного центра TRPM8 Y745 и в силу этого должен проявлять свойства антагониста. Полученные нами результаты, конечно, основаны на поведении лишь виртуально созданной модели и требуют экспериментального подтверждения *in vitro* и *in vivo*. Тем не менее предлагаемый нами подход может быть использован в более широком плане

для разделения лигандов белков на агонисты и антагонисты.

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Источники финансирования

Исследование проводилось без участия спонсоров

### Funding Sources

This study was not sponsored

### ЛИТЕРАТУРА

1. Liu Y., Mikrani R., He Y., Faran Ashraf Baig M.M., Abbas M., Naveed M., Tang M., Zhang Q., Li C., Zhou X. TRPM8 channels: A review of distribution and clinical role // Eur. J. Pharmacol. 2020. Vol.882, Iss.5. Article number: 173312. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173312>
2. Naumov D., Gassan D., Kotova O., Afanaseva E., Sheludko E., Sugaylo I., Perelman J. Effect of TRPA1 and TRPM8 polymorphism on lung function in COPD // Eur. Respir. J. Suppl. 2020. Vol.56, Iss.S64. Article number: 1129. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2020.1129>
3. Naumov D., Gassan D., Kotova O., Sheludko E., Afanaseva E., Perelman J., Gorchakova Ya., Li Qi., Zhou X. Effects of systematic glycocorticoids on TRPM8 expression in asthma patients // Eur. Respir. J. Suppl. Vol.56, Iss.S64. Article number: 1122. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2020.1122>
4. Yu W., MacKerell A.D. Jr. Computer-Aided Drug Design Methods // Methods Mol. Biol. 2017. Vol.1520. P.85–106. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_5)
5. Бородин Е.А. Поиск потенциальных лигандов к TRPM8 с помощью компьютерного дизайна // Материалы XIV международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2020) / под общ. ред. В.П. Колосова. Благовещенск, 2020. С.12–15.
6. Бородин Е.А., Чупалов А.П., Тимкин П.Д., Тимофеев Э.А., Леусова Н.Ю. Подбор потенциальных лигандов к TRPM8 с помощью глубоких нейронных сетей и межмолекулярного докинга // Бюллетень физиологии и пато-

- логии дыхания. 2021. Вып.80. С.26–33. <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2021-80-26-33>
7. The Universal Protein Resource (UniProt). <https://www.uniprot.org/>
  8. SWISS-MODEL: fully automated protein structure homology-modelling server. <https://swissmodel.expasy.org/>
  9. GalaxyWEB. A web server for protein structure prediction, refinement, and related methods. <https://galaxy.seoklab.org/>
  10. Xu L., Han Y., Chen X., Aierken A., Wen H., Zheng W., Wang H., Lu X., Zhao Z., Ma C., Liang P., Yang W., Yang S., Yang F. Molecular mechanisms underlying menthol binding and activation of TRPM8 ion channel // *Nat. Commun.* 2020. Vol.11, Iss.1. Article number: 3790. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17582-x>
  11. PubChem open chemistry database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
  12. PyMOL by Schrödinger. <https://pymol.org/2/>

## REFERENCES

1. Liu Y., Mikrani R., He Y., Faran Ashraf Baig M.M., Abbas M., Naveed M., Tang M., Zhang Q., Li C., Zhou X. TRPM8 channels: A review of distribution and clinical role. *Eur. J. Pharmacol.* 2020; 882(5):173312. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173312>
2. Naumov D., Gassan D., Kotova O., Afanaseva E., Sheludko E., Sugaylo I., Perelman J. Effect of TRPA1 and TRPM8 polymorphism on lung function in COPD. *Eur. Respir. J. Suppl.* 2020; 56(S64):1129. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2020.1129>
3. Naumov D., Gassan D., Kotova O., Sheludko E., Afanaseva E., Perelman J., Gorchakova Ya., Li Qi., Zhou X. Effects of systematic glucocorticoids on TRPM8 expression in asthma patients. *Eur. Respir. J. Suppl.* 2020; 56(S64):1122. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2020.1122>
4. Yu W., MacKerell A.D. Jr. Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1520:85–106. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_5)
5. Borodin E.A. [Search for potential ligands for TRPM8 with the help of computer design. In: Proceedings of the XIV International Scientific Conference "System Analysis in Medicine"]. Blagoveshchensk; 2020: 12–15 (in Russian).
6. Borodin E.A., Chupalov A.P., Timkin P.D., Timofeev E.A., Leusova N.Yu. [Selection of potential ligands for TRPM8 using deep neural networks and intermolecular docking]. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2021; (80):26–33 (in Russian). <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2021-80-26-33>
7. The Universal Protein Resource (UniProt). <https://www.uniprot.org/>
8. SWISS-MODEL: fully automated protein structure homology-modelling server. <https://swissmodel.expasy.org/>
9. GalaxyWEB. A web server for protein structure prediction, refinement, and related methods. <https://galaxy.seoklab.org/>
10. Xu L., Han Y., Chen X., Aierken A., Wen H., Zheng W., Wang H., Lu X., Zhao Z., Ma C., Liang P., Yang W., Yang S., Yang F. Molecular mechanisms underlying menthol binding and activation of TRPM8 ion channel. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):3790. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17582-x>
11. PubChem open chemistry database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
12. PyMOL by Schrödinger. <https://pymol.org/2/>

---

### Информация об авторах:

**Павел Дмитриевич Тимкин** студент 6 курса педиатрического факультета, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; e-mail: [timkin.pasha@mail.ru](mailto:timkin.pasha@mail.ru)

**Эдуард Андреевич Тимофеев**, студент 3 курса лечебного факультета, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; e-mail: [eduardo22042000@mail.ru](mailto:eduardo22042000@mail.ru)

**Евгений Александрович Бородин**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой химии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; e-mail: [borodin54@mail.ru](mailto:borodin54@mail.ru)

### Author information:

**Pavel D. Timkin**, 6<sup>th</sup> year student, Faculty of Pediatrics, Amur State Medical Academy; e-mail: [timkin.pasha@mail.ru](mailto:timkin.pasha@mail.ru)

**Eduard A. Timofeev**, 3<sup>rd</sup> year student, Faculty of General Medicine, Amur State Medical Academy; e-mail: [eduardo22042000@mail.ru](mailto:eduardo22042000@mail.ru)

**Evgeny A. Borodin**, MD, PhD, DSc (Med.), Professor, Head of Department of Chemistry, Amur State Medical Academy; e-mail: [borodin54@mail.ru](mailto:borodin54@mail.ru)