

Rola wiązania halogenowego w oddziaływaniu halogenowanych ligandów z kinazami białkowymi

Jarosław Poznański

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
e-mail: jarek@ibb.waw.pl

Słowa kluczowe: wiązanie ligandów, inhibitory kinaz białkowych, wiązanie halogenowe, wiązanie wodorowe, globalna analiza struktur kompleksów białkowych

Skrócony tytuł: Wiązanie halogenowe

Streszczenie

W artykule zostały pokrótce opisane główne kierunki badań aktualnie prowadzonych w przeciagu ostatnich 15 lat we współpracy z profesorem Davidem Shugarem. Omawiane prace mają na celu określenie wkładu termodynamicznego wiązań halogenowych do oddziaływania białek z halogenowanymi ligandami.

Wprowadzenie

Systemy potranslacyjnych modyfikacji białek (ang. *post-translational modifications*, PTMs) występują powszechnie u większości żywych organizmów. W chwili obecnej znanych jest kilkadziesiąt różnych typów kowalencyjnych modyfikacji białek. Niektóre z nich, są nieodwracalnymi modyfikacjami niezbędnymi do uzyskania przez łańcuch polipeptydowy natywnej struktury, a więc często następują równolegle do procesu syntezy łańcucha polipeptydowego przez rybosom. Przykładem może być hydroksylacja proliny w prokolagenie [1], która jest najczęściej spotykaną modyfikacją potranslacyjną w ludzkim proteomie [2]. W komórkach eukariotycznych końcowym etapem „życia” białka jest przyłączenie ubikwityny, co stanowi sygnał kierujący tak naznaczone białko na ścieżkę degradacji w proteosomach [3]. Z kolei przyłączenie długich łańcuchów hydrofobowych kwasów tłuszczowych (np. mirystylacja, palmitylacja, prenylacja) umożliwia zakotwiczenie białka w błonie cytoplazmatycznej, a więc decyduje o jego lokalizacji komórkowej.

Odrębną grupę stanowią modyfikacje odwracalne, których czasowe wprowadzenie może zmienić aktywność białka, między innymi wpływając na jego specyficzność substratową. Modyfikacje takie bardzo znacznie zwiększają różnorodność białek w komórce, obecnie uważa się że wielkość proteomu (tzn. ilość różnych form białek) wielokrotnie przekracza wielkość transkryptomu (ilość sekwencji RNA kodujących białka), który z kolei, ze względu na alternatywny splicing, kilkakrotnie przekracza wielkość genomu. Modyfikacje potranslacyjne białek umożliwiają szybką adaptację komórki do zmieniających się warunków zewnętrznych. Co więcej, jest to proces bardzo efektywny, gdyż zmiana właściwości danego białka, np. preferencji w oddziaływaniu z innymi partnerami, nie wymaga uruchomienia procesów transkrypcji i translacji, a jedynie wprowadzenia stosunkowo mało kosztownej energetycznie modyfikacji.

Jednym z lepiej poznanych procesów są acetylacja i metylacja białek histonowych, która zmienia ich powinowactwo do DNA, wpływając w ten sposób na ich lokalizację w chromatynie. W ten sposób, nie tylko steruje procesem transkrypcji, ale także jest związana z procesami rozwoju embrionalnego czy zapamiętywania [4]. Z kolei S-nitrozylacja białek z rodziny S100 sprzęga dwa wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe: redoksowy i zależny od wapnia [5].

Jednak chyba najlepiej poznanym procesem przekazywania sygnałów wewnątrz komórki jest odwracalna fosforylacja. Jest to reakcja prowadzona przez wyspecjalizowane enzymy zwane kinazami białkowymi. Niektóre wykazują bardzo wąskie spektrum substratowe, fosforyzując pojedyncze białka, dla innych udało się zidentyfikować bardzo wiele substratów (np. dla kinazy CK2 jest ich ponad 200). Ponieważ aktywność wielu kinaz jest związana ze stanem ich fosforylacji, w komórce występują skomplikowane sieci szlaków sygnałowych polegających na kaskadowej aktywacji kolejnych kinaz (np. szlak kinazy MAP [6]).

Inhibitory kinaz białkowych

Obecnie dostępne techniki proteomiczne (głównie spektrometria mas sprzężona z wysokowydajną chromatografią cieczową LS-MS, oraz jej tandemowe rozwinięcie MS/MS) umożliwiają jednoczesne monitorowanie (oraz identyfikację w wersji MS/MS) zmian poziomu

fosforylacji dla tysięcy białek, co pozwala na globalną analizę zmian w profilu fosforylacji całego proteomu spowodowaną przez różne czynniki zewnętrzne lub stany patologiczne [7].

W wielu niezależnych badaniach wykazano, że obecność różnych stanów patologicznych można bezpośrednio powiązać z nietypowymi poziomami fosforylacji konkretnych białek, przy czym często okazuje się, że obserwowane różnice wynikają z zaburzenia aktywności konkretnej kinazy białkowej [8-10]. Stąd też ta właśnie grupa enzymów jest bardzo popularnym celem molekularnym tzw. terapii celowanych [11], a poszukiwane są specyficzne inhibitory aktywne jedynie wobec wybranych kinaz [12-15]. W chwili obecnej najbardziej obiecującą grupę inhibitorów kinaz białkowych stanowią związki niskocząsteczkowe oddziałujące z enzymem w miejscu wiązania cząsteczki ATP [16, 17], a więc działające na zasadzie inhibicji kompetencyjnej. Jednakże, ze względu na uniwersalny mechanizm działania wszystkich kinaz, polegający na przeniesieniu grupy fosforanowej z cząsteczki ATP na docelowe białko, niezwykle trudno jest uzyskać odpowiednią selektywność. Z tego powodu poszukuje się większych cząsteczek, które mogą oddziaływać z docelową kinazą białkową nie tylko w miejscu wiązania ATP, ale także z jej innymi obszarami. Przykładem takich związków są inhibitory bi-substratowe, które wiążą się jednocześnie w miejscu wiązania ATP oraz w obszarze odpowiedzialnym za rozpoznanie i związanie fosforylowanego białka [18-21]. Jednakże większość z dotychczas znalezionych inhibitorów lokalizuje się, przynajmniej częściowo, w miejscu wiązania ATP. Cząsteczki takie muszą więc przypominać swoimi właściwościami fizycznymi cząsteczkę ATP - powinny być płaskimi aromatycznymi układami zdolnymi do utworzenia sieci wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych analogicznych do tych, które występują w przypadku wiązania ATP.

Klasyfikacja oddziaływań międzycząsteczkowych występujących w układach białko-ligand

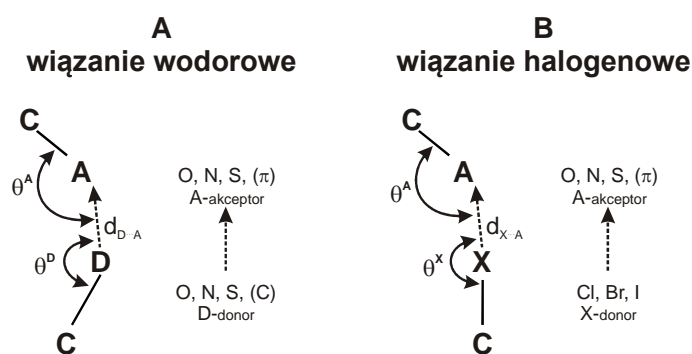
Zgodnie z teorią zamka i klucza (ang. *Lock-and-Key*), zaproponowaną w 1894 roku przez Emila Fishera oraz jej późniejszym uogólnieniem (*Induced-Fit Theory*) [22], niskocząsteczkowy ligand musi być przestrzennie dopasowany do miejsca w którym ma się związać z białkiem. Jest to prosta mechanicystyczna analogia zakazu Pauliego stosowanego w zakresie mechaniki kwantowej, którą z dobrym przybliżeniem można ilościowo opisać za pomocą tzw. **oddziaływań van der Waalsa** (vdW) (*van der Waals, 1873, Over de Continuïteit van den Gas- en Vloeïstoofstand, PhD thesis*). Właśnie ten typ krótkozasięgowych oddziaływań jest używany obecnie jako miara dopasowania kształtu liganda do odpowiadającego mu miejsca wiążącego w białku [23]. Kolejny typ oddziaływań - **oddziaływania elektrostatyczne**, opisuje wzajemny wpływ gęstości elektronowych zlokalizowanych odpowiednio na ligandzie oraz na białku. Są one zdominowane przez bezpośrednie oddziaływanie naładowanych grup funkcyjnych (np. łańcuchów bocznych zasadowych aminokwasów Lys/Arg ze zdysocjowaną grupą karboksylową liganda). Są to tak zwane mostki solne, a ich wkład energetyczny do oddziaływania białka z ligandem może sięgać 10 kcal/mol [24]. Kolejne przybliżenia, takie jak rozwinięcia multipolowe (oddziaływania ładunek-dipol, dipol-dipol) [25], uwzględnienie efektu polaryzacji gęstości elektronowej (siły Debye'a i Londona) czy efekty korelacji elektronów (oddziaływania π - π np. *stacking*) pozwalają na coraz precyzyjniejszy opis oddziaływań międzycząsteczkowych. Coraz dokładniejsze są także modele opisujące oddziaływanie z wodnym rozpuszczalnikiem (hydratacja), np. niedawno zaproponowany model LCW [26].

Interesujące jest, że wraz z powiększającą się liczbą danych strukturalnych, zarówno dla związków niskocząsteczkowych (CCDC - Cambridge Crystallographic Data Centre) [27], jak i układów biologicznych (PDB, Protein Data Bank) [28] sukcesywnie identyfikowano nowe typy oddziaływań. W bazie CCDC można więc znaleźć liczne przykłady oddziaływań kationów z pierścieniami aromatycznymi (ang. π -*cation*), a obok powszechnie występujących w

strukturach białek oddziaływań wodorowych (**H-bond**, np. NH...O, OH...N) znaleziono przykłady wiązań nietypowych, w których donorem wiązania wodorowego może być na przykład proton z grupy CH [29], zaś akceptorem π -elektrony pierścienia aromatycznego [30].

Wiązanie halogenowe – nowy typ oddziaływań

I gdy już się wydawało, że dysponujemy w miarę pełnym opisem wszystkich możliwych oddziaływań międzycząsteczkowych, został zidentyfikowany ich nowy typ – wiązanie halogenowe (**X-bond**). W ogólności, pod względem topologii i geometrii, wiązanie halogenowe jest niemal zupełnym analogiem wiązania wodorowego. W obu przypadkach akceptorem niekowalencyjnego wiązania jest donor gęstości elektronowej, którym najczęściej jest wolna para elektronowa lub π -elektrony pierścienia aromatycznego. O ile jednak donorem wiązania wodorowego, a więc akceptorem gęstości elektronowej, jest atom wodoru przyłączony do elektroujemnego atomu (zwykle jest to grupa OH lub NH), to paradoksalnie, donorem wiązania halogenowego, a więc akceptorem gęstości elektronowej jest elektroujemny atom halogenu (Rycina 1). Efekt ten, zwany σ -hole, jest związany ze znaczną asymetrią rozkładu gęstości elektronowej na atomie halogenu, przy czym na osi wiązania chemicznego występuje jej wyraźny deficyt [31].



Rycina 1. Analogia strukturalna występująca między wiązaniem wodorowym (A) a wiązaniem halogenowym (B)

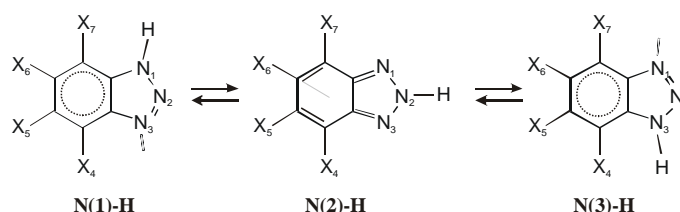
Co prawda, obecność kompleksu 1:1 między cząsteczkami I_2 i NH_3 została potwierdzona już w roku 1863 [32] (dziś już wiemy, że jest on tworzony poprzez wiązanie halogenowe), to w kryształach wiązanie takie zostało po raz pierwszy zidentyfikowane dopiero po niemal 100 latach [33] (oraz szerszy przegląd w pracy [34]), a po kolejnych 50 wykazano obecność wiązań halogenowych w kompleksach białkowych [35]. I o ile w chwili obecnej nie ma najmniejszych wątpliwości co do samego faktu istnienia wiązań halogenowych [35-37], to występują bardzo duże kontrowersje dotyczące oceny wkładu takich wiązań do energii swobodnej oddziaływań międzycząsteczkowych, a wkład pojedynczego wiązania halogenowego jest szacowany w szerokim zakresie od 0.2 [38] aż do 7 kcal/mol [39]. W przypadku związków niskocząsteczkowych do oszacowania górnego progu wkładu termodynamicznego pojedynczego wiązania halogenowego mogą z pewnością posłużyć pomiary oddziaływania trifluorohalometanu, (CF_3X , $X=Cl, Br, I$) z trimetyloaminą ($N(CH_3)_3$) w idealnie niepolarnym środowisku ciekłych gazów szlachetnych. W ten sposób energia wiązania halogenowego dla chloru, bromu i jodu została oszacowana odpowiednio na 2.1, 4.4 i 6.8 kcal/mol [40]. Należy jednak zaznaczyć, że ze względu na znaczną hydrofobowość atomów halogenu, niezwykle trudno jest zmierzyć wkład wiązania halogenowego do tworzenia kompleksów w roztworach wodnych, także za pomocą powszechnie stosowanej metody opierającej się na porównaniu oddziaływania z halogenowanym związkiem oraz z jego niepodstawionym analogiem. Co więcej, wprowadzenie silnie elektroujemnego atomu halogenu do cząsteczki może znacząco zmienić rozkład gęstości elektronowej, a więc także wpłynąć na jej formę jonową czy lokalizację wymieniających protonów (równowaga tautomeryczna i protomeryczna). Nie ma więc żadnej pewności, że zmierzona różnicę w oddziaływaniach międzycząsteczkowych (np.

zmianę stałej wiązania) można w całości przypisać obecności wiązania halogenowego. A problem dokładnego termodynamicznego opisu wiązania halogenowego jest niezwykle istotny, gdyż niemal połowa ze związków chemicznych zawartych w komercyjnych bibliotekach umożliwiających wielkoskalowe badania przesiewowe (http://iccb.med.harvard.edu/screening/compound_libraries) oraz ponad 20% ligandów obecnych w bazie PDB jest halogenowana. Atom halogenu jest także obecny w coraz większej liczbie leków, czy w testowanych aktualnie inhibitorach białkowych, a rola wiązań halogenowych w układach biologicznych doczekała się w przeciągu ostatnich 10 lat znaczącej literatury [35-39, 41-45].

Wpływ atomu halogenu na właściwości fizyko-chemiczne związków niskocząsteczkowych

W połowie lat 90. XX wieku prof. David Shugar rozpoczął intensywne prace nad inhibitorami kinaz białkowych. Początkowo, głównym zagadnieniem badawczym była synteza nowych inhibitorów oraz biochemiczna analiza ich aktywności. W tym właśnie okresie udało się wykazać, że 4,5,6,7-tertabromobenzotriazol jest selektywnym inhibitorem kinazy CK2 [46]. Problemom związanym z aktywnością katalityczną kinaz białkowych jest poświęcona cykliczna międzynarodowa konferencja organizowana przez prof. Davida Shugara nieprzerwanie od 1998 [47-54], a sama problematyka poszukiwania inhibitorów kinaz białkowych została szerzej omówiona w artykule Marii Bretner.

W międzyczasie okazało się, że halogenowane pochodne benzotriazolu (**Bt**) wykazują bardzo nietypowe właściwości fizyczne. Tak dla przykładu, dla serii benzotriazoli podstawionych symetrycznie na pierścieniu benzenowym (Rycina 2) wykazano obecność równowagi protomerycznej, łamiącej dynamiczną symetrię cząsteczki (równowagi protonacyjne zostały szerzej omówione w artykule Borysa Kierdaszuka). W bezwodnym DMSO kinetyka przemian okazała się na tyle wolna, że analiza kształtu linii w zarejestrowanych widmach ^{13}C NMR umożliwiła wyznaczenie szybkości przeskoku protonu między dwoma chemicznie równoważnymi atomami azotu [55]. Występowanie równowagi protomerycznej zostało nieco później potwierdzone również dla serii asymetrycznie podstawionych benzotriazoli przez Romualdę Wąsik, jak dotąd ostatnią doktorantkę Davida Shugara [56].

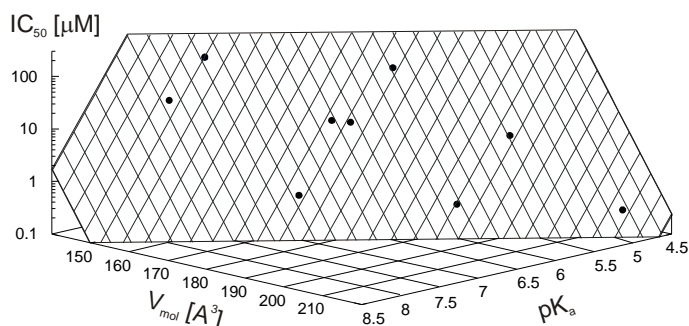


Rycina 2. Struktura modyfikowanych benzotriazoli oraz obserwowana równowaga protomeryczna

Sposób podstawienia pierścienia benzenowego, a więc zarówno charakter podstawników, jak i ich lokalizacja wpływa także na wartość pK_a dysocjacji protonu triazolowego - zgodnie z oczekiwaniami elektroujemne podstawniki faworyzują formę anionową cząsteczki. Najciekawsze wyniki zostały jednak otrzymane poprzez analizę aktywności inhibitorowej w stosunku do kinazy CK2, przeprowadzoną metodą QSAR (*quantitative structure-activity relationship*) dla dużej serii zbliżonych strukturalnie benzotriazoli. Okazało się bowiem, że aktywność związku można z dobrym przybliżeniem przewidzieć w oparciu o takie podstawowe parametry fizyko-chemiczne jak hydrofobowość, pK_a dysocjacji protonu triazolowego oraz energia stabilizacji konkretnej formy protomerycznej. Oznacza to, że przynajmniej w odniesieniu do kinazy CK2, oddziaływanie z halogenowanymi ligandami jest zdominowane przez równowagę oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych, a ewentualny wkład wiązań halogenowych można było uznać za pomijalny [56].

Wpływ atomu halogenu na oddziaływanie białka z halogenowanym ligandem

Dla dokładniejszej eksploracji roli wiązań halogenowych w oddziaływaniu halogenowanych ligandów z białkami została zaprojektowana i zsyntetyzowana seria dziewięciu bromowanych pochodnych benzotriazolu reprezentujących wszystkie możliwe sposoby podstawienia atomów bromu na pierścieniu benzenowym (Rycina 2). Mimo bardzo zbliżonej budowy, związki te znacznie różniły się właściwościami w warunkach roztworu wodnego (rozpuszczalność graniczna, pK_a dysocjacji protonu triazolowego), a w testach biochemicznych wykazywały istotne różnice w hamowaniu aktywności CK2 [57]. Co więcej, związki niosące identyczną liczbę atomów bromu mogą mieć skrajnie różne właściwości. I tak 5,6-dibromo-Bt (dwa atomy bromu) ma aktywność zbliżoną do TBBt (cztery atomy bromu), podczas gdy 4,5-dibromo-Bt jest praktycznie nieaktywny. Dokładniejsza analiza właściwości inhibitorowych wobec kinazy CK2 dla całej serii związków [58] wykazała, że ich aktywność wynika bezpośrednio z objętości cząsteczki (która zgodnie z teorią LCW [26] jest miarą siły oddziaływania z wodnym rozpuszczalnikiem) oraz wartości pK_a dla dysocjacji protonu triazolowego, (co z kolei jest miarą oddziaływań elektrostatycznych zarówno w roztworze, jak i w kompleksie). Tak więc udało się jednoznacznie wykazać, że przynajmniej w przypadku kinazy CK2, siła wiązania aromatycznych halogenowanych ligandów jest rzeczywiście zdominowane przez balans oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych.



Rycina 3. Zależność QSAR otrzymana dla wartości IC_{50} wyznaczonej dla serii 9 halogenowanych benzotriazoli na podstawie ich wyliczonej *in silico* objętości (V_{mol}) oraz zmierzonej wartości pK_a , które to wielkości odpowiadają są miarą odpowiednio oddziaływań hydrofobowych oraz elektrostatycznych.

Ponieważ przedstawione powyżej analizy pozwoliły jedynie na półilościowe oszacowanie wkładu wiązania halogenowego do oddziaływania między ligandem a białkiem, dalsze badania musiały zostać uzupełnione o *stricto* termodynamiczne pomiary wiązania ligandów przez kinazę CK2. W tym celu użyto czterech komplementarnych technik eksperymentalnych: różnicowej fluorymetrii skaningowej (DSF), różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), izotermicznej kalorymetrii miareczkującej (ITC) oraz termoforezy mikroskalowej (MST). Obie metody kalorymetryczne (ITC oraz DSC) pozwoliły na wyznaczenie zarówno stałych dysocjacji kompleksów, jak i entalpii ich tworzenia, podczas gdy metody optyczne (DSF oraz MST) umożliwiły jedynie wyznaczenie stałych dysocjacji (ale do przeprowadzenia takich eksperymentów wymagana jest znacznie mniejsza ilość materiału). Z drugiej strony metody izotermiczne (ITC, MST) pozwalają na wyznaczenie odpowiednich parametrów w zadanej temperaturze, podczas gdy dla metod skaningowych (DSC, DSF) niezbędna jest ekstrapolacja otrzymanych wyników do warunków normalnych. Termodynamiczne pomiary oddziaływania ligandów z różnymi mutantami kinazy CK2 są nadal wykonywane, ale już wstępne wyniki jednoznacznie potwierdziły obserwowane wcześniej prawidłowości [59, 60]. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych przez nas analiz wkład energetyczny pojedynczego wiązania halogenowego do oddziaływania między białkiem a ligandem można oszacować na nie więcej niż 2 kcal/mol [60].

Wiązanie halogenowe między ligandem a białkiem w bazie strukturalnej PDB

Niezwykle interesujących wyników dostarczyła analiza struktur kompleksów białkowych z halogenowanymi ligandami. W przypadku ligandów kinaz białkowych, które znajdują się w miejscu wiązania ATP, okazało się, że ich lokalizacja może być bardzo różnorodna. I tak na przykład orientacja TBBt związanego przez kinazę CK2 jest zupełnie inna niż w kompleksie z kinazą CDK2. Co więcej, nawet w kompleksie z CK2 dwie cząsteczki białka występujące w komórce elementarnej kryształu przybierają różne konformacje, z których tylko jedna tworzy wiązanie halogenowe z ligandem. Podobnie ligandy o bardzo zbliżonej budowie mogą przyjąć zupełnie odmienne orientacje w kompleksie z tym samym białkiem, bądź nawet występują alternatywne orientacje tego samego liganda. Wszystko to świadczy o tym, że nawet niewielkie zmiany w oddziaływaniu elektrostatycznym między ligandem a białkiem, które mogą być spowodowane zarówno przez odmienną sekwencję aminokwasową białka, jak i przez subtelne różnice w strukturze elektronowej liganda, dominują nad preferencją do tworzenia wiązań halogenowych. Co ciekawe, przynajmniej w przypadku kinaz białkowych, to właśnie lokalizacja wiązań halogenowych jest zachowana, podczas gdy orientacja liganda w obszarze miejsca wiążącego może być znacznie zróżnicowana, i tylko niektóre z ligandów zajmują miejsce umożliwiające bliski kontakt między atomem halogenu a potencjalnym akceptorem wiązania halogenowego [61].

Wiele ligandów tworzy w kompleksach wiązania wodorowe z białkiem. I tu nasuwa się pytanie, czy wiązania wodorowe utworzone przez białko z halogenowanymi ligandami nie różnią się od analogicznych wiązań z ligandami, które nie są halogenowane. Ścisła odpowiedź na to pytanie jest praktycznie niemożliwa, ale została przeprowadzona statystyczna analiza rozkładów długości międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Okazało się, że dla niektórych typów wiązań wodorowych różnią się one w sposób istotny statystycznie, przy czym największy efekt został zaobserwowany dla ligandów, w których donorem wiązania wodorowego jest atom azotu znajdujący się w odległości 3-4 wiązań chemicznych od atomu halogenu [62]. Efekt ten jest niezwykle istotny, gdyż może tłumaczyć znaczące rozbieżności w oszacowanych dotychczas wartościach energii wiązania halogenowego w układach biologicznych.

Obecnie, wspólnie z laboratorium prof. Matthiasa Böhtlera, są prowadzone prace zmierzające do wyznaczenia struktur krystalograficznych dla wszystkich badanych kompleksów. Pozwoli to w bliskiej przyszłości jednoznacznie powiązać wyznaczone już zmiany wartości parametrów termodynamicznych z konkretnymi typami oddziaływań międzycząsteczkowych towarzyszących utworzeniu kompleksu białko-ligand.

Literatura

- [1] Hutton JJ, Trappel AL, Udenfriend S (1966) Requirements for alpha-ketoglutarate, ferrous ion and ascorbate by collagen proline hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 24:179-84.
- [2] Gorres KL, Raines RT (2010) Prolyl 4-hydroxylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45:106-24.
- [3] Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* 82:373-428.
- [4] Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705.
- [5] Zivkovic ML, Zareba-Kozioł M, Zhukova L, Poznanski J, Zhukov I, Wyslouch-Cieszynska A (2012) Post-translational S-Nitrosylation Is an Endogenous Factor Fine Tuning the Properties of Human S100A1 Protein. *J Biol Chem* 287:40457-70.
- [6] Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 22:153-83.

- [7] Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*.127:635-48.
- [8] Tawfic S, Yu S, Wang H, Faust R, Davis A, Ahmed K (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol* 16:573-82.
- [9] Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471-84.
- [10] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta -Molecular Cell Research* 1773:1263-84.
- [11] Cohen P (2002) Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1:309-15.
- [12] Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95-105.
- [13] Fabian MA, Biggs WH, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, et al (2005) A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature Biotechnology* 23:329-36.
- [14] Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, et al (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochemical Journal* 408:297-315.
- [15] Cozza G, Pinna LA, Moro S. Kinase CK2 Inhibition: An Update (2013) *Curr Med Chem* 2013;20:671-93.
- [16] Fabbro D (2015) 25 Years of Small Molecular Weight Kinase Inhibitors: Potentials and Limitations. *Mol Pharmacol* 87:766-75.
- [17] Zhang JM, Yang PL, Gray NS (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9:28-39.
- [18] Parang K, Cole PA (2002) Designing bisubstrate analog inhibitors for protein kinases. *Pharmacol Ther* 93:145-57.
- [19] Fischer PM (2004) The design of drug candidate molecules as selective inhibitors of therapeutically relevant protein kinases. *Curr Med Chem* 11:1563-83.
- [20] Gower CM, Chang MEK, Maly DJ (2014) Bivalent inhibitors of protein kinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49:102-15.
- [21] Parang K, Till JH, Ablooglu AJ, Kohanski RA, Hubbard SR, Cole PA (2001) Mechanism-based design of a protein kinase inhibitor. *Nat Struct Biol* 8:37-41.
- [22] Koshland DE (1994) The key-lock theory and the induced fit theory. *Angew Chem Int Ed* 33:2375-8.
- [23] Barratt E, Bingham RJ, Warner DJ, Laughton CA, Phillips SEV, Homans SW (2005) Van der waals interactions dominate ligand-protein association in a protein binding site occluded from solvent water. *J Am Chem Soc* 127:11827-34.
- [24] Hendsch ZS, Tidor B (1994) Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis. *Protein Sci* 3:211-26.
- [25] Sokalski WA, Poirier RA (1983) Cumulative atomic multipole representation of the molecular charge-distribution and its basis set dependence. *Chemical Physics Letters* 98:86-92.
- [26] Lum K, Chandler D, Weeks JD (1999) Hydrophobicity at small and large length scales. *Journal of Physical Chemistry B* 103:4570-7.
- [27] Cambridge Crystallographic Data Centre; <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.
- [28] Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org>.
- [29] Desiraju GR (1991) The C-H...O hydrogen-bond in crystals - what it is. *Accounts of Chemical Research* 24:290-6.
- [30] Steiner T, Koellner G (2001) Hydrogen bonds with π -acceptors in proteins: Frequencies and role in stabilizing local 3D structures. *J Mol Biol* 305:535-57.

- [31] Politzer P, Lane P, Concha MC, Ma Y, Murray JS (2007) An overview of halogen bonding. *J Molecular Modeling* 13:305-11.
- [32] Guthrie F (1863) XXVIII. On the Iodide of Iodammonium. *Journal of the Chemical Society* 16:239-44.
- [33] Hassel O, Hvoslef J (1954) The structure of bromine 1,4-dioxanate. *Acta Chemica Scandinavica* 8:873.
- [34] Metrangolo P, Meyer F, Pilati T, Resnati G, Terraneo G (2008) Halogen bonding in supramolecular chemistry. *Angew Chem Int Ed* 47:6114-27.
- [35] Auffinger P, Hays FA, Westhof E, Ho PS (2004) Halogen bonds in biological molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16789-94.
- [36] Voth AR, Ho PS (2007) The role of halogen bonding in inhibitor recognition and binding by protein kinases. *Curr Top Med Chem* 7:1336-48.
- [37] Rendine S, Pieraccini S, Forni A, Sironi M (2011) Halogen bonding in ligand-receptor systems in the framework of classical force fields. *Phys Chem Chem Phys* 13:19508-16.
- [38] Sarwar MG, Dragisic B, Salsberg LJ, Gouliaras C, Taylor MS (2007) Thermodynamics of Halogen Bonding in Solution: Substituent, Structural, and Solvent Effects. *J Am Chem Soc* 132:1646-53.
- [39] Voth AR, Hays FA, Ho PS (2007) Directing macromolecular conformation through halogen bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6188-93.
- [40] Hauchecorne D, van der Veken BJ, Moiana A, Herrebout WA (2010) The C-Cl...N halogen bond, the weaker relative of the C...I and C-Br...N halogen bonds, finally characterized in solution. *Chemical Physics* 374:30-6.
- [41] Parisini E, Metrangolo P, Pilati T, Resnati G, Terraneo G (2011) Halogen bonding in halocarbon-protein complexes: a structural survey. *Chem Soc Rev* 40:2267-78.
- [42] Voth AR, Khuu P, Oishi K, Ho PS (2009) Halogen bonds as orthogonal molecular interactions to hydrogen bonds. *Nat Chem* 1:74-9.
- [43] Scholfield MR, Vander Zanden CM, Carter M, Ho PS (2013) Halogen bonding (X-bonding): A biological perspective. *Protein Sci* 22:139-52.
- [44] Wilcken R, Zimmermann MO, Lange A, Joerger AC, Boeckler FM (2013) Principles and Applications of Halogen Bonding in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J Med Chem* 56:1363-88.
- [45] Persch E, Dumele O, Diederich F (2015) Molecular Recognition in Chemical and Biological Systems. *Angew Chem Int Ed* 54:3290-327.
- [46] Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, et al (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2. *Febs Letters* 496:44-8.
- [47] Shugar D (1999) Proceedings of the 1st International Conference on Inhibitors of Protein Kinases - Warsaw, Poland, September 15-20, 1998 - Preface. *Pharmacology & Therapeutics* 82:109-10.
- [48] Shugar D (2002) Proceedings of The Second International Conference on Inhibitors of Protein Kinases and Workshop on Computer-aided Drug Design. September 9-15, 2001. Warsaw, Poland. *Pharmacology & therapeutics* 93:77-78.
- [49] Shugar D (2003) IPK'2003; 3rd International Conference on Inhibitors of Protein Kinases, June 22-27, 2003 and Workshop on Phosphoryl-Transfer Mechanisms, June 27-29, 2003. Warsaw, Poland. *Cellular & molecular biology letters* 2003;8:503.
- [50] Shugar D (2005) IPK'2005; 4th International Conference on Inhibitors of Protein Kinases and associated workshop: modelling of specific molecular recognition processes. June 25-29, 2005. Warsaw Poland. *Biochim Biophys Acta* 1754:1-2.

- [51] Shugar D (2008) IPK'2007; 5th International Conference Inhibitors of Protein Kinases and workshop session on novel molecular design and simulation methods, Warsaw, Poland, June 23-27, 2007. *Biochim Biophys Acta* 1784:1-2.
- [52] Shugar D (2009) IPK'2009; 6th International Conference: Inhibitors of Protein Kinases, including Insights into Protein Kinases. June 27–July 1, 2009 Warsaw, Poland. *Acta Biochimica Polonica* 56:2-37.
- [53] Shugar D, Fabbro D (2013) IPK'2012; 7th International Conference on Inhibitors of Protein Kinases. August 24-27, 2012. Warsaw, Poland *Biochim Biophys Acta* 1834:1269-459.
- [54] Fabbro D, Poznański J, Shugar D (2015) IPK'2014 - Preface. *Biochim Biophys Acta - Proteins and Proteomics*; in press.
- [55] Poznanski J, Najda A, Bretner M, Shugar D (2007) Experimental (C-13 NMR) and theoretical (ab initio molecular orbital calculations) studies on the prototropic tautomerism of benzotriazole and some derivatives symmetrically substituted on the benzene ring. *J Phys Chem A* 111:6501-9.
- [56] Wasik R, Lebska M, Felczak K, Poznanski J, Shugar D (2010) Relative Role of Halogen Bonds and Hydrophobic Interactions in Inhibition of Human Protein Kinase CK2 alpha by Tetrabromobenzotriazole and Some C(5)-Substituted Analogues. *J Phys Chem B* 114:10601-11.
- [57] Wasik R, Winska P, Poznanski J, Shugar D (2012) Synthesis and Physico-Chemical Properties in Aqueous Medium of All Possible Isomeric Bromo Analogues of Benzo-1H-Triazole, Potential Inhibitors of Protein Kinases. *J Phys Chem B* 116:7259-68.
- [58] Wasik R, Winska P, Poznanski J, Shugar D (2012) Isomeric Mono-, Di-, and Tri-Bromobenzo-1H-Triazoles as Inhibitors of Human Protein Kinase CK2 alpha. *Plos One* 7:e48898.
- [59] Winiewska M, Makowska M, Maj P, Wielechowska M, Bretner M, Poznanski J, Shugar D (2015) Thermodynamic parameters for binding of some halogenated inhibitors of human protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;456:282-7.
- [60] Winiewska M, Kucińska K, Makowska M, Poznański J, Shugar D (2015) Thermodynamics parameters for binding of halogenated benzotriazole inhibitors of human protein kinase CK2 α . *Biochim Biophys Acta*; in press.
- [61] Poznanski J, Shugar D (2013) Halogen bonding at the ATP binding site of protein kinases: Preferred geometry and topology of ligand binding. *Biochim Biophys Acta -Proteins and Proteomics* 1834:1381-6.
- [62] Poznanski J, Poznanska A, Shugar D (2014) A Protein Data Bank Survey Reveals Shortening of Intermolecular Hydrogen Bonds in Ligand-Protein Complexes When a Halogenated Ligand Is an H-Bond Donor. *Plos One* 9:e99984.

Ryciny

Rycina 1. Analogia strukturalna występująca między wiązaniem wodorowym (A) a wiązaniem halogenowym (B)

Rycina 2. Struktura modyfikowanych benzotriazoli oraz obserwowana równowaga protomeryczna

Rycina 3. Zależność QSAR otrzymana dla wartości IC_{50} wyznaczonej dla serii 9 halogenowanych benzotriazoli na podstawie ich wyliczonej *in silico* objętości (V_{mol}) oraz zmierzonej wartości pK_a , które to wielkości odpowiadają są miarą odpowiednio oddziaływań hydrofobowych oraz elektrostatycznych.

Contribution of a halogen bond to binding of halogenated ligands by protein kinases

Jarosław Poznański

Institute of Biochemistry and Biophysics PAS,

Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Poland

e-mail: jarek@ibb.waw.pl

Keywords: ligand binding, protein kinase inhibitors, halogen bonding, hydrogen bonding, structural analysis of protein complexes

Summary

This article presents a brief overview of recent studies on the phenomena of halogen bonding, most of which have been done for the last 15 years in the collaboration with Prof. David Shugar. All these investigations concern reliable estimation of the thermodynamic contribution of a halogen bond to protein-ligand interactions.