

Ochratoxin A und B: Ein dreidimensionales molekulares Modell zur mechanistischen Erklärung ihrer Toxizität

Angelo Vedani¹ und Arend Bruinink²

¹ Biografik-Labor, Schweiz. Institut für Alternativen zu Tierversuchen (SIAT), CH-Basel

² Institut für Toxikologie der ETH und Universität Zürich, CH-Schwerzenbach ZH

Zusammenfassung

Ochratoxine sind Giftstoffe, die von *Aspergillus alutaceus* und anderen Schimmelpilzen produziert und freigesetzt werden. Bisher wurde allgemein angenommen, daß die Hemmung des Enzyms Phenylalanin-t-RNA-Synthetase für die Toxizität von Ochratoxin A verantwortlich war. Neueste *in vitro* Untersuchungen weisen aber auf eine nicht-kompetitive Kinetik bezüglich Phenylalanin und damit auf die Präsenz eines eigentlichen Ochratoxinrezeptors hin. Basierend auf den Strukturen von Ochratoxin A und B, Mellein und Phenylalanin haben wir mittels Pseudorezeptormodeling ein dreidimensionales molekulares Modell für die Bindungsstelle des vermuteten Ochratoxinrezeptors generiert. Das Modell besteht aus insgesamt zwölf Aminosäuren. Die hohe Affinität (und damit die rezeptor-gekoppelte Toxizität) von Ochratoxin A und B wird in diesem Modell durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk erklärt – ein Netzwerk, das weder mit Mellein noch mit Phenylalanin als Substrat möglich ist. Diese Substanzen rufen bei vergleichbaren Konzentrationen denn auch keine toxischen Effekte hervor. Die Relevanz des Modells wird durch die quantitative Voraussage der Bindungsaffinitäten von drei Testsubstanzen gestützt.

Summary: Ochratoxin A and B: A three-dimensional molecular model for a mechanistic explanation of their toxicity.

Ochratoxins are toxic substances produced and released by *Aspergillus alutaceus* and other molds. So far, it was generally believed that the inhibition of the enzyme phenylalanine-t-RNA-synthetase was responsible for the toxicity of ochratoxin A. Most recent *in vitro* results, however, suggest a non-competitive mechanism with respect to phenylalanine and, consequently, the existence of a proper ochratoxin receptor. Based on the structures ochratoxin A and B, mellein and phenylalanine, we have generated a three-dimensional molecular model for the binding site of a putative ochratoxin receptor by means of pseudoreceptor modeling. The model consists of twelve amino-acid residues. In this model, the high affinity (and, hence, the receptor-mediated toxicity) of ochratoxin A and B is explained by a hydrogen-bond network – a network that is not possible with both mellein and phenylalanine as substrates. Consequently, these compounds do not exhibit toxic effects at comparable concentrations. The relevance of the model is supported by the quantitative prediction of the binding affinity of three test compounds.

Keywords: pseudoreceptor modeling, 3D-QSAR, ochratoxin receptor surrogate, receptor-mediated toxicity.

1 Einleitung

Ochratoxin A und B (Abbildung 1a, 1b) sind Giftstoffe, die von *Aspergillus alutaceus* (früher: *Aspergillus ochraceus*) und anderen Schimmelpilzen produziert werden. Ochratoxin A (7-carboxyl-5-chloro-8-hydroxyl-3,4-dihydro-3R-methylisocumarin-7-L-β-phenylalanin) wurde als Lebensmittelverunreinigung nachgewiesen (Baumann und Zimmerli, 1988). Relativ hohe Konzentrationen

wurden in Blut und Brustmilch des Menschen gefunden (Hald, 1991; Breitholz-Emanuelsson et al., 1993). Bis heute wurden aber keine toxischen Effekte von Ochratoxin A im Menschen nachgewiesen. Aufgrund von *in vivo* Daten an Ratten und Mäusen wird jedoch vermutet, daß Ochratoxin A im Menschen nephrotoxische und teratogene Wirkungen hervorruft. Zielgewebe in der pränatalen Phase sind hauptsächlich Augen und Nervensystem (Shirai, 1991;

Miki et al., 1994). Der Wirkungsmechanismus von Ochratoxin A ist bis heute unbekannt; im allgemeinen wird aber angenommen, daß die Hemmung des Enzyms Phenylalanin-t-RNA-Synthetase für die Toxizität von Ochratoxin A verantwortlich ist (Creppy et al., 1983). Kürzlich wurde nachgewiesen (Studer et al., 1995), daß sich 3R-Ochratoxin A bei erhöhter Temperatur – wie sie beispielsweise beim Kochen oder Rösten von Nahrungsmitteln auftritt

– teilweise in das 3S-Epimer umwandelt. Weitere Untersuchungen zeigten, daß in menschlichem Serum nachgewiesenes Ochratoxin A teilweise in der 3S-Form vorliegt (Studer et al., eingesandt). Eine neueste *in vitro* Studie untersuchte das neurotoxische Potential von 3R- und 3S-Ochratoxin A sowie 3R-Ochratoxin B in drei verschiedenen Zellkulturen. Es zeigte sich, daß die mitochondrische und lysosomale Aktivität, aber auch der Kulturproteingehalt in vergleichbarer Weise durch diese Ochratoxine beeinflusst werden (Bruinink et al., eingesandt). Der geringe Unterschied zwischen den IC_{50} -Werten für Ochratoxin A und B sind nicht mit der Hemmung der Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (vgl. Creppy et al., 1983) als toxischem Mechanismus vereinbar. Die Vermutung wird auch dadurch gestützt, daß die Toxizität von Ochratoxin A durch Phenylalanin nicht verändert wird (nicht-kompetitive Kinetik; Bruinink und Sidler, in Vorbereitung). Diese Erkenntnis hat uns stimuliert, mittels computergestützten Methoden ein Modell für die Bindungsstelle des hypothetischen Ochratoxinrezeptors zu erstellen und an einem Testsatz von Substanzen zu prüfen.

„Computer-gestützte Verfahren zur rationalen Entwicklung neuer Wirkstoffe“ (CADD) erlauben die Simulation der Wechselwirkungen eines Wirkstoffes mit einem Rezeptor (oder einem Enzym) auf atomarer Ebene. Aus einer solchen Simulation läßt sich die Affinität der Wirksubstanz an den Rezeptor abschätzen (vgl. z.B. Ramsden, 1990; Vedani, 1994; Folkers 1995). In Abwesenheit einer Rezeptorstruktur erlaubt Pseudorezeptormodeling - basierend auf einem Satz von aktiven Wirkstoffen (Agonisten oder Antagonisten) - die Konstruktion eines dreidimensionalen Modells der Bindungsstelle. An einem solchen Surrogat lassen sich Wechselwirkungen bekannter oder hypothetischer Wirkstoffe simulieren und deren Bindungsaffinitäten semi-quantitativ abschätzen (Vedani et al., 1995; Vedani und Zbinden, 1996).

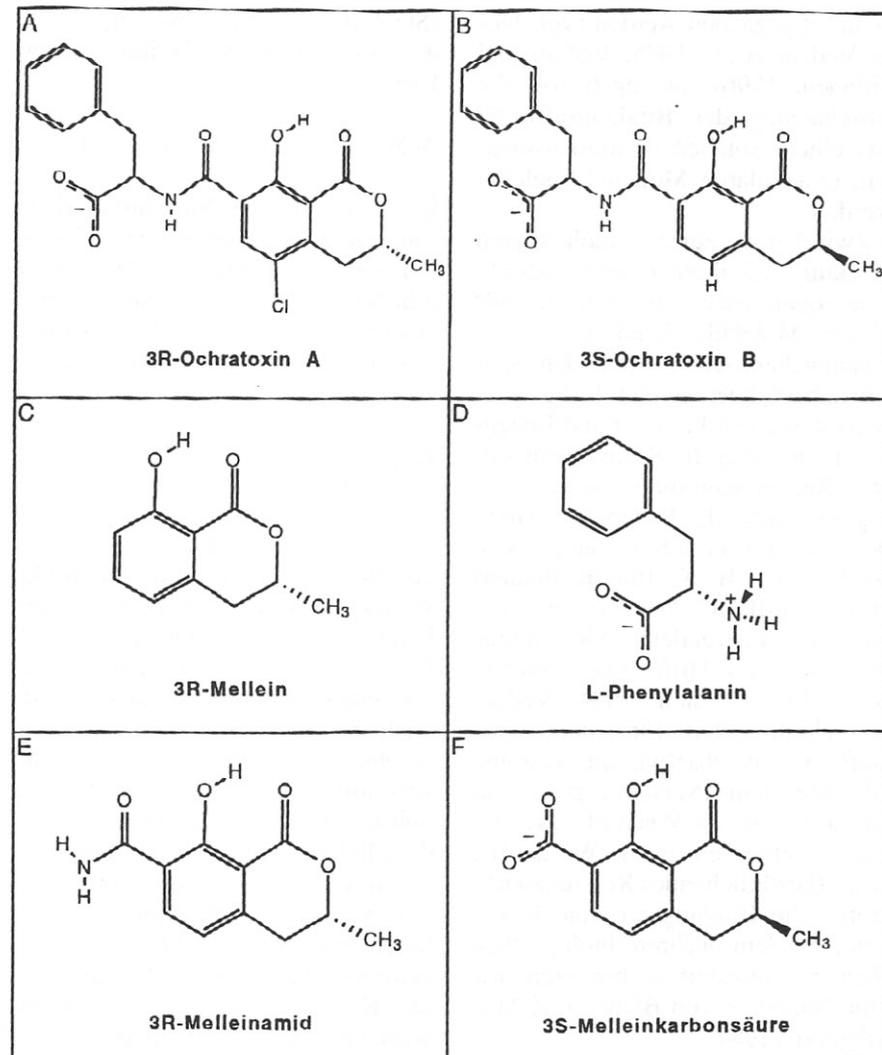


Abbildung 1: Für das Pseudorezeptormodeling verwendete Wirkstoffe: a) 3R-Ochratoxin A, b) 3S-Ochratoxin B, c) 3R-Mellein, d) L-Phenylalanin, e) 3R-Melleinamid (3R-Ochratoxin- α -amid), f) 3S-Melleinkarbonsäure. 3S-Ochratoxin A, 3R-Ochratoxin B, 3S-Mellein, 3S-Melleinamid und 3R-Melleinkarbonsäure sind nicht dargestellt. Sie lassen sich aber leicht aus den abgebildeten Wirkstoffen ableiten.

2 Methodik

Das Pseudorezeptor-Konzept besteht darin, die gebundenen Spezies (Wirkstoffe) in genügend, spezifisch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Pseudorezeptor einzubinden, um so die wichtigsten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen am wahren Rezeptor zu simulieren. Ein Pseudorezeptor kann nicht als räumliches Abbild des biologischen Rezeptors verstanden werden; vielmehr müssen seine Bausteine (Aminosäuren) dergestalt im dreidimensionalen Raum angeordnet sein, daß der Pseudorezeptor einen Satz von Wirkstoff-

fen in der gleichen Stärke wie der biologische Rezeptor zu diskriminieren vermag; Berechnete Unterschiede in der Bindungsaffinität an den Pseudorezeptor sollten in semi-quantitativer Weise mit den experimentellen Werten gegenüber dem wahren biologischen Rezeptor übereinstimmen (Snyder et al., 1993).

Ein an unserem Labor entwickeltes Pseudorezeptormodeling-Konzept erlaubt die Konstruktion eines dreidimensionalen, peptidischen Pseudorezeptors – eines Miniproteins – um ein beliebiges molekulares Gerüst. Auf Details der Konstruktion eines Pseudorezeptors soll an dieser Stelle

nicht eingegangen werden (vgl. hierzu Vedani et al., 1995; Vedani und Zbinden, 1996); hingegen soll die Abschätzung der Bindungsaffinität aus einem solchen dreidimensionalen, molekularen Modell hergeleitet werden.

Zwischen einer molekularen Struktur und ihrer Energie besteht eine quantitative Beziehung. Für kleine Moleküle kann diese mit quantenchemischen Methoden sehr genau berechnet werden. Für grössere Systeme wie Proteine und Rezeptoren übersteigt die Komplexität solcher Rechnungen die heute zur Verfügung stehende Computerleistung bei weitem. Hier wird auf empirische Verfahren (z.B. Kraftfeldmethoden) zurückgegriffen. Der in unserem Konzept verwendete Algorithmus berechnet mit Hilfe eines solchen Kraftfeldes (Vedani, 1994; Vedani und Huhta, 1990) für jeden Wirkstoff eine Wechselwirkungsenergie, ΔE , mit dem Pseudorezeptor. Um aus der relativen Wechselwirkungsenergie eines einzelnen Wirkstoffs, $\Delta \Delta E$, (bezüglich eines Referenzwirkstoffs) die Bindungsaffinität, k , gegenüber dem wahren biologischen Rezeptor abzuleiten, benützen wir eine Näherung von Blaney und Mitarbeitern (1984):

$$\Delta(\Delta G_{\text{ber.}}^{\circ}) \approx \Delta(\Delta E_{\text{ber.}}) - \Delta(T\Delta S_{\text{Bindung}}) - \Delta(\Delta G_{\text{Solvatation, Wirkstoff}})$$

sowie:

$$k = e^{-\Delta G^{\circ}/RT} \text{ bzw.}$$

$$k_1/k_2 = e^{-\Delta \Delta G^{\circ}/RT}$$

Die freie Solvatationsenergie der Wirkstoffe, $\Delta G_{\text{Solvatation, Wirkstoff}}^{\circ}$, berechnen wir nach einem semi-analytischen Ansatz (Still et al., 1990); Unterschiede in der Bindungsentropie, $T\Delta S_{\text{Bindung}}$, können aufgrund der Torsionsfreiheitsgrade der einzelnen Wirkstoffe abgeschätzt werden (Searle and Williams, 1992).

Quantitativ gesehen, diskriminiert ein Pseudorezeptor nicht immer im gleichen Ausmaß wie der entsprechende biologische Rezeptor. Um semi-quantitative Voraussagen zu machen, können berechnete Werte anhand einer linearen Regression

(Steigung a , Achsenabschnitt b) mit den Datenpaaren des Trainingssatzes korrigiert werden:

$$\Delta(\Delta G_{\text{kor.}}^{\circ}) = |a| \cdot \Delta(\Delta G_{\text{ber.}}^{\circ}) + b$$

Um während der Strukturverfeinerung die Korrelation zu maximieren, d.h. ein aussagekräftiges Modell zu erhalten, wird im Kraftfeld-Energieausdruck ein zusätzlicher Kopplungsterm eingeführt (Vedani et al., eingesandt):

$$E_{\text{total}} = E_{\text{Kraftfeld}} + k_{\text{Koppl.}} \cdot \sum |\Delta(\Delta G_{\text{ber.}}^{\circ}) - \Delta(\Delta G_{\text{exp.}}^{\circ})|^2$$

Dieser Ansatz erlaubt es, für einen gegebenen Trainingssatz an Wirkstoffen ein Modell mit hoher Korrelation ($>0,95$) zu finden. Für die Güte des Surrogates ist eine solche notwendig, aber nicht hinreichend. Vielmehr muß das Rezeptormodell anschließend an einem Satz von Testwirkstoffen validiert werden, d.h. an Substanzen, die nicht zur Erstellung des Modelles verwendet wurden.

Um die gegenseitige Anpassung von Wirkstoff und Rezeptor zu simulieren, haben wir den Algorithmus so erweitert, daß zunächst der Rezeptor mit Korrelationskopplung optimiert wird. Dies führt zu einem Modell mit hoher Korrelation ($>0,95$) für die Wirkstoffe des Trainingssatzes. In einem zweiten Schritt werden die Wirkstoffe frei (d.h. ohne Korrelationskopplung) relaxiert. Dies führt zwangsweise zu einem Modell mit geringerer Korrelation. Danach wird wiederum der Rezeptor mit Korrelationskopplung optimiert, und die Korrelation wird wieder hoch. Im nächsten Schritt (Relaxation der Wirkstoffe) wird die Korrelation abermals abnehmen, aber nicht mehr so stark wie beim ersten Mal, da sich das Rezeptormodell im zweiten Schritt den relaxierten Wirkstoffen bereits angepaßt hat. In einem iterativen Verfahren werden nun diese beiden Schritte so lange ausgeführt, bis das relaxierte Modell ebenfalls eine hohe Korrelation aufweist. Man spricht dann von einem „equilibrierten System“.

Anschließend werden die Wirkstoffe des Testsatzes zugefügt und ohne Korrelationskopplung relaxiert (denn sonst würden sie lediglich einem erweiterten Trainingssatz entsprechen). Das Rezeptormodell und die Wirkstoffe des Trainingssatzes werden dabei nicht mehr verändert. Die Wirkstoffe des Testsatzes können sich so – während der Simulation – individuell an die Rezeptortopologie anpassen, was ja auch am biologischen Rezeptor der Fall ist. Außerdem werden so die Wirkstoffe des Testsatzes gleich wie diejenigen des Trainingssatzes behandelt.

3 Resultate und Diskussion

Unser Modell für den vermuteten Ochratoxinrezeptor wurde basierend auf einem Trainingssatz von vier Wirkstoffen (3R-Ochratoxin A, 3R-Ochratoxin B, 3S-Ochratoxin B, 3S-Mellein) erstellt und anschließend an einem Testsatz von drei Wirkstoffen (3S-Ochratoxin A, 3R-Mellein, L-Phenylalanin) geprüft. Die IC_{50} -Werte von 3R-Ochratoxin A, 3S-Ochratoxin A, 3R-Ochratoxin B, \pm Mellein und L-Phenylalanin stammen aus Experimenten, in welchen die Effekte dieser Substanzen auf den Proteingehalt von Hirn- und Hirnhautzellen des Hühnerembryos in Flachkulturen bestimmt wurden (Bruinink et al., eingesandt). Die IC_{50} -Werte von 3R-Ochratoxin A und 3S-Ochratoxin A unterscheiden sich im Experiment um einen Faktor 12. Derselbe Faktor wurde verwendet, um die IC_{50} -Werte für 3S-Ochratoxin B und 3S-Mellein zu bestimmen. Dabei wurde angenommen, daß sich die Bindungsaffinitäten der 3R und 3S-Formen von Ochratoxin B und Mellein um denselben Faktor 12 unterscheiden wie diejenigen des Ochratoxin A. Zusätzlich wurde angenommen, daß alle Testsubstanzen gleich stabil wie 3R-Ochratoxin A, 3S-Ochratoxin A, 3R-Ochratoxin B (Bruinink et al., eingesandt) sind.

Die dreidimensionalen Strukturen der untersuchten Wirkstoffe wurden mit *MacroModel 5.0* (Mohamadi et al., 1990) erzeugt und unter Berücksichtigung

sichtigung von Solvatationseffekten optimiert. Die Säuregruppe der Ochrotoxine ist bei physiologischem pH nicht protoniert (Abb. 1a, 1b); L-Phenylalanin liegt in wässriger Lösung als Zwitterion vor (Abb. 1d). ESP (*electrostatic potential fitted*)-Ladungen wurden mit MOPAC 6.0 (QCPE, 1992) bestimmt, die Solvatationsenergien der freien Wirkstoffe nach einem semi-analytischen Ansatz berechnet (Still, 1990). Das Modell für den Ochrotoxinrezeptor wurde mit der an unserem Labor entwickelten Pseudorezeptormodelingsoftware *Yak 4.1* (Vedani et al., 1995; Vedani und Zbinden, 1996, Vedani et al., eingesandt) erstellt und optimiert.

In diesem Modell beträgt der Korrelationskoeffizient berechneter und experimenteller Bindungsaffinitäten für die vier Wirkstoffe des Trainingsatzes 1,00 (Tabelle). Die Steigung der Regressionsgeraden errechnet sich zu 0,94, was zeigt, daß der Pseudorezeptor die geprüften Wirkstoffe fast gleich wie der biologische Rezeptor diskriminiert. Der mittlere Fehler in der Voraussage der Bindungsaffinität für einen Testsatz von drei Wirkstoffen beträgt 0,182 kcal/mol, entsprechend einem Faktor 1,4 im IC_{50} -Wert. Ein Vertrauensbereich mit 99,7% Wahrscheinlichkeit (3σ) entspricht 0,669 kcal/mol bzw. einem Faktor 3,2 im IC_{50} -Wert. Dies ist bei einem Affinitätsbereich von 10^5 und einem mittleren Fehler in der experimentellen Bestimmung der IC_{50} -Werte von einem Faktor 1,5 (Bruinink et al., eingesandt) hinreichend klein, um eine sichere Klassierung der geprüften Substanzen vorzunehmen.

Das Surrogat für die Bindungsstelle des Ochrotoxinrezeptors (Abbildung 2) besteht aus insgesamt zwölf Aminosäuren (Arg, Gly, Gly, Phe, Tyr, Gln, Trp, Phe, Ile, Thr, Val, Ala). Die hohe Affinität von Ochrotoxin A und B wird in diesem Modell durch vier Wechselwirkungen erklärt, die weder bei Mellein noch bei Phenylalanin als Substrat möglich sind: Eine Salzbrücke¹ zur Guanidiniumgruppe eines Arginins und drei Wasserstoffbrücken zu zwei

Tabelle: Vergleich berechneter und experimenteller Dissoziationskonstanten für den hypothetischen Ochrotoxinrezeptor. A: Trainingsatz; B: Testsatz; C: Voraussagen

Wirkstoff	Experimentelle Dissoziationskonstante (IC_{50} -Protein) [mol/l]	Berechnete Dissoziationskonstante Pseudorezeptor [mol/l]	k_{exp}/k_{ber} ¹	Relativer Fehler (Faktor in k) ²
A				
3R-Ochrotoxin A	$1,32 \cdot 10^{-7}$	$1,32 \cdot 10^{-7}$	Referenz	Referenz
3R-Ochrotoxin B	$3,31 \cdot 10^{-6}$	$3,53 \cdot 10^{-6}$	0,94	1,07
3S-Ochrotoxin B *	$3,98 \cdot 10^{-5}$	$3,65 \cdot 10^{-5}$	1,09	1,09
3S-Mellein *	$1,20 \cdot 10^{-2}$	$1,23 \cdot 10^{-2}$	0,98	1,03
B				
3S-Ochrotoxin A	$1,58 \cdot 10^{-6}$	$1,12 \cdot 10^{-6}$	1,41	1,41
3R-Mellein	$1,00 \cdot 10^{-3}$	$1,79 \cdot 10^{-3}$	0,56	1,79
L-Phenylalanin	$6,01 \cdot 10^{-3}$	$6,05 \cdot 10^{-3}$	0,99	1,01
RMS ³				1,44
C				
3R-Melleinamid ?	?	$0,77 \cdot 10^{-9}$	–	–
3S-Melleinamid ?	?	$6,38 \cdot 10^{-9}$	–	–
3R-Melleinsäure ? ⁴	?	nicht bindend	–	–
3S-Melleinsäure ? ⁴	?	nicht bindend	–	–

¹ $k_{exp}/k_{ber} > 1,0$: zu stark vorausgesagt; $k_{exp}/k_{ber} < 1,0$: zu schwach vorausgesagt

² $k_{exp}/k_{ber} > 1,0 \rightarrow \text{Rel.Fehler} = k_{exp}/k_{ber}$; $k_{exp}/k_{ber} < 1,0 \rightarrow \text{Rel.Fehler} = k_{ber}/k_{exp}$

³ $RMS = (\sum [\text{Rel.Fehler}]^2 / n)^{0,5}$; $n=3$: Anzahl Wirkstoffe im Testsatz

⁴ *In vivo* nicht toxisch (Chu, 1974)

* Affinität des 3S-Epimers aus derjenigen des 3R-Analogons abgeleitet (vgl. Text).

Glycins sowie zum Seitenkettenamid eines Glutamins.

Die (bei physiologischem pH) positiv geladene Guanidiniumgruppe des Arginins ist optimal positioniert, um eine Salzbrücke mit der (bei physiologischem pH) negativ geladenen Carboxylgruppe des Ochrotoxins einzugehen ($H \cdots O$ -Distanz: 1,81 Å bzw. 1,85 Å).² In Abwesenheit von Substrat könnte das Arginin über eine Wasserstoffbrücke mit dem benachbarten Glutamin stabilisiert werden. Im Komplex mit Ochrotoxin bildet dessen Amid-Stickstoffatom eine Wasserstoffbrücke mit dem Seitenkettenamid des Glutamins ($H \cdots N$ -Distanz: 1,96 Å).

Die Amid-Stickstoffatome der beiden Glycine gehen je eine Wasser-

stoffbrücke mit dem Amid-Sauerstoffatom des Ochrotoxins ($H \cdots N$ -Distanz: 1,81 bzw. 1,87 Å) ein. Eine solche räumliche Anordnung zweier Glycine (Präsentierung zweier gerichteter Wasserstoffbrücken für ein Carbonylsauerstoffatom eines Substrates) ist mit dem sog. *oxyanion hole* vergleichbar, wie es in den Strukturen von Serinproteasen (z.B. Trypsin oder Elastase) gefunden wird.

Zwei hydrophobe Bindungstaschen sind für die Erkennung der aromatischen Seitenketten des Ochrotoxins, Melleins und Phenylalanins verantwortlich. Das 3R-Isomere paßt besser in die hydrophobe Tasche II (Abbildung 2), was in einer höheren Affinität an den Ochrotoxinrezeptor resultiert (Ochrotoxin A: 8,5; Ochra-

¹ Unter einer Salzbrücke versteht man eine starke nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen zwei elektrisch entgegengesetzt geladenen Molekülen oder Molekülfragmenten. Oft besteht eine Salzbrücke aus zwei Wasserstoffbrücken wie z.B. zwischen den Aminosäuren Arginin und Glutamat oder den Aminosäuren Lysin und Aspartat.

² Die optimale Länge einer $O-H \cdots O$ -Wasserstoffbrücke beträgt 1,79 Å, diejenige einer $N-H \cdots O$ bzw. $O-H \cdots N$ -Wasserstoffbrücke 1,89 Å und diejenige einer $N-H \cdots N$ -Wasserstoffbrücke 1,99 Å. Salzbrücken sind – je nach elektrischer Ladung der Partner – 0,05 bis 0,2 Å kürzer.

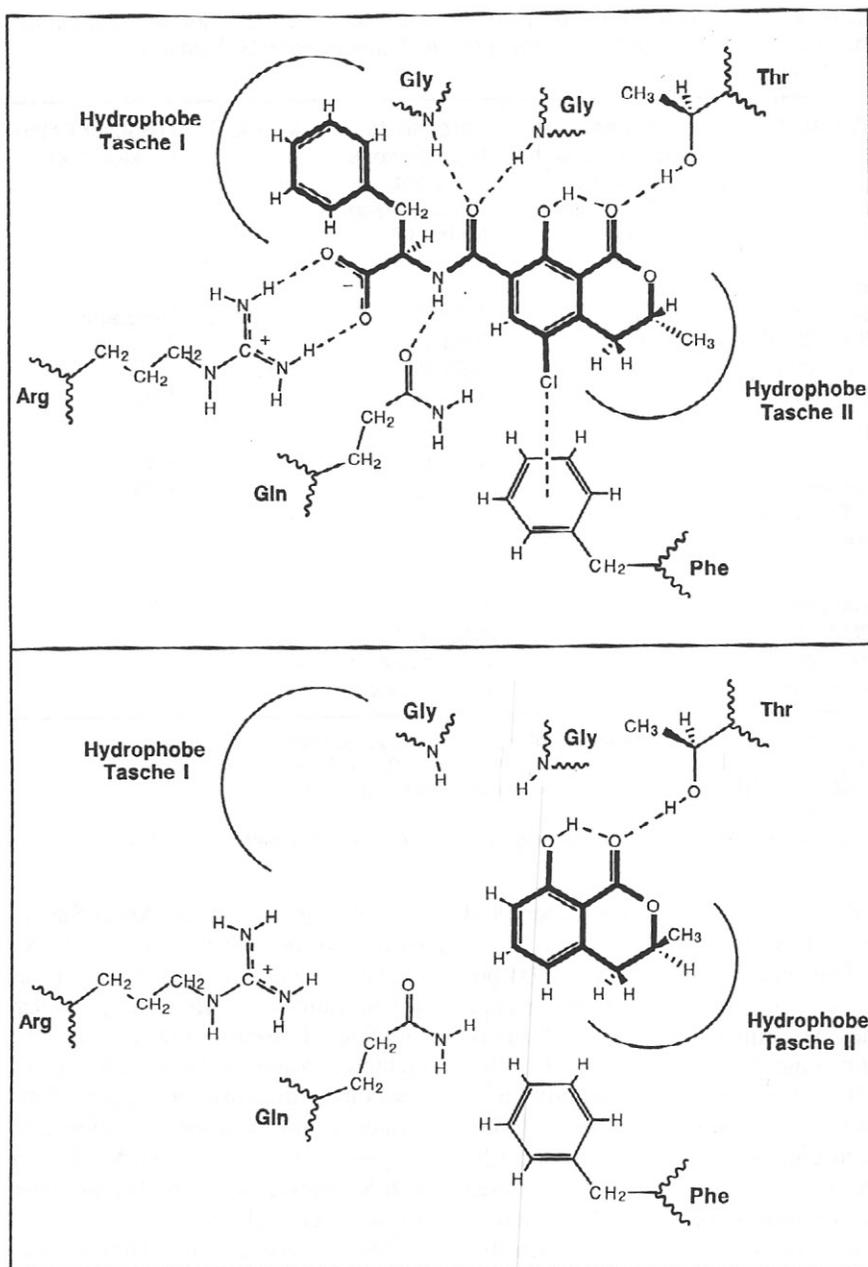


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Modelles für die Bindungstasche im Ochratoxinrezeptor und seiner Wechselwirkungen mit 3R-Ochratoxin A (oben) und 3S-Mellein (unten). Salz- und Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien wiedergegeben, ebenso die Wechselwirkung des Chloratoms von 3R-Ochratoxin A mit dem π -Elektronensystem eines Phenylalanins.

toxin B: 10,3; Mellein: 6,9; der experimentelle Wert für Ochratoxin A beträgt 12,0). Ochratoxin A, das gegenüber dem Ochratoxin B in der Ring-5-Stellung eine Cl-Substitution aufweist, bindet 27 mal stärker an den Ochratoxinrezeptor (Experiment: 25) und ist dadurch vermutlich auch stärker toxisch. Die maßgebende Wechselwirkung ist die Interakti-

on des (positiv polarisierten) Chloratoms mit dem π -Elektronensystem einer Phenylalanylseitenkette des Rezeptors (C...Cl-Distanz: 3,5 bis 3,8 Å). In Abwesenheit einer Amidgruppe kann Mellein – gemäß unserem Modell – nur sehr schwach an den Ochratoxinrezeptor binden (13600 mal schwächer als Ochratoxin A; Experiment: 7600) und wird

als daher als nicht toxisch eingestuft. Auch L-Phenylalanin vermag nur sehr schwach zu binden (Modell: 45800 mal schwächer als Ochratoxin A; Experiment: 45500). Um unsere Amidbindungshypothese zu prüfen, haben wir 7-CONH₂-Mellein (Ochratoxin-a-amid; in dieser Arbeit als „Melleinamid“ bezeichnet; Abbildung 1e) und 7-COOH-Mellein („Melleinkarbonsäure“, Abbildung 1f) an diesem Modell geprüft. Melleinamid wird als sehr stark bindend (und damit auch sehr toxisch) vorausgesagt. Im Gegensatz dazu vermag Melleinkarbonsäure nicht an den Ochratoxinrezeptor zu binden ($K > 1,0$) und wird als „nicht toxisch“ vorausgesagt, was mit *in vivo* Daten aus der Literatur in Einklang ist (Chu, 1974). Es ist geplant (AB), Melleinamid und Melleinkarbonsäure zu synthetisieren und ihre toxische Wirkung unter identischen Bedingungen (Bruinink et al., eingesandt) *in vitro* zu bestimmen.

Zusammen mit der experimentell beobachteten nicht-kompetitiven Kinetik bezüglich Phenylalanin kann dieses molekulare Modell als zweiter Hinweis auf die Existenz eines eigentlichen Ochratoxinrezeptors gewertet werden, vermag das Modell doch die Bindungsaffinitäten eines -wenngleich kleinen - Testsatzes an Wirkstoffen mit vergleichbarer Genauigkeit wie die experimentelle Messung vorauszusagen. Die mikromolare Affinität von Ochratoxin A (Experiment: $1,3 \cdot 10^{-7}$ mol/l; Modell: $1,3 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und Ochratoxin B ($3,3 \cdot 10^{-6}$ mol/l; $3,5 \cdot 10^{-6}$ mol/l) zeigt, daß es sich um eine spezifische Rezeptorbindung handelt. Die millimolare Affinität von Mellein ($1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l) und Phenylalanin ($6,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l) kann nicht als spezifische Bindung an den Ochratoxinrezeptor interpretiert werden und steht somit nicht im Widerspruch mit der experimentell beobachteten nicht-kompetitiven Kinetik (Bruinink und Sidler, eingesandt).

Hervorzuheben ist, daß dieses molekulare Modell einen Affinitätsbereich von fünf Größenordnungen (3R-Ochratoxin A: $IC_{50}=1,32 \cdot 10^{-7}$ mol/l; 3S-Mellein: $IC_{50}=1,2 \cdot 10^{-2}$ mol/l

l) zu erklären vermag. Ebenso erklärt es die Bindung elektrisch unterschiedlichst geladener Wirkstoffe: Alle Ochratoxine und Melleinkarbonsäuren binden bei physiologischem pH als Anionen; L-Phenylalanin ist ein Zwitterion, während die Melleine und Melleinamide neutrale Spezies darstellen. Was im Modell nicht simuliert worden ist, sind Phänomene der Metabolisierung, Elimination, Aufnahme und Verteilung der Wirkstoffe im Gewebe. Es wurde vielmehr angenommen, daß die untersuchten Wirkstoffe in der oben beschriebenen Form an den hypothetischen Rezeptor binden. Dies ist jedoch mit den *in vitro*-Studien (Bruinink und Sidler, eingesandt) in Einklang.

Dieses molekulare Modell liefert nebst den semi-quantitativen Werten für die Affinität einer Serie von Wirkstoffen an den hypothetischen Ochratoxinrezeptor auch einen indirekten Hinweis für ihre toxische Wirkung, indem es das Vorliegen einer rezeptor-gekoppelten Toxizität vermuten läßt. Ein Schwachpunkt des Modelles kann in der geringfügigen Anzahl an Ochratoxin-Derivaten, die zur Zeit zur Verfügung stehen, um es zu überprüfen, gesehen werden.

Der Sinn eines kombinierten Einsatzes von *in vitro* und computergestützten Methoden kann natürlich nicht darin gesehen werden, „alternative Toxine“ zu finden, sondern vielmehr – im Sinne einer 3R-Forschung – als Screeningmethode zur Prüfung potentieller Toxine. Im weiteren können damit mechanistische Erklärungen für (rezeptor-gekoppelte) toxische Phänomene gefunden werden. Basierend auf einem solchen molekularen Modell könnten in einem nächsten Schritt Substanzen entwickelt werden, welche die toxische Wirkung von Ochratoxin A antagonisieren. Wünschenswert erscheint, daß *in vitro* Tests unter Berücksichtigung von pharmakokinetischen und metabolischen Phänomenen möglichst frühzeitig mit der Modellierung verknüpft werden (Folkers, 1995).

Literaturverzeichnis

- Baumann, U. und Zimmerli, B. (1988). Einfache Ochratoxin-A-Bestimmung in Lebensmitteln. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 79, 151–158.
- Blaney, J. M., Weiner, P. K., Dearing, A., Kollman, P. A., Jorgensen, E. C., Oatley, S. J., Burrige, J. M. und Blake, J. F. (1982). Molecular mechanics simulation of protein-ligand interactions: Binding of thyroid analogues to prealbumin. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6424–6434.
- Bruinink, A., Rasonyi, T., Sidler, C. und Dietrich, D. R. (eingesandt). Effects of ochratoxins on embryonic chick neural retina, brain and meningeal cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*
- Bruinink, A. und Sidler, C. (in Vorbereitung). The neurotoxic effects of ochratoxin A are cell-type specific, are reduced by protein binding but are not affected by L-phenylalanine. *Arch. Toxicol.*
- Breitholz-Emanuelsson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger, I. und Hult, K. (1993). Ochratoxin A and citrinin upon biochemical function of porcine kidney. *J. AOAC* 76, 842–846.
- Chu, F. S. (1974). Studies on ochratoxines. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 2, 499–523.
- Creppy, E. E., Kern, D., Steyn, P. S., Vieggar, R., Rösenthaler, R. und Dirheimer, G. (1983). Comparative study of the effects of ochratoxin A analogues on yeast phenylalanyl-tRNA-synthetase and on the growth of protein synthesis of hepatoma cells. *Tox. Lett.* 19, 217–224.
- Folkers, G. (1995). Modellierung von Protein-Ligand-Komplexen als Basis einer rationalen Arzneistoffentwicklung. *ALTEX* 12, 138–151.
- Hald, B. (1991). Ochratoxin A in human blood in European countries. *IARC Sci. Publ.* 115, 159–164.
- Mohamadi, F., Richards, N. G. J., Guida, W. C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T. und Still, W. C. (1990). MacroModel – An integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J. Comput. Chem.* 11, 440–448.
- Miki, T., Fukui, Y., Uemura, N. und Takeguchi, Y. (1994). Regional difference in the neurotoxicity of ochratoxin A on the developing cerebral cortex in mice. *Devl. Brain. Res.* 82, 259–264.
- QCPE (1994). Quantum Chemistry Program Exchange. University of Indiana, Bloomington, Indiana, USA.
- Ramsden, C. A. (Hrsg. 1990). Quantitative drug design. *Comprehensive Medicinal Chemistry* 4, Oxford: Pergamon Press.
- Searle, M. S. und Williams, D. H. (1992). The cost of conformational order: Entropy changes in molecular associations. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10690–10697.
- Shirai, S. (1991). Developmental mechanism of congenital eye abnormalities. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 95, 1206–1237.
- Snyder, J. P., Rao, S. N., Koehler, K. F. und Vedani, A. (1993). Pseudoreceptors. In H. Kubinyi, (Hrsg.), *3D-QSAR in Drug Design* (336–354). Leiden NL: ESCOM Science Publishers B.V.
- Still, W. C., Tempczyk, A., Hawley, R. C. und Hendrickson, T. (1990). Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6127–6129.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D. R., Schlatter, J. und Schlatter, Ch. (eingereicht). Intraindividual variations in plasma levels and kinetic parameters of ochratoxin A in humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D. R., Schlatter, J. und Schlatter, Ch. (1995). The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem. Toxicol.* 33, 341–355.
- Vedani, A., Dobler, M., Folkers, G. und Zbinden, P. (eingesandt). Pseudoreceptor modeling. A molecular model for the binding site of the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.*
- Vedani, A. und Zbinden, P. (1996). Computermodelle im pharmakologischen und toxikologischen Screening. In F. P. Gruber und H. Spielmann (Hrsg.), *Alternativmethoden zu Tierversuchen* (146–163). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Vedani, A., Zbinden, P., Snyder, J. P. und Greenidge, P. A. (1995). Pseudoreceptor modeling: The construction of three-dimensional receptor surrogates. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 4987–4994.
- Vedani, A. (1994). Das Konzept des Pseudorezeptors für das pharmakologische Screening. *ALTEX* 11, 11–21.
- Vedani, A. und Huhta, D. W. (1990). A new force field for modeling metalloproteins. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4759–4767.

Verdankung

Dieses Projekt wurde durch die großzügige finanzielle Unterstützung der Margaret und Francis Fleitmann-Stiftung (Luzern), der Stiftung Fonds für versuchstierfreie Forschung (FFVFF, Zürich) und der Stiftung SIAT (Zürich) ermöglicht.

Zusatzmaterial

Die dreidimensionalen Koordinaten des in diesem Artikel diskutierten Modelles der Bindungsstelle des vermuteten Ochratoxinrezeptors können via E-Mail angefordert werden (siat@ dial.eunet.ch).

Korrespondenzadresse

Dr. Angelo Vedani
SIAT Biografik-Labor
Missionsstraße 60
CH-4055 Basel
Tel. +41-61-321-0533,
Fax: +41-61-321-0540,
E-Mail: siat@ dial.eunet.ch.