

Ochratoxine: Molekulare Strategien zur Entwicklung eines Gegengiftes

Daniel R. McMasters und Angelo Vedani
Biografik Labor 3R, CH-Basel

Zusammenfassung

Ochratoxin A (OcA) ist der prominenteste Vertreter einer Gruppe von Mykotoxinen, die nephrotoxische, genotoxische, teratogene, kanzerogene und immunsuppressive Wirkungen zeigen sowie mit der Balkan Endemic Nephropathy (ein chronisches Nierenversagen) in Verbindung gebracht werden. Für die Toxizität von OcA wird hauptsächlich dessen Hemmung von Phenylalanin-t-RNA-Synthetase, einem Phenylalanin-metabolisierenden Enzym, verantwortlich gemacht. Anhand der dreidimensionalen Struktur von Phenylalanin-t-RNA-Synthetase haben wir mittels Moleküldynamik-Simulationen die Wechselwirkungen dieses Enzyms mit OcA untersucht und drei sehr unterschiedliche Bindungsmodi gefunden, die aber lediglich eine Affinität im millimolaren Bereich erwarten lassen. Dies widerspricht gängigen Lehrbuchmeinungen, ist aber in Übereinstimmung mit neueren in vitro Studien an reiner Phenylalanin-t-RNA-Synthetase, welche dieses Enzym ebenfalls als Hauptangriffspunkt von OcA ausschließen. In vivo bindet OcA bevorzugt an Serumalbumin, einem Plasmaprotein, mit entsprechender Auswirkung auf seine Toxikokinetik (Retention). Eine Antagonisierung dieses Effekts würde zu einer erhöhten Eliminationsrate führen und dabei alle von OcA ausgehenden toxischen Effekte reduzieren, was an Mäusen mit Albuminmangel nachgewiesen wurde. Anhand der dreidimensionalen Struktur von Serumalbumin haben wir dessen Interaktion mit OcA simuliert. Langfristiges Ziel ist es, mittels computer-gestützter Verfahren ohne Tierversuche einen synthetischen Antagonisten (Gegengift) zu finden, der eine Affinität zwischen jenen von endogenen Liganden (z.B. Bilirubin) und OcA aufweist. Ein solcher Wirkstoff könnte – durch verkürzte Retention des Toxins im Organismus – in der Lage sein, alle toxischen Wirkungen von OcA gleichzeitig zu eliminieren.

Keywords: receptor-mediated toxicity, molecular-dynamical simulations, mechanisms of ochratoxin toxicity, phenylalanine-t-RNA synthetase, serum albumin

1 Einleitung

Ochratoxine (Abb. 1) sind Mykotoxine, die von Schimmelpilzen auf Getreide, Erdnüssen, Kaffee und Gemüse freigesetzt werden und als Folge zahlreiche Lebensmittel verunreinigen (Marquardt und Frohlich, 1992; Baumann und Zimmerli, 1988; van de Stegen et al., 1997). In toxikologischen Untersuchungen zeigt Ochratoxin A (OcA; der prominenteste Vertreter dieser

Gruppe) nephrotoxische, genotoxische, teratogene, kanzerogene und immunsuppressive Wirkungen. Erhöhte Blutwerte bei Menschen in osteuropäischen Ländern lassen einen Zusammenhang mit der im Balkan gehäuft auftretenden Nierenerkrankung *Balkan Endemic Nephropathy* vermuten (Boorman, 1989; Nikolov et al., 1996; Bozic et al., 1995). Als primäre Ursachen der Ochratoxintoxizität werden Wechselwirkungen mit Phenylalanin-metabolisierenden Enzymen, erhöhte Lipidper-

oxidation sowie Störung der mitochondrialen Funktionen postuliert (Marquardt und Frohlich, 1992). Als wesentlichster Faktor der Ochratoxintoxizität wurde bis anhin die Hemmung des Enzyms Phenylalanin-t-RNA-Synthetase und damit der Proteinsynthese postuliert (Creppy et al., 1983).

Wir haben kürzlich über die erste Phase einer Modellierungsstudie berichtet, in der wir die Wechselwirkungen von OcA

Summary: Ochratoxins: Molecular strategies for developing an antidote

Ochratoxin A (OcA) is a prominent member of a group of mycotoxins which display nephrotoxic, genotoxic, teratogenic, carcinogenic and immunsuppressive effects and which have also been linked to Balkan Endemic Nephropathy. The toxicity of OcA is thought to be primarily due to its inhibition of phenylalanine-t-RNA synthetase, a phenylalanine-metabolizing enzyme.

Based on the three-dimensional structure of phenylalanine-t-RNA synthetase, we have analyzed its interactions with OcA by means of molecular-dynamical simulations and identified three quite different binding modes, all of which suggest an affinity only in the millimolar range. This would seem to be in conflict with toxicological findings frequently cited in textbooks but is in agreement with recent in vitro studies on purified phenylalanine-t-RNA synthetase, which also exclude this enzyme as the main target for OcA action.

In vivo, OcA binds preferentially to serum albumin, a plasma protein, with a corresponding effect on its toxicokinetics (retention). Antagonizing this effect would lead to an enhanced elimination rate, thereby reducing all adverse effects of OcA, as has been demonstrated using albumin-deficient mice. Based on the three-dimensional structure of serum albumin, we have simulated its interaction with OcA. The long-term goal is the animal-free identification of a synthetic antagonist with an affinity between that of the endogenous ligands (e.g. bilirubin) and OcA. Such a substance could – by reducing the retention time of the toxin in the body – potentially eliminate all toxic effects of OcA.

mit dem Enzym Phenylalanin-t-RNA-Synthetase – mittels interaktivem Docking – auf molekularer Ebene untersucht haben (Vedani und Zbinden, 1997). Diese lediglich qualitative Betrachtungsweise hat aber bereits die in Lehrbüchern aufgrund der zweidimensionalen Strukturverwandtschaft postulierte analoge Bindungsweise von OcA und dem natürlichen Substrat, Phenylalaninadenylat (Phe-AMP, Abb. 1) in Frage gestellt. Auch auf experimenteller Ebene wurde – durch Verwendung von reinerem Enzym – die ursprüngliche Messung (Creppy et al., 1983) revidiert und die kompetitive Hemmung durch OcA als für die Toxizität ausschlaggebender Mechanismus praktisch verworfen (Roth et al., 1993; Bruinink and Sidler, 1997).

Eine kompetitive Hemmung eines Enzyms beruht immer auf einer dreidimensionalen (!) Strukturanalogie zwischen natürlichem Substrat und Inhibitor. Dies ist bei Phe-AMP und OcA – als Folge ihrer räumlichen Faltung und Stereochemie – aber nicht gegeben: Während Phe-AMP an der C-Position beispielsweise eine positiv geladene Ammoniumgruppe trägt, weist OcA an derselben Stelle eine negativ geladene Carboxylgruppe auf. In Phe-AMP folgt eine negativ geladene Phosphatgruppe, in OcA aber eine elektrisch neutrale Amidgruppe. Als Gesamteinheit ist Phe-AMP elektrisch neutral, während OcA eine negativ geladene Spezies ist. Das Enzym Phenylalanin-t-RNA-Synthetase wurde im Laufe der Evolution sicherlich für die Erkennung und Bindung von Phe-AMP optimiert, denn es muß ja während der Proteinsynthese zwischen Phenylalanin und den 19 übrigen Aminosäuren diskriminieren können. Der Versuch, OcA „analog“ zu Phe-AMP in die Bindungstasche einzupassen, entspricht daher dem Unterfangen, eine „rechte Hand in einen linken Handschuh zu zwingen“.

In diesem Bericht werden die energetischen Verhältnisse der Bindung von Phe-AMP und OcA an das Enzym Phenylalanin-t-RNA-Synthetase diskutiert. Semi-quantitative Energiewerte können mittels Molekülmechanik- und Moleküldynamiksimulationen der Ligand-Enzym-Komplexe abgeschätzt werden. Moleküldynamiksimulationen sind rechenmässig sehr viel aufwendiger und dann angezeigt, wenn beim Bindungsvorgang des Liganden (Substrat, Inhibitor) eine erhebliche Än-

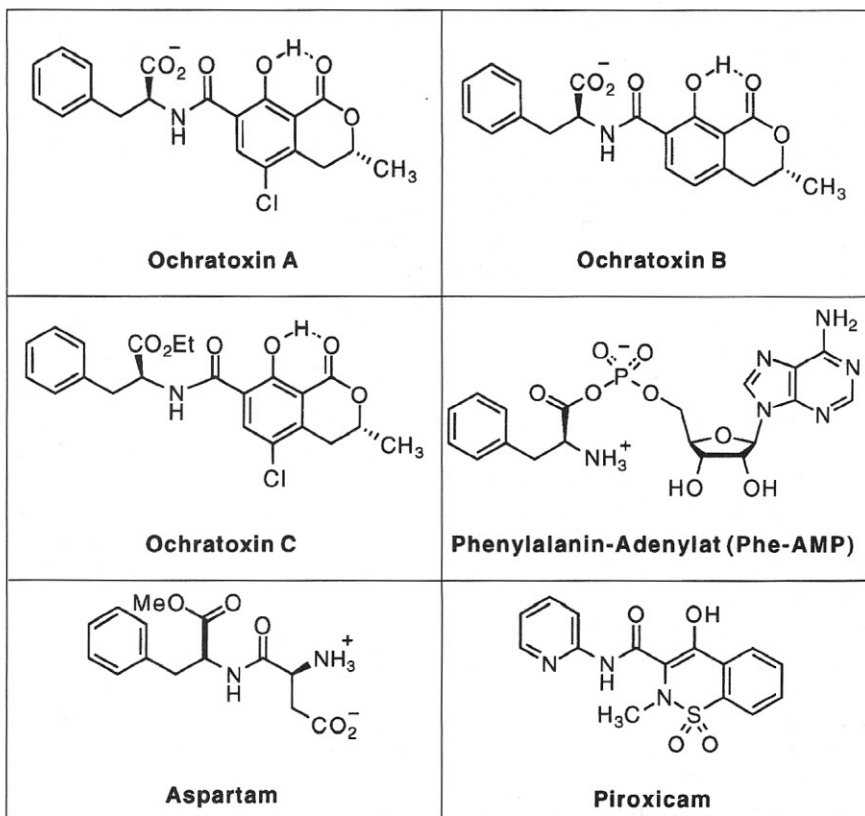


Abbildung 1: Übersicht der Strukturen von Phenylalanin-Adenylat (Phe-AMP), verschiedener Ochrattoxine, Aspartam und Piroxicam

derung in der Konformation des freien Enzyms zu erwarten ist oder – wie bei OcA – Unsicherheit über das Ausmaß des sog. *induced fit* besteht.

In vivo bindet OcA bevorzugt an Serumalbumin – ein Plasmaprotein, das unter anderem für den Transport schwer löslicher endogener Substanzen (wie z.B. Bilirubin) zuständig ist – mit entsprechender Auswirkung auf seine Toxikokinetik (verlängerte Retentionszeit). Eine Antagonisierung dieses Effekts würde zu einer erhöhten Eliminationsrate führen und könnte dabei alle von OcA ausgehenden toxischen Effekte reduzieren (Baudrimont et al., 1995). Dieser Effekt wurde an Mäusen mit Albuminmangel nachgewiesen (Kumagai, 1985).

Im zweiten Teil berichten wir daher über die Simulationen der Wechselwirkungen von OcA mit dem Transportprotein Serumalbumin. Obschon dieses Protein im Gegensatz zu Phenylalanin-t-RNA-Synthetase ($\alpha 2\beta 2$ -Tetramer) ein Monomer ist, ist die Anzahl der möglichen Bindungsmodi gleichwohl sehr groß, denn Serumalbumin verfügt über zwei Bindungsstellen für negativ geladene, kleine organische

Moleküle, zwei für langkettige Fettsäuren sowie zwei für Metallionen (Carter and Ho, 1994).

2 Material und Methoden

Die dreidimensionalen Strukturen von Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (Goldgur et al., 1995) und Serumalbumin (Carter and Ho, 1994) wurden von der *Brookhaven Protein Data Bank* (www.pdb.bnl.gov) bezogen. Die Wasserstoffpositionen wurden mit *PrGen 2.1* (Zbinden et al., 1998) berechnet, und das gesamte Protein wurde anschließend mittels *MacroModel 5.0* (Mohamadi et al., 1990) unter Verwendung des *AMBER*-Kraftfeldes (Weiner et al., 1984) in wässriger Lösung optimiert. Die räumlichen Strukturen von Phe-AMP und OcA wurden mit *MacroModel* erzeugt und optimiert. Die elektrostatische Ladungsverteilung von Phe-AMP und OcA wurde mit *MOPAC 6.0* (MNDO/ESP-Ansatz, Stewart, 1990) berechnet. Die Konformersuche wurde ebenfalls mit *MacroModel* ausgeführt, wobei sämtliche Strukturen innerhalb 25 kJ/Mol des energetisch tief-

sten Konformers für die weiteren Simulationen berücksichtigt wurden.

Für das Enzym Phenylalanin-t-RNA-Synthetase wurde zunächst das natürliche Substrat Phe-AMP eingedockt (Vedani und Zbinden, 1997) und energetisch optimiert. Stereochemisch mögliche Bindungsmodi für OcA wurden mittels interaktivem Docking und Monte-Carlo-Algorithmen gesucht und aus der Protein-OcA-Wechselwirkung die Bindungsaffinität abgeschätzt (vgl. Zbinden et al., 1998).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Phenylalanin-t-RNA-Synthetase

In einem ersten Schritt haben wir OcA analog zu Phe-AMP in die aktive Stelle eingedockt. Um ein vernünftiges Wechselwirkungsmuster zu erhalten, mußte für einige Seitenketten von Aminosäuren des Enzyms eine andere Konformation (Faltung) gefunden werden. Wir haben dazu die *Ponder-Richards rotamer library* verwendet, die für alle Aminosäuren die experimentell am häufigsten beobachteten Seitenkettenkonformere enthält (Ponder and Richards, 1987). Danach wurde der Enzym-Inhibitor-Komplex mit *Macro-Model* in Lösung energetisch optimiert. Das resultierende Bindungsmuster ist in Abbildung 2 gezeigt.

Um bevorzugt an einen Rezeptor binden zu können, muß ein Wirkstoff (Sub-

strat oder Inhibitor) nicht nur seine Wasserstoffbrücken absättigen können – diese kompensieren ja lediglich für den Verlust der Wasserhülle im ungebundenen Zustand –, sondern insbesondere auch seine hydrophoben Gruppen in lösungsmittelunzugängliche Taschen oder Einbuchtungen der aktiven Stelle plazieren. Vergleicht man nun die Position des Phenylrings in OcA mit demjenigen in Phe-AMP, stellt man fest, daß er bei OcA nicht besonders tief in die entsprechende hydrophobe Tasche binden kann. Dies ist eine Folge des Unterschiedes in der Topologie der beiden Moleküle. Als Resultat ergibt unsere Rechnung, daß OcA in dieser, dem Phe-AMP analogen Bindungsweise, gar nicht an das Enzym binden würde ($\Delta G^\circ > 0.0 \Rightarrow K > 1.0$). An dieser Stelle ist anzumerken, daß auf Molekülmechaniksimulationen basierende Abschätzungen der Bindungsaffinität zurückhaltend interpretiert werden sollten. Entsprechende Moleküldynamikstudien sind demnächst abgeschlossen und werden anderswo veröffentlicht (McMasters und Vedani, in Vorbereitung). Nichtsdestotrotz dürften diese Werte nicht allzu realitätsfremd sein, was mit der Berechnung der Affinität eines Inhibitors – durch einen Äther ersetzte Esterfunktion in Phe-AMP – belegt werden konnte ($K = 5.5 \cdot 10^{-9}$ M). Ein zweiter Bindungsmodus sieht eine inverse Bindungsweise vor, d.h. der Isocumaranteil von OcA bindet in die Phenyl-

alaninbindungstasche (Vedani und Zbinden, 1997). Diese Bindungsart erlaubt eine etwas andere Faltung des OcA und verlangt vom Enzym eine kleinere Konformationsänderung, was insgesamt in einer millimolaren Bindungsaffinität resultiert ($K = 2.0 \cdot 10^{-3}$ M). Diese abgeschätzte Affinität stimmt auch mit neueren experimentellen Werten überein (Roth et al., 1993).

Eine solche Voraussagekraft ist zwar eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für die Abstützung eines Mechanismus. Es wäre im weiteren erforderlich, mit der Beobachtung kompatibel zu sein, daß AspartamTM (Methylester des Dipeptides „Asp-Phe“, ein künstlicher Süßstoff; Abb. 1), die toxischen Wirkungen von OcA zu reduzieren vermag (Creppey et al., 1995; Baudrimont et al., 1997). Dies ist aber in beiden Fällen nicht gegeben, denn um OcA kompetitiv zu verdrängen, müßte Aspartam an dieselbe Stelle wie OcA binden, was wiederum das natürliche Substrat Phe-AMP hemmen würde. Wir haben daher nach einer alternativen Bindungsstelle für OcA und Aspartam gesucht und in der Nähe der Öffnung der aktiven Stelle eine größere seitliche Ausbuchtung gefunden, die – relativ reich an elektrische geladenen Aminosäuren – eine Bindungsmöglichkeit bieten würde. Aspartam würde sehr stark an diese Stelle binden ($K = 2.9 \cdot 10^{-9}$ M), OcA aber wiederum lediglich im millimolaren Bereich

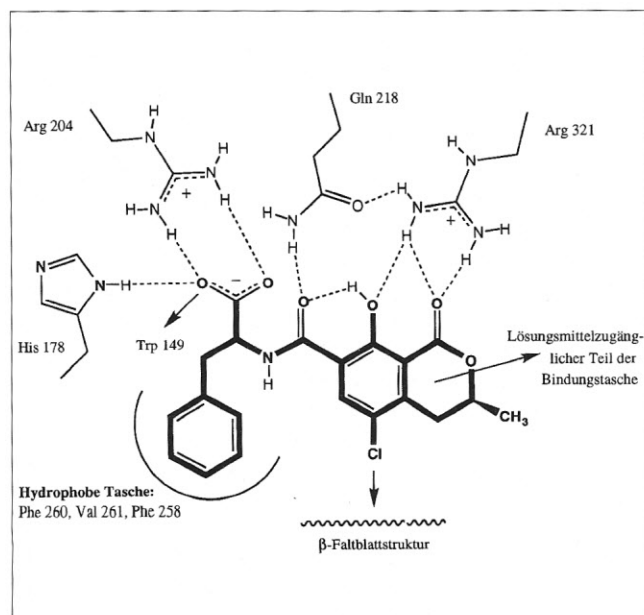


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindungsweise von Ochratoxin A im Enzym Phenylalanin-t-RNA-Synthetase

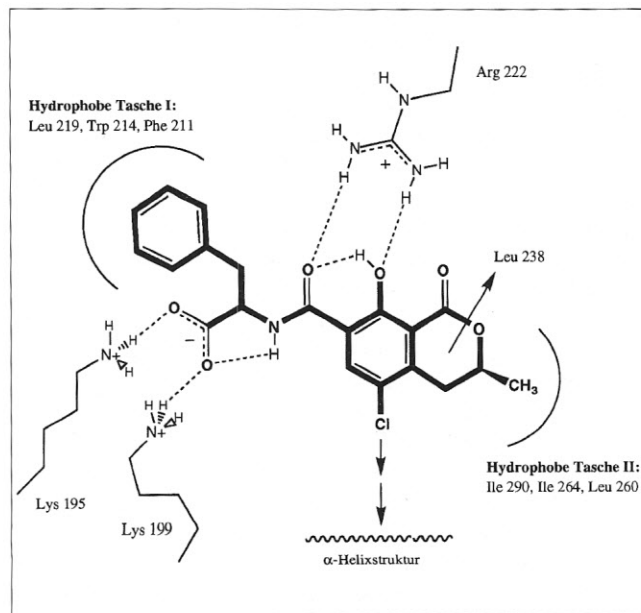


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bindungsweise von Ochratoxin A im Transportprotein Serumalbumin

($K=1.0 \cdot 10^{-3}$ M). Obschon die Moleküldynamikstudien noch nicht ganz abgeschlossen sind, läßt sich vermuten, daß die kompetitive Hemmung von Phenylalanin-t-RNA-Synthetase kaum für die starke Toxizität von Oca verantwortlich ist, was in Einklang mit experimentellen Befunden steht (Roth et al., 1993).

3.2 Serumalbumin

In einer ersten Phase haben wir die Bindung von Oca an den *warfarin binding site* – eine der beiden Bindungsstellen für kleine organische Moleküle – in menschlichem Serumalbumin simuliert. Es wird vermutet, daß der Wirkstoff Piroxicam (ein NSAID), der die Retentionszeit und damit die toxischen Wirkungen von Oca zu reduzieren vermag (Baudrimont et al., 1995), an dieselbe Stelle am Rezeptor bindet. Die Wasserstoffbrücken von Oca werden im Vergleich zur Bindung an Phenylalanin-t-RNA-Synthetase in vergleichbarer Weise (Intensität) abgesättigt; hingegen sind der Phenylring und die Isocumaringruppe im Serumalbumin besser in hydrophobe Taschen eingebettet (Abb. 3), was die höhere Bindungsaffinität erklären könnte.

Ließe sich eine Bindungsstärke im μ M Bereich mittels Moleküldynamikstudien quantifizieren, bestünde ein erster Ansatz, ohne Tierversuche einen potenten Ochrotoxin-Antagonisten in der Modifikation von Piroxicam zu entwickeln. Piroxicam selber kann nicht als Gegengift eingesetzt werden, weil bei der erforderlichen Dosierung starke Nebenwirkungen auftreten. Es sind aber auch durchaus *de novo design* Ansätze denkbar, wo von der Topologie der *warfarin binding site* ausgegangen wird. Günstig erscheint das "Aktivitätsfenster", d.h. der Bereich zwischen der Affinität der endogenen Liganden (z.B. Bilirubin, $K=20\mu$ M) und Oca ($K=20$ mM), in der der Antagonist binden muß. Eine niedrige intrinsische Bioaktivität sowie eine vergleichsweise lange Halbwertszeit und eine niedrige metabolische Rate bleiben dabei wünschenswert.

Danksagung

Dieses Projekt wurde durch die großzügige finanzielle Unterstützung der Stiftung Forschung 3R, CH-Münsingen/BE (Projekt 55/96) ermöglicht.

Literatur

- Baudrimont, I., Betbeder, A. M. and Creppy, E. E. (1997). Reduction of the ochratoxin A induced cytotoxicity in Vero cells by aspartame. *Arch. Toxicol.* 71, 290-298.
- Baudrimont, I., Murn, M., Betbeder, A. M., Guilcher, J. and Creppy, E. E. (1995). Effect of piroxicam on the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Toxicology* 95, 147-154.
- Baumann, U. und Zimmerli, B. (1988). Einfache Ochrotoxin-A-Bestimmung in Lebensmitteln. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 79, 151-158.
- Boorman, G. A. (1989). Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. *NTP Tech. Rep.* 358.
- Bozic, Z., Duancic, V., Belicza, M., Kraus, O. and Skljajarov, I. (1995). Balcan endemic nephropathy: still a mysterious disease. *Eur. J. Epidemiol.* 11, 235-238.
- Bruinink, A. and Sidler, C. (1997). The neurotoxic effects of ochratoxin A are reduced by protein binding but are not affected by L-phenylalanine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146, 173-197.
- Carter, D. C. and Ho, J. X. (1994). Structure of serum albumin. *Adv. Protein. Chem.* 45, 153-203.
- Creppy, E. E., Baudrimont, I. and Betbeder, A. M. (1995). Prevention of nephrotoxicity of Ochratoxin A, a food contaminant. *Toxicol. Lett.* 82, 869-77.
- Creppy, E. E., Kern, D., Steyn, P. S., Vieggar, R., Rösenthaller, 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.
- Goldgur, Y., Mosyak, L., Reshetnikova, L., Ankilova, V., Larik, O., Khodyreva, S. and Safro, M. (1997). The crystal structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with cognate tRNA^{Phe}. *Structure*, 5, 59-68.
- Kumagai, S. (1985). Ochrotoxin A: Plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food Chem. Toxicol.* 23, 941-943.
- Marquardt, R. R. and Fröhlich, A. A. (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70, 3968-3988.
- Mohamadi, F., Richards, N. G. J., Guida, W. C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T. and Still, W. C. (1990). MacroModel - An integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J. Comput. Chem.* 11, 440-467.
- Nikolov, I. G., Petkova-Bocharova, D., Castegnaro, M., Pfohl-Leskowicz, A., Gill, C., Day, N. and Chernozemsky, I. N. (1996) Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an area with Balkan endemic nephropathy. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 15, 201-207.
- Ponder, J. W. und Richards, F. M. (1987). Tertiary Templates for Proteins. *J. Mol. Biol.*, 193, 775-791.
- Stegen, G. van de, Jorisson, U., Pittet, A., Saccon, M., Steiner, W., Vincenzi, M., Winkler, M., Zapp, J. and Schlatter, C. (1997). Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A. *Food. Addit. Contam.* 14, 211-216.
- Stewart, J. J. P. (1990). MOPAC - a semi-empirical molecular orbital program. *J. Comp.-Aided Molec. Design* 4, 1-105. (Distributed by QCPE, University of Indiana, Bloomington, Indiana, USA).
- Roth, A., Eriani, G., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1993). Kinetic properties of pure overproduced *Bacillus subtilis* phenylalanyl-tRNA synthetase do not favour its inhibition by ochratoxin A. *FEBS Lett.* 326, 87-91.
- Vedani, A., und Zbinden, P. (1997). Zielproteine und Mechanismen der Ochrotoxinintoxizität. *ALTEX* 14, 155-164.
- Weiner, S. J., Kollmann, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. Jr., and Weiner, P. (1984). A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 765-784.
- Zbinden, P., Dobler, M., Folkers, G. und Vedani, A. (1998). PrGen: Pseudoreceptor modeling using receptor-mediated ligand alignment and pharmacophore equilibration. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 17, 122-130.

Korrespondenzadresse

Dr. Daniel R. McMASTERS
Biografik-Labor 3R
Missionsstrasse 60
CH-4055 Basel, Schweiz
Tel: +41-61-321-0533, Fax: +41-61-321-0540
E-Mail: biograf@dial.eunet.ch