

Zielproteine und Mechanismen der Ochratoxintoxizität – Ein Beitrag zur Identifikation potentieller Ochratoxinantagonisten

Angelo Vedani und Peter Zbinden

Biografik-Labor 3R, CH-Basel

Zusammenfassung

Ochratoxine sind Mykotoxine, die von Schimmelpilzen auf Getreide, Erdnüssen und Gemüse freigesetzt werden. In toxikologischen Untersuchungen zeigt Ochratoxin A eine nephrotoxische, genotoxische, teratogene, kanzerogene und immunsuppressive Wirkung. Erhöhte Blutwerte bei Menschen lassen einen Zusammenhang mit einer auf dem Balkan gehäuft auftretenden Nierenerkrankung (Balcan Endemic Nephropathy) vermuten. Für die Toxizität von Ochratoxin A wird insbesondere dessen kompetitive Hemmung von Phenylalanin-metabolisierenden Enzymen verantwortlich gemacht. Anhand der dreidimensionalen Struktur von Phenylalanin-t-RNA-Synthetase wird die Wechselwirkungen dieses Enzyms mit Ochratoxinen sowie Aspartam untersucht. Aspartam kann in Tierversuchen die toxischen Effekte von Ochratoxin A weitgehend aufheben. Die Topologie der Bindungsstelle der Phenylalanin-t-RNA-Synthetase läßt vermuten, daß die Bindungsaffinität von Aspartam verbessert werden kann. Antagonisierende Substanzen zu Toxinen können nur bei bekanntem Mechanismus systematisch gesucht werden. Mit Hilfe einer Rezeptorstruktur können die Bindungseigenschaften solcher Wirkstoffe mit computergestützten Verfahren gezielt gefunden und optimiert werden. Bei der Suche in vivo, müßte eine große Anzahl von Tieren besonders belastenden Experimenten ausgesetzt werden. Bei der Substanzfindung via Computer müssen nur die aussichtsreichsten Kandidaten einer biologischen Aktivitätsprüfung zugeführt werden, was zu einer signifikanten Reduktion der in vivo zu testenden Substanzen führen kann. Inwieweit die antagonistische Wirkung bei chronischen Ochratoxinbelastungen beim Menschen realisierbar ist, muß Gegenstand klinischer Studien sein.

Summary: Target proteins and mechanisms of ochratoxin toxicity. A contribution to the identification of potential ochratoxin antagonists

Ochratoxins are mycotoxins released by moulds on grain, peanuts and vegetables. Toxicological investigations have shown that ochratoxin A displays nephrotoxic, genotoxic, teratogenic, cancerogenic and immunosuppressive effects. Increased blood levels observed in humans would seem to suggest a link to a kidney disease (Balcan Endemic Nephropathy) frequently observed in the Balkan countries. The adverse effects of ochratoxin A are mainly associated with its impact on phenylalanine-metabolizing enzymes. Based on the three-dimensional structure of phenylalanine-t-RNA-synthetase, its interactions with ochratoxins are analyzed as well as with Aspartam. In animal models, Aspartam has been shown to almost fully prevent toxic effects of ochratoxin A. The topology of the binding site of phenylalanine-t-RNA-synthetase would seem to be supportive towards a few affinity-enhancing modifications of the Aspartame molecule.

A known molecular mechanism is a prerequisite for a systematic search of antagonizing substances for toxins. Based on a receptor structure, binding properties of such drugs can be identified and optimized using computer-aided drug design. Subsequently, only the most potent candidate structures must be subjected to a determination of their biological activity, which can lead to a significant reduction of substances to be tested in vivo. Such experiments are particularly stressful as the animals must be intoxicated beforehand.

The extent of an antagonistic impact on humans suffering from a chronic ochratoxin A intoxication must be subject of clinical studies.

Keywords: toxicology modeling, mechanisms of ochratoxin toxicity, 3D-QSAR, receptor-mediated toxicity.

1 Einleitung

1.1 Ochratoxintoxizität und Mechanismen

Ochratoxine (vgl. Abbildung 1) sind Giftstoffe, die von *Aspergillus alutaceus* und anderen Schimmelpilzen auf Getreide, Erdnüssen und Gemüse produziert und freigesetzt werden. Untersuchungen von Bau-

mann und Zimmerli (1988) haben gezeigt, daß 2-40% der untersuchten Lebensmittel mit Ochratoxin A (7-carboxyl-5-chloro-8-hydroxyl-3,4-dihydro-3R-methylisocoumarin-7-I.-phenyl-alanin) verunreinigt sind. Die Ochratoxinkontamination von Lebensmitteln ist kein lokales, sondern vielmehr ein globales Problem (vgl. van de Steen et al., 1997; Marquardt and Frohlich, 1992; Omar et al., 1990; Steyn, 1984; Cole and

Cox, 1981 sowie Chu, 1974). Relativ hohe Konzentrationen wurden im menschlichen Blutserum und in der Brustmilch gefunden (Hald, 1991; Breitholz-Emanuelsson et al., 1993). Ochratoxin A wird nur langsam aus dem Körper eliminiert (Li et al., 1997). Auf Grund der toxikologischen Befunde aus Tierversuchen darf angenommen werden, daß Ochratoxin A beim Menschen, bei genügend hoher Dosierung, eine nephrotoxi-

sche (Gekle and Silbernagl, 1996), genotoxische (Degen et al., 1997; Nikolov et al., 1996; Bose and Sinha, 1994), krebserzeugende und möglicherweise auch teratogene (Bruinink et al., 1997) Wirkung haben kann. Zielgewebe in der pränatalen Phase sind hauptsächlich Augen und Nervensystem (Tamaru et al., 1988; Shirai, 1991; Miki et al., 1994). Die im Blut von Bewohnern aus Balkanländern gefundenen erhöhten Ochratoxinwerte sowie epidemiologische Befunde weisen darauf hin, daß mit größter Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang mit der *Balkan Endemic Nephropathy* – einem chronischen Nierenversagen – besteht (Boorman, 1989; Nikolov et al.,

1996; Bozic et al., 1995). Die toxischen Wirkungen von Ochratoxin A und verwandten Substanzen können mehreren direkten (d.h. rezeptorgekoppelten) und indirekten Effekten zugeordnet werden (Marquardt and Frohlich, 1992). Als primäre Ursachen werden Wechselwirkungen mit Phenylalanin-metabolisierenden Enzymen, eine erhöhte Lipidperoxidation und Störung der mitochondrialen Funktionen postuliert.

Ochratoxin A beeinflusst DNA, RNA und die Proteinsynthese in verschiedenen Organismen (Creppy et al., 1983, 1986; Meisner and Krogh, 1986; Meisner and Polsinelly, 1986), vermutlich aufgrund des Phenylalaninfragmentes im Ochrato-

xinmolekül (vgl. Abbildung 1a,b). Wesentlichster Faktor der Ochratoxintoxizität scheint die Hemmung des Enzyms Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (Creppy et al., 1983) und somit der Proteinsynthese zu sein. Eine neuere *in vitro* Studie untersuchte das neurotoxische Potential von Ochratoxinen in drei Zelltypen aus dem Gehirn von embryonalen Hühnchen (Bruinink und Sidler, 1997). Ochratoxin A hemmt auch das Enzym Phenylalanin Hydroxylase (vgl. Creppy et al., 1984; Dhondt et al., 1980). Im Gegensatz hierzu zeigt Ochratoxin- α (5-chloro-7-Melleinkarbonsäure, vgl. Abbildung 1f) keine hemmende Wirkung, was dahingehend interpretiert wird, daß der Isocumarinteil des Moleküls für die Bindung an das Enzym von untergeordneter Bedeutung ist.

Die zweite Wirkungsweise von Ochratoxin A wurde von Rahimtula und Mitarbeitern postuliert (1988): Sie zeigten, daß Ochratoxin A die Fettoxidation *in vivo* fördert, wenn das Toxin Leber- oder Nierenmikrosomen beigelegt wird. *In vitro* stimuliert Ochratoxin A sowohl die NADPH-abhängige Mikrosomen- als auch die Vitamin C-abhängige Fettoxidation. Hasinoff et al. (1990) zeigten, daß in Anwesenheit des NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase Systems – via Eisen-Ochratoxin A-Komplex – das extrem reaktive und giftige Hydroxylradikal entsteht, und machten dieses für einen Teil der Ochratoxin A-Toxizität verantwortlich. Die Induktion von freien, reaktiven Radikalen konnte in Hepatozyten, Mitochondrien und Mikrosomen nachgewiesen werden (Hoehler et al., 1997).

Ein dritter Mechanismus der Ochratoxin A-Toxizität wird mit seiner Wirkung auf die mitochondriale ATP-Produktion in Verbindung gebracht: Es wurde beobachtet, daß Ochratoxin A *in vitro* die Zellatmung von Leberzellenmitochondrien reduziert, weil es Transportproteine der inneren mitochondrialen Membran kompetitiv hemmt (Meisner and Chan, 1974; Wei et al., 1985). Andere Untersuchungen an mitochondrialen Präparaten zeigten, daß die mitochondriale Aufnahme von Ochratoxin A einen Energie-verbrauchenden Prozeß darstellt, der zu einer Verminderung von intra-mitochondrialem ATP führt, und daß Ochratoxin A den intra-mitochondrialen Phosphattransport behindert, was einen Zerfall der Mitochondrien nach sich zieht (Meisner, 1976).

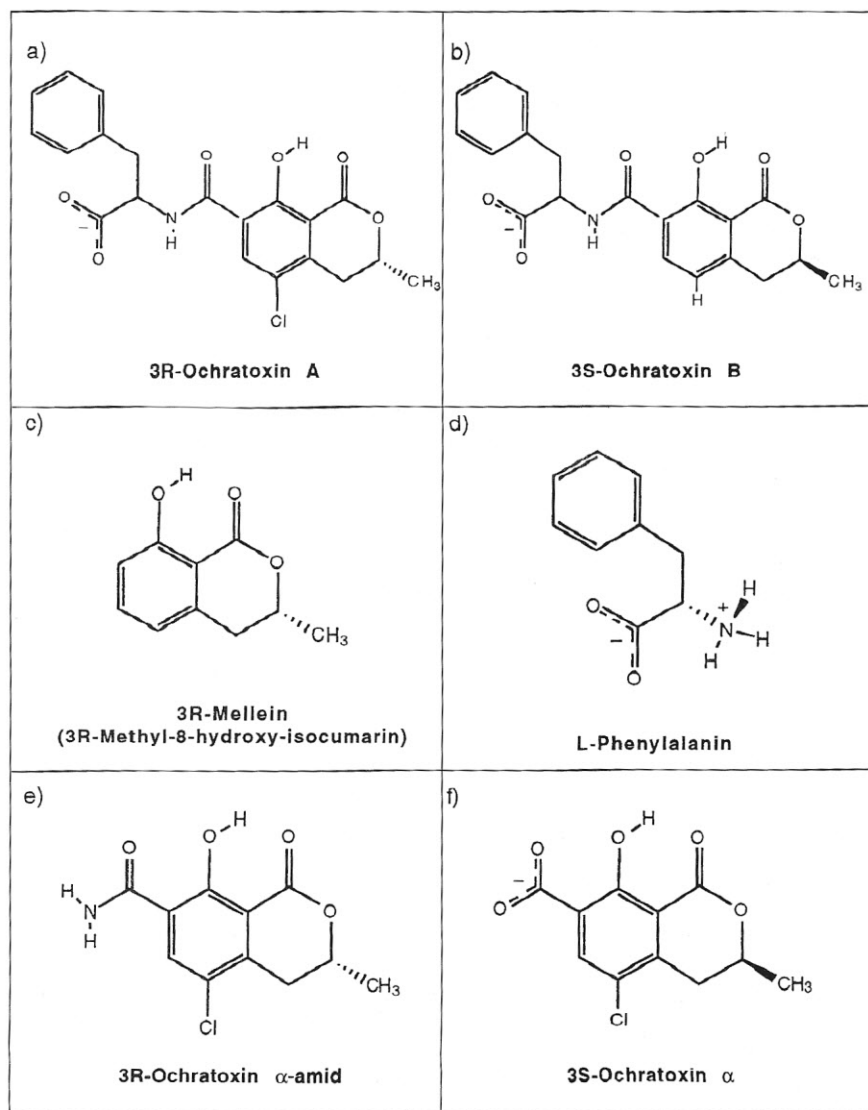


Abbildung 1: Ausgewählte Vertreter der Ochratoxinfamilie und Phenylalanin:
a) 3R-Ochratoxin A, b.) 3S-Ochratoxin B, c) 3R-Mellein (3R-Methyl-8-hydroxy-isocoumarin), d) L-Phenylalanin, e) 3R-Ochratoxin- α -amid, f) 3S-Ochratoxin α .

Xiao und Mitarbeiter (Xiao et al., 1996a,b) identifizierten weitere Zielproteine der Ochratoxintoxizität. Ihnen gelang die Isolierung von Ochratoxin-bindenden Proteinen aus Kälberhirn, Schweineiere und einem zytosolischen Leberextrakt. Während das Protein, das aus Hirn- und Nierenmasse isoliert wurde, ein molekulares Gewicht von 30 ± 5 kD aufweist und daher in der Größe mit Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (39kD) vergleichbar ist, wies das aus Leberextrakt isolierte Protein ein molekulares Gewicht von 55 ± 5 kD auf. Dies entspricht grob dem doppelten Molekulargewicht und könnte auf ein dimeres Protein (Phenylalanin-t-RNA-Synthetase ist als Tetramer bioaktiv) hinweisen. Zusätzlich konnten sie ein kovalent gebundenes Ochratoxinaddukt isolieren. Xiao et al. untersuchten auch die Wirkungen, die von Ochratoxinmetaboliten ausgehen können (1996b). Die Rolle von Ochratoxinmetaboliten – hierbei handelt es sich hauptsächlich um 4R-Hydroxyl-Ochratoxin A und 4S-Hydroxyl-Ochratoxin A – wurde auch bezüglich der Induktion von Cytochrom P450 untersucht (Omar et al., 1996).

Weitere Enzyme, von denen gegenwärtig bekannt ist, daß sie durch Ochratoxin A inhibiert werden, schließen Succinat Dehydrogenase und Cytochrom C Oxidase (Wei et al., 1985), aber auch Carboxipeptidase (Parker et al., 1982) ein. Aus den Ergebnissen mit Zellkulturen kann angenommen werden, daß für die toxische Wirkung von Ochratoxin A keine metabolische Aktivierung notwendig ist.

1.2 Computersimulationen von toxikologischen Phänomenen

Bis heute konnten nur einige wenige toxikologische Phänomene auf rezeptorgekoppelte Mechanismen zurückgeführt werden. Diese schließen den *Aryl hydrocarbon* (Ah) Rezeptor (siehe z.B. Safe and Krishnan, 1995) und gewisse Aspekte der Ochratoxintoxizität ein. Die Struktur des Ah-Rezeptors konnte jedoch bisher nicht in atomarer Auflösung bestimmt werden. Dagegen wurde ein dreidimensionales Modell der Bindungsstelle erstellt und zur Voraussage der Bindungsstärke (und damit, indirekt, der Toxizität) einer Serie von 2,3,4,5-Tetrachlorbiphenylenen verwendet (Vedani and Zbinden, 1996). Die von Ochratoxinen ausgehenden fatalen Wirkungen

können zu einem großen Teil mit der Hemmung von Enzymen, die im Phenylalanin-metabolismus eingebunden sind, erklärt werden. Dazu gehören z.B. Phenylalanin-t-RNA-Synthetase, Phenylalanin-Transferase und Phenylalanin-Hydroxylase. Kinetische Messungen (vgl. z.B. Creppy et al., 1983) belegen die kompetitiven Mechanismen der Enzym-Hemmung. Kürzlich wurde nun die dreidimensionale Struktur der Phenylalanin-t-RNA-Synthetase gelöst (Goldgur et al., 1997), was erlaubt, die Mechanismen der Ochratoxintoxizität auf molekularer Ebene noch genauer zu verstehen.

Voraussetzungen für die rechnerische Simulation eines rezeptorgekoppelten toxikologischen Phänomens sind die dreidimensionale Struktur (experimentell oder Modell) und ein mathematisches Konzept zur Ableitung von freien Bindungsenergien ΔG° . Das toxikologische Potential einer Substanz kann aber auch aus der molekularen Topologie des Wirkstoffes abgeleitet werden, ohne die Wechselwirkungen mit dem Rezeptor zu analysieren (vgl. Andersen et al., 1992; Sanderson and Earnshaw, 1991). Wenn keine experimentelle Struktur zur Verfügung steht, kann der Zielrezeptor (*Modeling by Homology*, vgl. Sali et al., 1990) oder seine Bindungsstelle (Pseudorezeptormodeling, vgl. Snyder et al., 1993; Vedani et al., 1995) modelliert werden. Beim Homologiemodeling wird die Struktur des gesuchten Rezeptors aus der experimentellen Struktur eines nahe verwandten Proteins (des Homologen) und den beiden Primärsequenzen abgeleitet (vgl. Blundell et al., 1987). Pseudorezeptormodeling erlaubt die Konstruktion eines dreidimensionalen Surrogates für die Bindungsstelle des gewünschten Rezeptors (vgl. Snyder et al., 1993; Walters and Hinds, 1994; Hahn and Rogers, 1995; Vedani et al. 1995; Zbinden et al., eingesandt). Die Philosophie des Pseudorezeptorkonzepts besteht darin, die verwendeten Wirkstoffe in genügend Wechselwirkungen mit dem Pseudorezeptor einzubinden, um so die Verhältnisse am wahren Rezeptor zu simulieren. Während für Simulationen an der Phenylalanin-t-RNA-Synthetase die experimentelle Struktur (Goldberg et al., 1997) des freien und komplexierten Enzyms verwendet werden kann, müssen entsprechende Studien an der Phenylalanin-Transferase und Phenylalanin-Hydroxylase von Homolo-

giemodellen bzw. Rezeptorsurrogaten ausgehen.

Zur Bestimmung von relativen freien Bindungsenergien ΔG° und damit der Abschätzung von Bindungsaffinitäten (k ; $\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln k$) aus dreidimensionalen Wirkstoff-Rezeptorkomplexen wurden verschiedenste Ansätze hergeleitet (vgl. z.B. Blaney et al., 1982; Krystek et al., 1993; Böhm, 1994; Holloway et al., 1995; Vedani et al., 1995). Unser Ansatz leitet sich von demjenigen von Blaney ab und enthält vier Terme: die direkte Wechselwirkungsenergie mit dem Rezeptor, die Desolvation des Wirkstoffes (er bindet ja aus einer „wässrigen Umgebung“ an eine meist hydrophobe Rezeptorkavität), der Verlust von entropischen Freiheitsgraden (eingeschränkte Bewegungsfreiheit innerhalb der Rezeptorkavität) und die innere Energie des Wirkstoffes:

$$E_{\text{Bindung}} \approx E_{\text{Ligand-Rezeptor}} - T \Delta S_{\text{Bindung}} - \Delta G_{\text{Solvation, Ligand}} + \Delta E_{\text{Ligand-intern}}$$

Freie Bindungsenergien der verschiedenen Wirkstoffen, ΔG° , werden anhand einer linearen Regression zwischen $\Delta G^\circ_{\text{exp}}$ und E_{Bindung} ermittelt:

$$\Delta G^\circ_{\text{pred}} = |a| \cdot E_{\text{Bindung}} + b$$

2 Bindungsstellenmodell für einen Ochratoxinrezeptor

Um aus kinetischen Studien (Creppy et al., 1983) und Messungen an Zelllinien (Bruinink et al., im Druck) abgeleitete Mechanismen auf atomarer Ebene strukturell zu überprüfen, haben wir ein dreidimensionales, peptidisches Modell der Bindungsstelle eines hypothetischen Ochratoxinrezeptors entworfen (Vedani and Bruinink, 1996). In diesem Modell wird die hohe Bindungsaffinität von Ochratoxin A durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk erklärt, das weder zu Mellein noch Phenylalanin komplementär ist. Diese beiden Substanzen binden denn auch nur sehr schwach an das Surrogat und lassen bei vergleichbaren Konzentrationen keine Toxizität erwarten. Dies ist mit *in vitro* Daten in Übereinstimmung.

Interessant ist natürlich ein Vergleich mit der experimentellen Struktur von Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (Goldgur et al., 1997), die erst nachträglich publiziert wurde. Unser Bindungsstellenmodell ent-

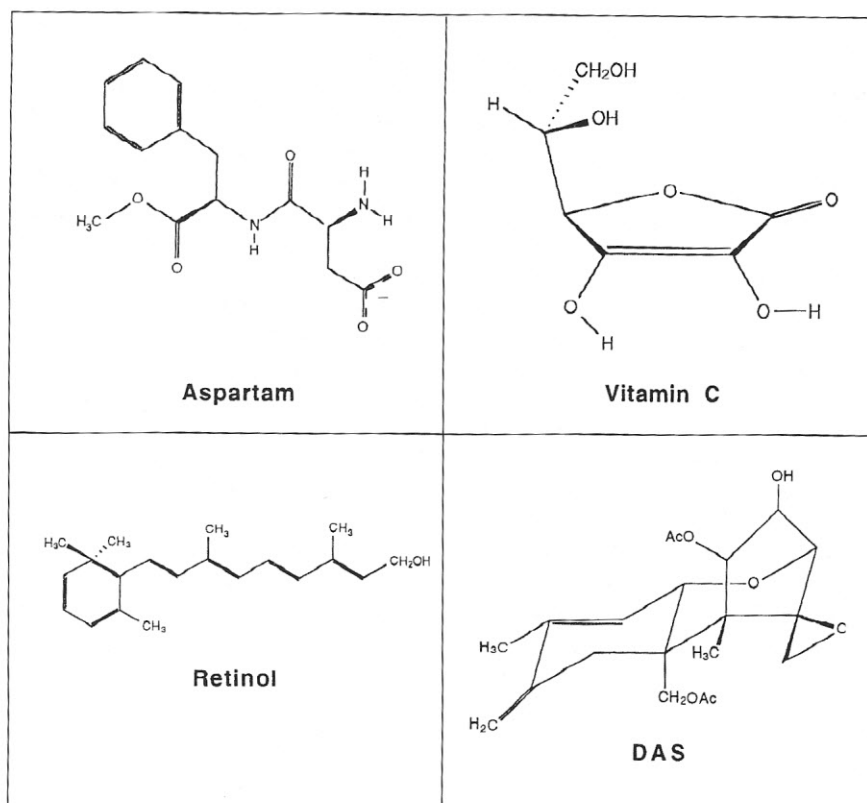


Abbildung 2: Potentielle Ochratoxinantagonisten (vgl. Text).

hält ebenso wie die experimentelle Struktur eine hydrophobe Tasche, welche den Phenylalaninring bindet. Von besonderem Interesse sind die Wechselwirkungen der Ammonium- und Phosphatgruppe (Phenylalanin-AMP) und des Carboxylates bzw. der Amidfunktion (Ochratoxin A) mit dem Enzym: Das Bindungsstellenmodell hat hier ein Arg postuliert, welches auch in der experimentellen Struktur auftritt (Arg 204). Dagegen wird die Amidfunktion im Surrogat nur von einem Gln koordiniert, während sie in der wahren Struktur an Glu 220 und – etwas schwächer – an His 178 und Ser 180 gebunden wird. Die Amidgruppe des Ochratoxins (siehe unten) ist im wahren Modell nur intramolekular sowie an einen Wasserkanal gebunden, während im Surrogat eine *oxyanionhole*-ähnliche Struktur postuliert worden war.

3 Phenylalaninmetabolisierende Ochratoxinrezeptoren (Enzyme)

Wirksame Ochratoxinantagonisten müssen hauptsächlich in der Lage sein, die Affinität von Ochratoxin A bei phenylalaninmetabolisierenden Enzymen wie z. B.

Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (vgl. Creppy et al., 1983) kompetitiv zu reduzieren, ohne die Bindung des natürlichen Substrats (L-Phenylalanin-AMP) signifikant zu hemmen. Phenylalanin selbst ist natürlich auch ein „Ochratoxinantagonist“, hat aber die unerwünschte Eigenschaft, bei den notwendigen Dosierungen selbst toxisch zu wirken (Bruinink A., pers. Mitteilung). Andere zum Teil gut wirksame Substanzen, die schon in der Literatur beschrieben worden sind, schließen Aspartam (Reduktion des Nephrotoxizitätspotentials; Creppy et al., 1995), Vitamin C (Reduktion der Genotoxizität; Bose and Sinha, 1994), Retinol (Reduktion der Genotoxizität; Kumari and Sinha, 1994) und Diacetoxyscirpenol (DAS; Kubena et al., 1994) ein (vgl. Abbildung 2).

Während die antagonistische Wirkungsweise von Aspartam bezüglich phenylalaninmetabolisierenden Enzymen offensichtlich ist, entziehen sich Vitamin C, Retinol und Diacetoxyscirpenol (DAS) derzeit einer mechanistischen Erklärung auf molekularer Ebene.

Es ist natürlich unmöglich, in einem einzigen Beitrag alle potentiell mechanisti-

schen Wirkungen von Ochratoxin A abzudecken. Wir möchten uns vielmehr auf die Klasse der phenylalaninmetabolisierenden Enzyme beschränken und unser Augenmerk insbesondere auf die Hemmung von Phenylalanin-t-RNA-Synthetase richten, weil hier auf eine dreidimensionale Struktur zurückgegriffen werden kann (Goldgur et al., 1997). Allerdings wurde die Struktur mit gebundener t-RNA^{Phe} bestimmt und nicht, wie bei der Tyrosyl-t-RNA-Synthetase mit L-Tyrosin-AMP als Substrat (Brick et al., 1989). Aufgrund der Position des 3'-Endes der t-RNA (Ade 76), das ja mit dem Substrat L-Phenylalanin-AMP in Wechselwirkung treten muß, kann die Bindungsstelle des Substrates L-Phenylalanin-AMP in Phenylalanin-t-RNA-Synthetase eindeutig lokalisiert werden. Die Bindungsverhältnisse sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

In Phenylalanin-t-RNA-Synthetase ist die Phenylgruppe des Substrats L-Phenylalanin-AMP in einer aus Phe 258, Phe 260 und Ala 314 gebildeten hydrophoben Tasche eingebettet. Die Ammoniumgruppe ist über drei Wasserstoffbrücken mit Glu 220, His 178 und Ser 180 optimal gebunden. Die Phosphatgruppe bildet eine Salzbrücke mit Arg 204 sowie eine Wasserstoffbrücke mit Trp 149. Die beiden Hydroxylgruppen der Ribose sind an die Proteinhauptkette (Met 148) bzw. über verbrückende Wassermoleküle an das Enzym gebunden. Die Aminogruppe in der 4-Stellung des Adenins, der an einer lösungsmittelzugänglichen Stelle bindet, bildet eine starke Wasserstoffbrücke mit Glu 206.

Interessant erscheint auch ein Vergleich der Bindungsmodi von L-Phenylalanin-AMP in Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (Goldgur et al., 1997; diese Arbeit) und L-Tyrosyl-AMP in Tyrosyl-t-RNA-Synthetase (Brick et al., 1989): Während zur Diskriminierung von L-Tyrosyl-AMP und beispielsweise L-Phenylalanin-AMP in Tyrosyl-t-RNA-Synthetase Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren (Tyr 24, Asp 176) vorhanden sind, ist die entsprechende Bindungstasche in Phenylalanin-t-RNA-Synthetase hauptsächlich aus aromatischen (Phe 258 und 260) und aliphatischen (Ala 314, Val 261) Aminosäuren aufgebaut. L-Tyrosyl-AMP würde räumlich zwar hineinpasse, doch würde der Verlust von Wasserstoffbrücken beim

Übergang von einem wässrigen Medium (Plasma) nicht kompensiert, was in einer niedrigeren Affinität an Phenylalanin-t-RNA-Synthetase resultiert. Die Ammoniumfunktionalität in L-Tyrosyl-AMP wird an Asp 78 und Tyr 109 koordiniert, die Phosphatgruppe aber lediglich an His 48; ansonsten steht sie in Kontakt mit dem Lösungsmittel. Die Hydroxylgruppen der Ribose sind – gegenüber Phenylalanin-t-RNA-Synthetase – stärker gebunden (Gln 192 bzw. Asp 194). Der Adeninring koordiniert in Tyrosyl-t-RNA-Synthetase an die Proteinhauptkette.

In einem nächsten Schritt haben wir untersucht, wie Ochratoxin A an die aktive Stelle von Phenylalanin-t-RNA-Synthetase binden könnte. Da die Inhibierung kompetitiv ist (Creppy et al., 1983), sind wir davon ausgegangen, daß Ochratoxin A an die gleiche Stelle bindet wie das natürliche Substrat Phenylalanin-AMP. Im Analogieschluß würde man zunächst davon ausgehen, daß der Phenylring in Ochratoxin A (vgl. Abbildung 1) in dieselbe hydrophobe Tasche bindet, die auch den Phenylring von Phenylalanin-AMP beherbergt (vgl. Abbildung 3). Eine solche Bindungsweise erscheint zwar plausibel, birgt aber ein fundamentales Problem: Überlagert man die Phenylringe von Phenylalanin und Ochratoxin A, so beanspruchen auch die Ammoniumgruppe des Phenylalanins bzw. die Carboxylgruppe des Ochratoxin A gleiche Halbräume. Aus der experimentellen Struktur (Goldgur et al., 1997) ist ersichtlich, daß die Ammoniumgruppe des Phenylalanins eine Salzbrücke mit Glu 220 bildet; die Aminosäure Glutamat ($pK=1,99$ und $3,90$ für Haupt- und Seitenkettencarboxylat) wird jedoch bei physiologischem pH immer als Anion vorliegen, d.h. eine Carboxylgruppe (des Ochratoxin A) abstoßen. Man könnte daher argumentieren, daß der Phenylring von Ochratoxin A um 180° gedreht in die hydrophobe Tasche bindet; dann aber findet die Carboxylgruppe gar keinen Bindungspartner mehr am Enzym. Dies macht den – zunächst etwas fremd anmutenden – Gedanken verständlicher, daß Ochratoxin A nicht mit dem Phenylring, sondern mit seinem Isocumarinteil in die hydrophobe Tasche bindet. Eine inverse Bindungsart würde vielleicht auch erklären, warum die Toxizität von Ochratoxin bei Zugabe von Mellein (Isocumarin) leicht erhöht wird (Brunink A., persönliche Mitteilung). Wir

haben beide Bindungsmodi (modelliert; von der Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzwerkes her gesehen, ist die inverse Bindungsweise klar favorisiert (Abbildung 4).

Der Isocumarinring von Ochratoxin A ist – wie der Phenylring des natürlichen Substrates L-Phenylalanin-AMP – über hydrophobe und p-p Wechselwirkungen mit Phe 258 und Phe 260 stabilisiert und kann zwei Wasserstoffbrücken ausbilden (Gln 183 und Ser 180). Die (bei physiologischem pH) deprotonierte Carboxylgruppe geht mit Arg 204 eine Salz- und mit Gln 218 eine Wasserstoffbrücke ein. Der Chlorsubstituent wird von Phe 258 und Val 261 stabilisiert. Die Amidcarbonylfunkti-

on hat Kontakt zu einem Wasserkanal; das Amid-Stickstoffatom bildet eine intramolekulare Wasserstoffbrücke mit dem der Hydroxylgruppe in der 8-Stellung des Isocumarinringes. Dieses ausgeprägte Wasserstoffbrückennetzwerk erklärt wohl auch die hohe Affinität von Ochratoxin A.

Die Bindungsweise von Ochratoxin α (nicht toxisch; vgl. Abbildung 1, S.4) und Ochratoxin α -amid (toxisch; vgl. Abbildung 1) unterscheidet sich bezüglich der Fähigkeit, sich ins Wasserstoffbrückennetzwerk des Enzyms einzubinden. Dies ist leicht aus Abbildung 4 (mit Ochratoxin A als Inhibitor) ableitbar: Der Isocumarinring bindet analog wie in Ochratoxin A; die Amid/Carboxylgruppen haben

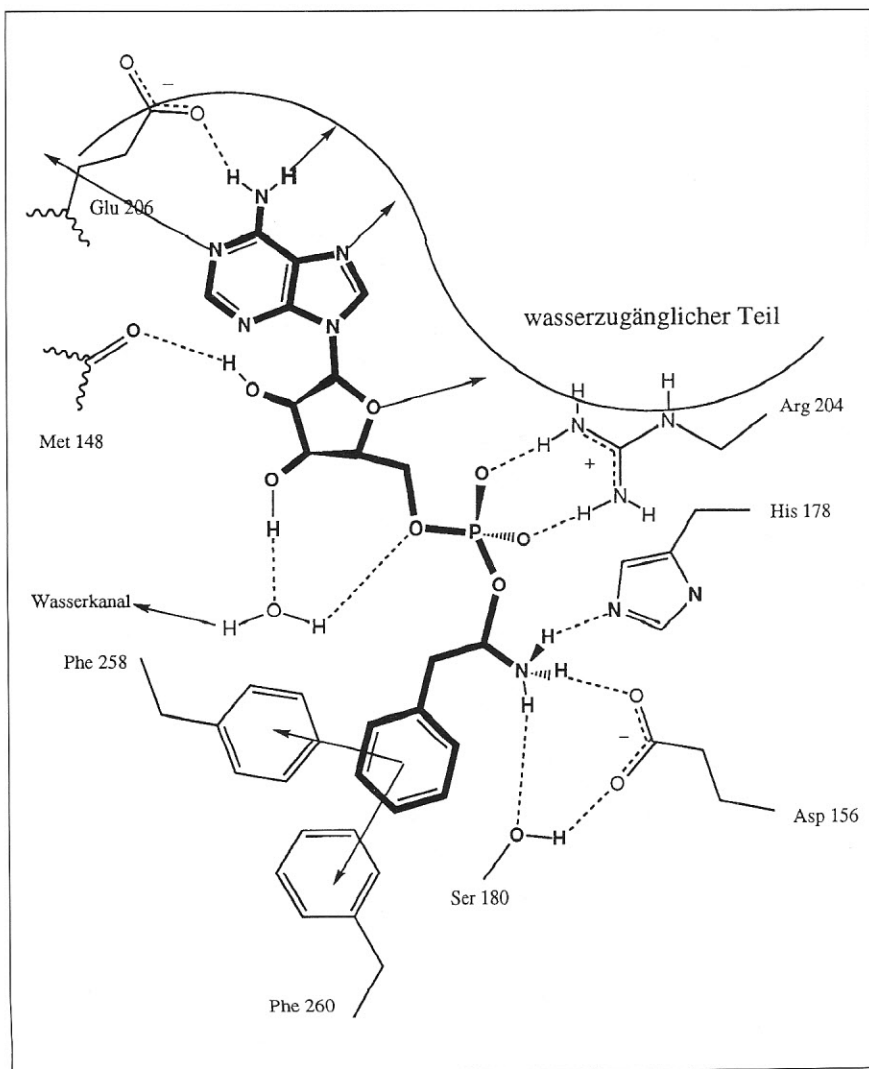


Abbildung 3: Aktive Stelle des Enzyms Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (Goldgur et al., 1997) mit eingelagertem L-Phenylalanin-AMP als Substrat (modelliert, fett hervorgehoben).

Kontakt zum Wasserkanal bzw. Gln 218. Für Ochratoxin α -amid entspricht dies einer Absättigung seiner Wasserstoffbrückenpartner, während der Carboxylsauerstoff von Ochratoxin α von Glu 220 abgestoßen (Gln 218 – aufgrund eines zu großen Abstandes – nur als schwacher Partner). Insgesamt ließe dies eine etwas schwächere Bindungsaffinität für Ochratoxin α erwarten. Im Experiment (Chu, 1974) wird aber für Ochratoxin α gar keine Toxizität festgestellt, während Ochratoxin α -amid toxisch wirkt. Ein Grund für die vergleichsweise schwache Affinität von Ochratoxin α ist durch die Tatsache gegeben, daß Ochratoxin α bei physiologischem pH als Anion vorliegt, im Gegensatz zu Ochratoxin A aber keine entsprechenden Salzbrücken am Enzym ausbilden kann, welche die hohe Desolvatationsenergie kompensieren könnten, was die Affinität stark reduziert.

3.1 Aspartam, ein potentieller Ochratoxinantagonist

Obschon sich (sub-)chronische Toxinbelastungen naturgemäß schlecht antagonisieren lassen, konnten Creppy und Mitarbeiter (1995) zeigen, daß Aspartam (ein künstlicher Süßstoff, der strukturell dem natürlichen Substrat L-Phenylalanin-AMP verwandt ist; vgl. Abbildung 2), ein geeigneter Kandidat für die Reduktion von chronischen Effekten im Zusammenhang mit Ochratoxin A-Vergiftungen ist. Durch Verfütterung von Aspartam (25 mg/kg) während 48 Stunden in Kombination mit Ochratoxin A (0,3 mg/kg) an Ratten konnten sowohl nephro- als auch genotoxische Effekte während mehrerer Wochen unterbunden werden. Wird Aspartam nach einer Intoxifizierung *in vivo* verabreicht, vermag es das Toxin vollständig auszuwaschen. Eine gleichartige Schutzwirkung von Aspartam auf die

Proteinsynthese konnte vor kurzem in Zellkulturen nachgewiesen werden (Baudrimont et al., 1997).

Die zur Verhinderung von chronischen Effekten bzw. Antagonisierung von akuten Ochratoxinvergiftungen vergleichsweise hohen erforderlichen Aspartamdosierungen (25 mg/kg) sind – insbesondere für therapeutische Anwendungen bei chronischer Vergiftung – vergleichsweise hoch und lassen die Suche nach einer potenteren Wirksubstanz als dringlich erscheinen. Um dies auf rationalem Weg zu erreichen, sind die Kenntnisse der dreidimensionalen Strukturverhältnisse in den aktiven Stellen der verschiedenen Zielproteine unabdingbar.

Aspartam ist nicht nur dem natürlichen Substrat der Phenylalanin-t-RNA-Synthetase ähnlich, sondern auch Ochratoxin A. Wir haben daher auch die Wechselwirkungen von Aspartam mit Phenylalanin-t-RNA-Synthetase geprüft (Abbildung 5). Um als guter Antagonist zu wirken, müßte Aspartam etwas schlechter als Ochratoxin A oder L-Phenylalanin-AMP binden, um letzteres nicht – analog Ochratoxin A – aus der Bindungstasche zu verdrängen.

Der Phenylring von Aspartam ist – wie derjenige des natürlichen Substrates L-Phenylalanin-AMP – über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Phe 258 und Phe 260 stabilisiert. Die Carboxylgruppe bildet mit Arg 204 eine Salzbrücke, die Ammoniumgruppe wird durch Gln 218 gebunden, das zusätzlich eine Wasserstoffbrücke mit der Amidcarbonylgruppe bildet. Der Ester ist doppelt stabilisiert: die Methylgruppe bindet in eine aus Trp 149 und Phe 260 gebildete hydrophobe Tasche, die Carbonylgruppe ist über eine Wasserstoffbrücke mit dem Wasserkanal verbunden. Das Wasserstoffbrückennetzwerk ist im Vergleich zu Ochratoxin A etwas weniger ausgeprägt, vermag aber Aspartam hinreichend zu stabilisieren.

Die Effekte, die von Vitamin C (Reduktion der Genotoxizität; vgl. Bose and Sinha, 1994), Retinol (Reduktion der Genotoxizität; vgl. Kumari and Sinha, 1994) und Diacetoxyscirpenol (DAS; vgl. Kubena et al., 1994) ausgehen, lassen sich nicht direkt auf eine Wechselwirkung mit Phenylalanin-t-RNA-Synthetase zurückführen. Diese Substanzen beeinflussen denn auch die Genotoxizität und nicht, wie Aspartam, vor allem die Nephrotoxizität.

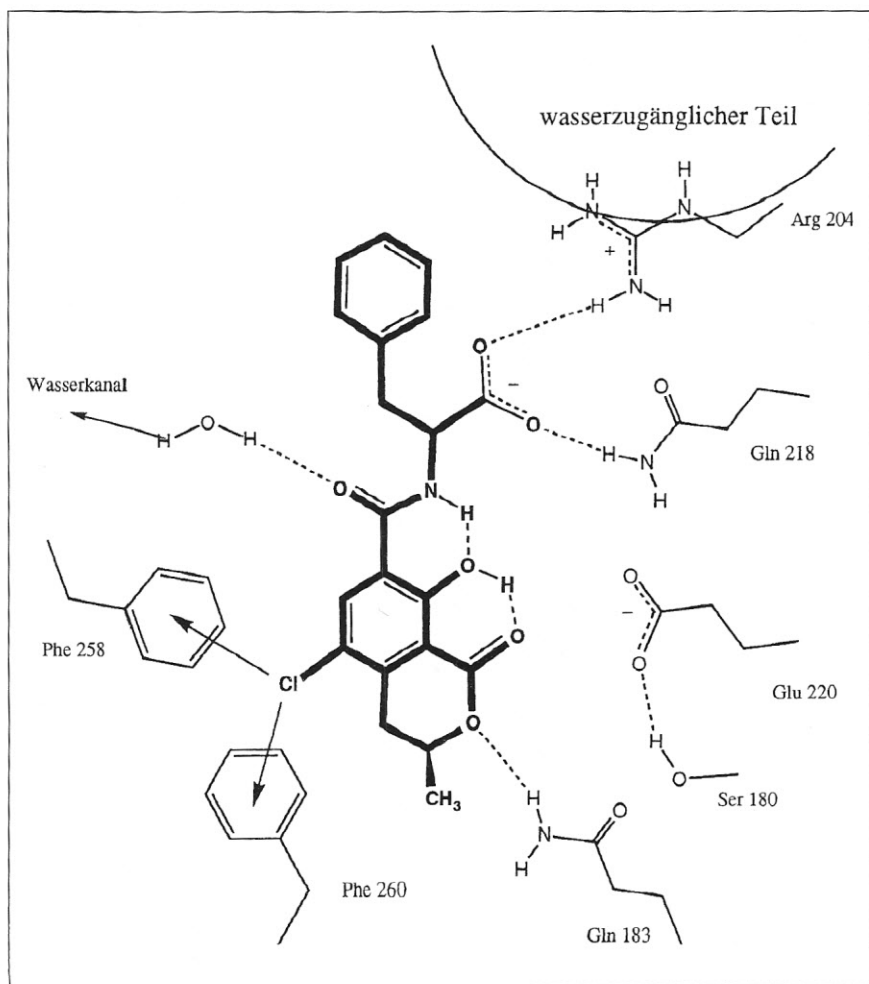


Abbildung 4: Aktive Stelle des Enzyms Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (Goldgur et al., 1997) mit eingelagertem Ochratoxin A als Inhibitor (modelliert, fett hervorgehoben).

3.2 Identifikation von selektiven Ochratoxinantagonisten

Wirksame Ochratoxinantagonisten müssen allem vorab zwei Bedingungen erfüllen: 1. Sie müssen mit einer (gegenüber Ochratoxin A) hinreichenden Affinität ans Enzym binden und 2. dürfen sie das natürliche Substrat (hier: L-Phenylalanin-AMP) nicht wesentlich hemmen. Dies scheint der Quadratur der Kreise zu entsprechen; es muß aber bedacht werden, daß eine vergleichsweise bescheidene Affinität des Antagonisten mit einer therapeutischen Überdosierung kompensiert werden kann, solange dessen Toxizitätsschwelle dabei nicht überschritten wird.

Aufbauend auf den Untersuchungen von Creppy et al. (1995) erscheint es sinnvoll, von Aspartam (vgl. Abbildung 5) als Leitsubstanz auszugehen und dieses Molekül – den strukturellen Gegebenheiten am Enzym entsprechend – zu optimieren. Als erster „Angriffspunkt“ drängt sich die Esterfunktion auf. Diese könnte leicht – und affinitätsverstärkend – in einen Äthyl- oder Isopropylester umgewandelt werden. Damit ergäbe sich eine zusätzliche hydrophobe Stabilisierung. Weitere Modifikationen sind in der meta- und para-Stellung des Phenylrings denkbar. Hier ließen sich – in Analogie zu dem Bindungsmodus des natürlichen Substrates L-Phe-AMP – funktionelle Gruppen (z.B. Hydroxyl-, Halogen-, Cyano- oder Amidfunktionen) einführen, die ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit Gln 183 und Glu 220 ausbilden könnten.

Eine andere Möglichkeit wäre es, von Mellein – oder noch genereller – von einem substituierten Isocumaringerüst auszugehen. Hier müßte man aber Verhältnisse zu verhindern wissen, wie sie beim Ochratoxin α -amid anzutreffen sind, denn der Antagonist soll zwar „Wirkung zeigen“, aber keinesfalls bei den erforderlichen Dosierungen selbst toxisch wirken.

Schließlich muß berücksichtigt werden, daß die toxischen Wirkungen von Ochratoxin A nicht ausschließlich auf seiner Wechselwirkung mit Phenylalanin-t-RNA-Synthetase beruhen. Analog müßten daher die Verhältnisse an Phenylalanin Hydroxylase und Phenylalanin Transferase studiert werden. Hier stehen derzeit leider keine dreidimensionalen Strukturen zur Verfügung, sodaß *Modeling by Homology* als aussichtsreichster Weg zu einem

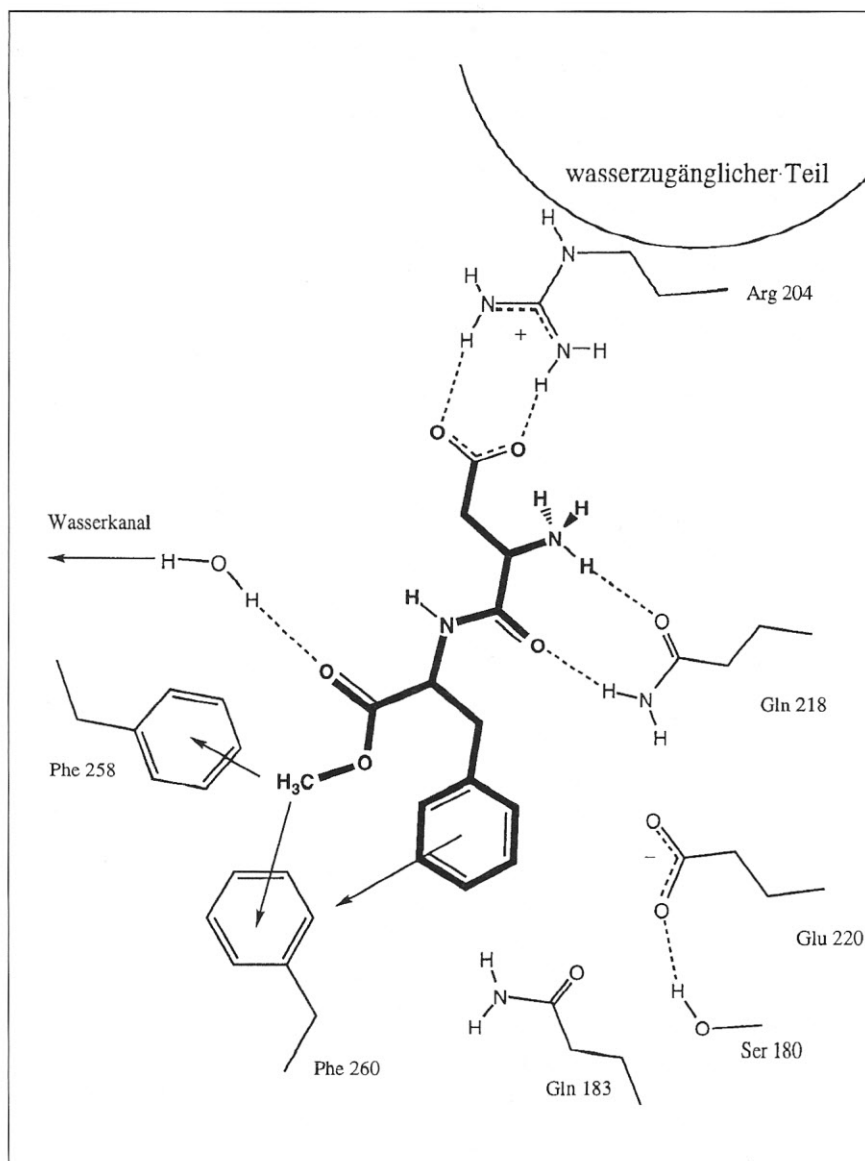


Abbildung 5: Aktive Stelle des Enzyms Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (Goldgur et al., 1997) mit eingelagertem Aspartam als Inhibitor (modelliert, fett hervorgehoben).

aussagekräftigen Modell angesehen werden darf.

An dieser Stelle kann eingewendet werden, daß die Suche nach einem wirkungsvollen Ochratoxinantagonisten nicht ausschließlich an Phenylalaninmetabolisierenden Enzymen gesucht und überprüft werden darf. Weitere unerwünschte Wirkungen dieses Toxins beruhen auf seiner Beeinflussung der Fettoxidation und mitochondrialen Funktionen (siehe oben). Doch alle diese Effekte mit einem einzigen Antagonisten abdecken zu wollen, erscheint nicht sehr zielführend. Realistischer ist wohl die Entwicklung mehrerer „unabhängiger“ Therapeutika und deren Einsatz in Kombination.

3.3 Semi-quantitative Voraussagen

Der nächste Schritt schließt die semi-quantitative Voraussage der Bindungsaffinitäten (und damit der rezeptor-gekoppelten Toxizität) der untersuchten Spezies ein (für Methodik, vgl. Vedani et al., 1995; Zbinden et al., eingesandt). Für die Validierung soll aber – gegenüber dem Bindungsstellenmodell (Vedani und Bruinink, 1996) – auf eine größere Anzahl von Ochratoxinen und verwandten Substanzen zurückgegriffen werden (siehe z.B. Creppy et al., 1990, 1983; Steyn, 1984; Stormer et al., 1983; Cole and Cox, 1981; Chu, 1974).

Es gibt Hinweise, daß die Hemmung dieser phenylalaninmetabolisierenden En-

zyme nicht ausschließlich über einen kompetitiven Mechanismus erfolgt. Interessant ist in diesem Zusammenhang vor allem die Beobachtung, daß Mellein die Toxizität von Ochratoxin A noch erhöht (Bruinink und Sidler, eingesandt) – dies wäre bei reiner Kompetitivität nur schwer erklärbar. Strukturell gesehen, könnten die kleineren Vertreter der Ochratoxinfamilie (z.B. Ochratoxin α) auch an eine andere Stelle innerhalb der aktiven Stelle binden. Aber auch Ochratoxin A selbst könnte seine toxische Wirkung über allosterische Effekte erzielen (Phenylalanin-t-RNA-Synthetase ist beispielsweise als Tetramer aktiv). Daraus ergeben sich zwei Fragen: 1. Bindet Ochratoxin A an die Phenylalaninbindungsstelle im Enzym? und 2. Gibt es Hinweise für allosterische Effekte? Der „rein kompetitive Bindungsmodus“ kann durch eine hohe Korrelation zwischen experimentellen und berechneten Bindungsaffinitäten gestützt (bzw. geschwächt) werden. Ein zweiter kompetitiver Bindungsmodus kann mittels sog. Monte-Carlo Suchalgorithmen (vgl. z.B. Zbinden et al., eingesandt) gefunden und überprüft werden.

Die Suche nach einer allosterischen Bindungsstelle kann „im Prinzip“ wiederum mittels Monte-Carlo Suchalgorithmen angegangen werden, d.h. alle Ochratoxinvertreter werden in einem Boltzmann-gewichteten zufälligen Auswahlverfahren (Monte Carlo) an eine größere Anzahl von Bindungsstellen angedockt und anschließend energetisch optimiert. Leider sind solche Simulationen extrem rechenintensiv; auch kann der dreidimensionale Raum (hier: die Bindungstasche des Enzyms) nie erschöpfend abgesucht werden kann, d.h. eine Restunsicherheit bleibt – vor allem bei negativem Ergebnis – bestehen.

Der Einfluss einer allfälligen Bindung von Ochratoxin A an eine allosterische Bindungsstelle auf die quaternäre Struktur des Enzyms ist deutlich schwieriger zu beantworten. Hier erscheint es sinnvoll, zunächst das molekulardynamische Verhalten des Komplexes mit dem natürlichen Substrat zu studieren. Anschließend muß die Dynamik der quaternären Struktur mit gebundenem Ochratoxin A – in Kombination mit Monte-Carlo Suchalgorithmen – analysiert werden. Eine erschöpfende Simulation aller Möglichkeiten liegt hier aber nicht im Bereich der heute verfügbaren Rechenleistungen. Dies impliziert, daß bei einem „negativen Ergebnis“ (d.h. kei-

ne allosterische Bindungsstelle) nur sehr vorsichtig argumentiert werden darf. Bei einem positiven Ausgang andererseits, haftet dem Modell wohl eine gewisse Signifikanz an. Um ganz vollständig sein zu wollen, müssen diese Untersuchungen auch auf die Enzyme Phenylalanin Transferase und Phenylalanin Hydroxylase ausgeweitet werden.

Die Identifikation potentieller Ochratoxinantagonisten kann – basierend auf einem verfeinerten Modell – mittels *de novo design* Algorithmen bewerkstelligt werden (vgl. z.B. Böhm, 1992). Ideale Wirkstoffe sollten keine strukturellen Elemente einschließen, die zu einer starken Hemmung führen, wie zum Beispiel die Amidfunktion, die das Isocumarinfragment mit dem Phenylalanin verbrückt (vgl. Vedani und Bruinink, 1996). Aufgrund unserer bisherigen Untersuchungen (siehe oben) ist dies am ehesten ausgehend vom Aspartammolekül sinnvoll. Denkbar sind aber auch Variationen basierend auf dem Isocumarolgerüst oder auf substituierten D³-Dihydropyran-2-on-Verbindungen.

4 3R-Relevanz

Antagonisierende Substanzen zu Toxinen („Gegengifte“) können – abgesehen von natürlich vorkommenden Hemmstoffen – nur bei bekanntem Mechanismus systematisch gesucht werden. Mit Hilfe einer Rezeptorstruktur (experimentell oder modelliert) können die Bindungseigenschaften solcher Wirkstoffe am Computer gezielt gefunden und optimiert werden. Anschließend müssen nur die aussichtsreichsten Kandidaten einer biologischen Aktivitätsprüfung (inklusive Tierversuche) zugeführt werden, was zu einer signifikanten Reduktion der *in vivo* zu testeten Substanzen führen kann. Da die toxischen Wirkungen von Ochratoxinen durch Wechselwirkung mit mindestens drei grundsätzlich verschiedenen Rezeptorklassen zustandekommen, erscheint der Versuch, Ochratoxinantagonisten „zufällig“ zu entdecken, als wenig rationaler Weg, potente Gegenmittel zu finden. Um unnötige Tierversuche einzusparen, ist es zweckmäßiger, die Bestimmung der dreidimensionalen Strukturen (Röntgenbeugung oder NMR) zu forcieren. Stehen keine solchen zur Verfügung, ist es sinnvoll, mittels Computermodellen (Homologie oder Bindungsstellensurrogate) Leitsubstanzen zu

suchen. Wünschenswert erscheint, dass *in vitro* Tests unter Berücksichtigung von pharmakokinetischen und metabolischen Phänomenen möglichst frühzeitig mit der Modellierung verknüpft werden (Folkers, 1995).

Literatur

- Anderson, M. E., Krishnan, K., Conolly, R. B. and McClellan, R. O. (1992). Biologically based modeling in toxicology research. *Arch. Toxicol. Suppl.* 15, 217-27.
- 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.
- Baumann, U. und Zimmerli, B. (1988). Einfache Ochratoxin-A-Bestimmung in Lebensmitteln. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 79, 151-158.
- Blancy, J. M., Weiner, P. K., Dearing, A., Kollman, P. A., Jorgensen, E. C., Oatley, S. J., Burrig, J. M. and Blake, J. F. (1982). Molecular mechanics simulation of protein-ligand interactions: Binding of thyroid analogues to prealbumin. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6424-6434.
- Blundell, T. L., Sibanda, B. L., Sternberg, M. J. E. and Thornton, J. M. (1987). Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature (London)*, 326, 347-352.
- Böhm, H.-J. (1992). The computer program LUDI: A new method for the *de novo* design of enzyme inhibitors. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 6, 61-78.
- Boorman, G. A. (1989). Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. *NTP Tech. Rep.* 358.
- Bose, S. and Sinha, S. P. (1994). Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C. *Food. Chem. Toxicol.* 32, 533-37.
- 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.
- Brick, P., Bhat, T. N. and Blow, D. M. (1989). Structure of tyrosyl-t-RNA-synthetase refined at 2.5 Å resolution. Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate. *J. Mol. Biol.* 208, 83-96.
- Breitholz-Emanuelsson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger, I. and Hult, K. (1993). Ochratoxin A and citrinin upon

- biochemical function of porcine kidney. *J. AOAC* 76, 842-846.
- Bruinink, A., Rasonyi, T. and Sidler, C. (1997). Reduction of ochratoxin A toxicity by heat-induced epimerization. In-vitro effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell cultures. *Toxicology* 118, 205-210.
- Bruinink, A. and Sidler, C. (eingesandt). The neurotoxic effects of ochratoxin A are cell-type specific, reduced by protein binding but not affected by L-phenylalanine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*
- Chu, F. S. (1974). Studies on ochratoxins. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 2, 499-523.
- Cole, R. J. and Cox, R. H. (1981). Ochratoxins. In *Handbook of toxic fungal metabolites*, 128-151, New York: Academic Press.
- 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., Chakor, K., Fisher, M. J. and Dirheimer, G. (1990). The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo. *Arch. Toxicol.* 64, 279-284.
- Creppy, E. E., Kane, E., Giessen-Crouse, A., Roth, A., Rösenthaller, R. and Dirheimer, G. (1986). Effect of ochratoxin A on enzyme activities and macromolecular synthesis in MD CK cells. *Arch. Toxicol. Suppl.* 9, 310.
- Creppy, E. E., Rösenthaller, R. and Dirheimer, G. (1984). Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food. Chem. Toxicol.* 22, 883-886.
- Creppy, E. E., Kern, D., Steyn, P. S., Vieggar, R., Rösenthaller, R. and 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.
- Degen, G. H., Gerber, M. M., Obrecht-Pflumio, S. and Dirheimer, G. (1996). Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Arch. Toxicol.* 71, 365-71.
- Dhondt, J. L., Henichart, J. P., Bernier, J. L. and Dautrevaux, M. (1980). In-vivo effects of L- and D-parachlorophenylalanine on rat liver phenylalanine hydroxylase. *Biochimie* 62, 185.
- Doweyko, A. M. (1994). Three-dimensional pharmacophores from binding data. *J. Med. Chem.* 37, 1769-1778.
- Folkers, G. (1995). Modellierung von Protein-Ligand-Komplexen als Basis einer rationalen Arzneistoffentwicklung. *ALTEX* 12, 138-151.
- Gekle, M. and Silbernagl, S. (1996). Renal toxicodynamics of ochratoxin A: a pathophysiological approach. *Kidney Blood Press. Res.* 19, 225-235.
- Goldgur, Y., Mosyak, L., Reshetnikova, L., Ankilova, V., Larik, O., Khodyreva, S. and Saftro, M. (1997). The crystal structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with cognate tRNA^{Phe}. *Structure* 5, 59-68.
- Hald, B. (1991). Ochratoxin A in human blood in European countries. *IARC Sci. Publ.* 115, 159-164.
- Hahn, M. and Rogers, D. (1995). Receptor surface models. 2. Application to quantitative structure-activity studies. *J. Med. Chem.* 38, 2091-2102.
- Hasinoff, B. B., Rahimtula, A. D., and Omar, R. F. (1990). NADPH-cytochrome P450 reductase promoted radical production by the Iron(III)-ochratoxin A complex. *Biochem. Biophys. Acta* 1032, 78-81.
- Hoehler, D., Marquardt, R. R., McIntosh, A. R. and Hatch, G. M. (1997). Induction of free radicals in hepatocytes, mitochondria and microsomes of rats by ochratoxin A and its analogs. *Biochim. Biophys. Acta* 1357, 225-233.
- Holloway, M. K., Wai, J. M., Halgren, T. A., Fitzgerald, P. M. D., Vacca, J. P., Dorsey, B. D., Levin, R. B., Thompson, W. J., Chen, L. J., deSolms, S. J., Gaffin, N., Gosh, A. K., Giuliani, E. A., Graham, S. L., Guare, J. P., Hungate, R. W., Lyle, T. A., Sanders, W. M., Tucker, T. J., Wiggins, M., Wiscount, C. M., Woltersdorf, O. W., Young, S. D., Darke, P. L. and Zugay, J. A. (1995). A priori prediction of activity for HIV-1 protease inhibitors employing energy minimization in the active site. *J. Med. Chem.* 38, 305-317.
- Kubena, L. F., Harbey, R. B., Edrington, T. S. and Rottinghaus, G. E. (1994). Influence of ochratoxin A and diacetoxyscirpenol and in combination on broiler chickens. *Poult. Sci.* 73, 408-415.
- Kumari, D. and Sinha, S. P. (1994). Effect of retinol-produced genotoxicity in mice. *Food. Chem. Toxicol.* 32, 471-475.
- Krystek, S., Stouch, T. and Novotny, J. (1993). Affinity and specificity of Serine Endopeptidase-protein inhibitor interactions. *J. Mol. Biol.* 234, 661-679.
- Li, S., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Vitti, T. G. and Crow, G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 82-90.
- Marquardt, R. R. and Fröhlich, A. A. (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70, 3968-3988.
- Meisner, H. and Krogh, P. (1986). Phosphoenolpyruvate carboxykinase as a selective indicator of ochratoxin induced nephropathy. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 14, 199.
- Meisner, H. and Polsinelly, L. (1986). Changes of renal mRNA species abundance by ochratoxin A. *Biochem. Pharmacol.* 35, 661.
- Meisner, H. (1976). Energy-dependent uptake of ochratoxin A by mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 132.
- Meisner, H. and Chan S. (1974). Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport. *Biochem.* 13, 2795-2800.
- Miki, T., Fukui, Y., Uemura, N. and Takeguchi, Y. (1994). Regional difference in the neurotoxicity of ochratoxin A on the developing cerebral cortex in mice. *Dev. Brain. Res.* 82, 259-264.
- 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.
- Omar, R. F., Hasinoff, B. B., Mejilla, F. and Rahimtula, A. D. (1990). Mechanism of ochratoxin A-stimulated lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 40, 1183-1191.
- Omar, R. F., Gelboin, H. V., and Rahimtula, A. D. (1996). Effect of cytochrome P450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Biochem. Pharmacol.* 51, 207-216.
- Parker, R. B., Phillips, T. D., Kubena, L. F., Russel, L. H. and Heidelbaugh, N. D. (1982). Inhibition of pancreatic carboxypeptidase A: A possible mechanism of interaction between penicillins and ochratoxin A and feed mycotoxins. *J. Environ. Sci. Health* 17, 77-91.

- Rahimtula, A. D., Bereziat, J.-C., Bussacchini-Griot, V. and Bartsch, H. (1988). Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 37, 4469-4477.
- Safe, S. and Krishnan, K. (1995). Cellular and molecular biology of Aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression. In D. H. Degen, J. P. Seiler and P. Bentley (eds.), *Archives of Toxicology, Supplement 17* (116-124, Berlin: Springer).
- Sali, A., Overington, J. P., Johnson, M. S. and Blundell, T. L. (1990). From comparisons of proteins sequences to protein modelling and design. *Trends Biochem. Sci.*, 15, 235-240.
- Sanderson, D. M. and Earnshaw, C. G. (1991). Computer predictions of possible toxic action from chemical structure; the DEREK system. *Hum. Exp. Toxicol.* 10, 261-273.
- Searle, M. S. and 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. and Vedani, A. (1993). Pseudoreceptors. In H. Kubinyi (ed.), *3D-QSAR in Drug Design* (336-354), Leiden: ESCOM Science Publishers.
- Snyder, J. P., Rao, S. N., Koehler, K. F. and Pellicciari, R. (1992). Drug modeling at cell membrane receptors: The concept of pseudoreceptors. In P. Angeli, U. Gulini and W. Quaglia (eds.), *Trends in Receptor Research* (367-403), Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Steyn, P. S. (1984). Ochratoxins and related dihydroisocumarins. In V. Bettina (ed.), *Mycotoxins - Production, Isolation, Separation and Purification* (183-189), Amsterdam: Elsevier.
- Stormer, F. C., Støren, O., Hansen, C. E., Pedersen, J. I. and Aasen, A. J. (1983). Formation of (4R)- and (4S)-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1183.
- Still, W. C., Tempezyk, A., Hawley, R. C. and Hendrickson, T. (1990). Semi-analytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6127-6129.
- Stegen van de, G., 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.
- Tamaru, M., Hirata, Y. and Matsutani, T. (1988). Neurochemical effects of prenatal treatment with ochratoxin A on fetal and adult mouse brain. *Neurochem. Res.* 13, 1139-1147.
- Vedani, A. and Bruinink, A. (1996). Ochratoxin A und B: Ein molekulares Modell zur mechanistischen Erklärung ihrer Toxizität. *ALTEX* 13, 124-129.
- Vedani, A. und Zbinden, P. (1996). Computermodelle im pharmakologischen und toxikologischen Screening. In F. P. Gruber und H. Spielmann (Hrsg.) *Alternativen zu Tierversuchen* (143-162), Berlin, Heidelberg, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Vedani, A., Zbinden, P., Snyder, J. P. and Greenidge, P. A. (1995). Pseudoreceptor modeling: The construction of three-dimensional receptor surrogates. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 4987-4994.
- Vedani, A. and Huhta, D. W. (1990). A new force field for modeling metalloproteins. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4759-4767.
- Walters, D. E. and Hinds, R. M. (1994). Genetically evolved receptor models: A computational approach to construction of receptor models. *J. Med. Chem.* 37, 2527-2536.
- Wei, Y.-H., Lu, C.-Y., Lin, T.-N. and Wei, R. D. (1985). Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Toxicology* 36, 119-130.
- Xiao, H., Marquardt, R. R., Fröhlich, A. A. and Ling, Y. Z. (1995). Synthesis and structural elucidation of ochratoxin A analogs. *J. Agric. Food. Chem.* 43, 524-530.
- Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R. R., Li, S., Vodela, J. K., Fröhlich, A. A. and Kemppainen, B. W. (1996a). Toxicity of Ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137, 182-192.
- Xiao, H., Marquardt, R. R., Abramson, D. and Fröhlich, A. A. (1996b). Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 648-655.
- Zbinden, P., Dobler, M., Folkers, G. and Vedani, A. (eingesandt). PrGen: Pseudoreceptor modeling using receptor-mediated ligand alignment and pharmacophore equilibration. *QSAR*

Verdankung

Dieses Projekt wurde durch die großzügige finanzielle Unterstützung der *Karl-Mayer-Stiftung* (Triesen, FL) und der *Margaret und Francis Fleitmann-Stiftung* (Luzern) ermöglicht. Zu Dank verpflichtet sind wir Herrn Dr. Arend Bruinink (vormals Institut für Toxikologie der ETH und Universität Zürich, CH-Schwerzenbach), der uns alle *in vitro* Daten zur Verfügung gestellt hat. Herrn PD Dr. Peter Maier (Institut für Toxikologie der ETH und Universität Zürich, CH-Schwerzenbach) danken wir für die kritische Durchsicht des Manuskriptes sowie für die Beurteilung und Ergänzung der toxikologischen Befunde aus der Literatur.

Korrespondenzadresse

Dr. Angelo Vedani
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