

## Protein-Mimikry: eine neue Dimension für Peptide als Leitstrukturen?\*

Ulrich Reineke und Jens Schneider-Mergener\*

Vier Publikationen in *Science* und in den *Proceedings of the National Academy of Science USA* aus den Jahren 1996 und 1997 behandeln die Identifizierung von Peptiden, die biologische Funktionen von Proteinen nachahmen.<sup>[1–4]</sup> Viele biologische Prozesse werden durch spezifische Wechselwirkungen von Proteinen mit membranständigen Rezeptoren reguliert. Eine große Gruppe dieser Rezeptoren ist die Familie der hämatopoetischen Cytokin-Rezeptoren. Diese weisen einen N-terminalen extrazellulären, aus mehreren Domänen aufgebauten Teil auf, der für die Ligandenbindung verantwort-

lich und über eine Transmembranhelix mit dem C-terminalen, signaltransduzierenden Teil verbunden ist. Die Signaltransduktion erfolgt durch Homodimerisierung oder Heterooligomerisierung der Rezeptoren mit akzessorischen membranständigen Proteinen nach Bindung des Cytokin-Liganden.<sup>[5]</sup> Wie anhand von Kristallstrukturanalysen von Hormon-Rezeptor-Komplexen, wie dem aus dem humanen Wachstumshormon (hGH) und seinem Rezeptor (hGHR)<sup>[6]</sup> (Abb. 1, rechts), gezeigt wurde, werden die Liganden an ihre Rezeptoren über große Kontaktflächen (500–1300 Å<sup>2</sup>) mit ungefähr 30 an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäureresten je Bindungspartner gebunden. Wegen dieser Befunde war man lange Zeit der Meinung, daß es kaum möglich sei, diese hochaffinen und spezifischen Wechselwirkungen mit Peptiden oder noch kleineren organischen Verbindungen nachzuahmen. Pionierarbeiten in diese Richtung wurden



Abb. 1. Links: Schematische Darstellung der Kristallstruktur von zwei Erythropoietin-Rezeptoren (grau) im Komplex mit dem durch Phagen-Display identifizierten Erythropoietin-Mimeticum (schwarz).<sup>[2]</sup> Das Peptid bindet den Liganden als Homodimer.  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind als Pfeile dargestellt und  $\alpha$ -Helices als Zylinder. Rechts: Schematische Darstellung der Struktur des humanen Wachstumshormons (hGH) (schwarz) im Komplex mit zwei identischen Rezeptormolekülen (hGHR) (grau).<sup>[6]</sup> Von beiden Rezeptoren sind jeweils die löslichen extrazellulären Anteile kristallisiert worden.

bereits 1995 von J. Wells und Mitarbeitern bei Genentech (San Francisco, Kalifornien) publiziert. Sie verkürzten das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) unter Erhaltung seiner Aktivität von 28 auf 15 Aminosäuren.<sup>[7]</sup> Derselben Gruppe gelang weiterhin die Verkürzung der Z-Domäne des Proteins A, das an den Fc-Teil von Immunglobulinen bindet, von 59 auf 33 Aminosäuren unter Erhaltung der Bindungsfähigkeit.<sup>[8]</sup> Ein wegweisender Durchbruch gelang 1996 der Arbeitsgruppe von W. Dower am Affymax Research Institute (Palo Alto, Kalifornien) durch die Identifizierung eines 20meren Peptids, das die Funktion des wesentlich größeren Proteinormons Erythropoietin (EPO, 165 AS) nachahmt.<sup>[1]</sup> Dieses Proteinmimeticum zeigt keinerlei Sequenzähnlichkeit zum Protein. Es kann jedoch den Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) nicht nur binden, sondern auch aktivieren. Diese Fähigkeit läßt sich anhand der Kristallstrukturanalyse des Komplexes aus zwei EPO-Rezeptoren und einem Dimer dieses Peptids erklären, die I. Wilson und Mitarbeitern am Scripps Research Institute (La Jolla, Kalifornien) gelang.<sup>[2]</sup>

Die Identifizierung dieses Peptids sowie die Arbeiten am Atrialen Natriuretischen Peptid und an der Z-Domäne des Proteins A erfolgten mit der Phagen-Display-Technik, die 1985 von G. Smith eingeführt wurde<sup>[9]</sup> und sich seit Beginn der 90er Jahre zu einer weitverbreiteten Methode zur biologischen Bildung von Peptid-Bibliotheken auf Phagenoberflächen entwickelte.<sup>[10]</sup> Das Prinzip der Phagen-Display-Technik ist in Abbildung 2 dargestellt und beschrieben. Grundlage für

[\*] Priv.-Doz. Dr. J. Schneider-Mergener  
Institut für Medizinische Immunologie  
Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität  
Schumannstraße 20/21, D-10098 Berlin  
Fax: (+49) 30-2802-6460  
E-mail: jens@immunologie.charite.hu-berlin.de  
Dipl.-Biochem. U. Reineke  
Jerini BioTools GmbH  
Rudower Chaussee 5, D-12489 Berlin

[\*\*] Wir danken P. Fischer, A. Kramer und U. Hoffmüller für die kritische Durchsicht des Manuskripts und R. Stigler für seine Unterstützung bei der Erstellung der Abbildungen.

die Ausstellung der unterschiedlichen Peptide auf den Oberflächen der filamentösen Phagen ist die Klonierung von Zufallsoligonucleotiden in das Gen III oder VIII des Phagen-genoms (Abb. 2). Die Zufallsabschnitte im mutierten Genom codieren nun alle möglichen Peptide entsprechend der Zahl der randomisierten Basentriplets. Diese Phagen, die jeweils eine Peptidsequenz auf den Hüllproteinen pIII oder pVIII ausstellen (Display), werden anschließend in Bakterien propagiert. Dazu muß die mutierte Phagen-DNA in die Bakterien geschleust werden, ein Vorgang der Transfektion genannt wird. Durch diesen Schritt wird die Repertoiregröße begrenzt. Bibliotheken aus  $10^7$  bis  $10^9$  unterschiedlichen Phagen sind Stand der Technik. In einem als „Panning“ bezeichneten Prozeß werden diese Repertoires einer Selektion in bezug auf ihre Affinität zu einem immobilisierten Liganden unterworfen. Phagen, die einem bestimmten Selektionsdruck (z.B. Elutionsbedingungen, kompetitive Liganden) widerstehen, werden eluiert, vermehrt und einer weiteren Runde der Selektion ausgesetzt. Nach mindestens drei Runden der Anreicherung wird die Peptidsequenz einer Auswahl der den Liganden bindenden Phagen durch Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte von Gen III oder VIII bestimmt.

Wie war es nun möglich, mit dieser Technik ein Peptid zu identifizieren, das mit hoher Affinität an den Erythropoetin-Rezeptor bindet und gleichzeitig aktiviert?<sup>[1]</sup> Der erste Schritt wurde mit einer Phagenbibliothek getan, bei der cyclische Peptide der Sequenz CXXXXXXXXXC (C = Cystein, X = eine der 20 genetisch codierten L-Aminosäuren) auf pVIII ausgestellt waren. Bei diesem multivalenten Display befinden sich die Peptide in 100 bis 200 Kopien auf der Phagenoberfläche. Das hat zur Folge, daß auch Phagen mit Peptiden niedriger Affinität zum Liganden gebunden und amplifiziert werden können (Abb. 2 A). Der extrazelluläre Teil des EPOR wurde als Fusionsprotein mit einem Antikörper gegen den Fusionsanteil immobilisiert. Die EPOR-bindenden Phagen wurden mit Hilfe der Protease Thrombin eluiert, die eine eingebaute Sequenz zwischen EPOR und dem Fusionsanteil schneidet. Mit dieser Methode wurde das Peptid CRIG-PITWVC identifiziert, das mit einer halbmaximalen Inhibierungskonstante ( $IC_{50}$ ) von  $10 \mu M$  die EPO/EPOR-Wechselwirkung inhibiert. Zur Identifizierung von Peptidsequenzen mit höherer Affinität wurde anschließend eine Bibliothek des Typs GGXXCRIGPITWVCXXGG auf pIII (Abb. 2 B) in Gegenwart von EPO als Kompetitor der Phagen/EPOR-Wechselwirkung getestet. Sie wurde so konstruiert, daß neben

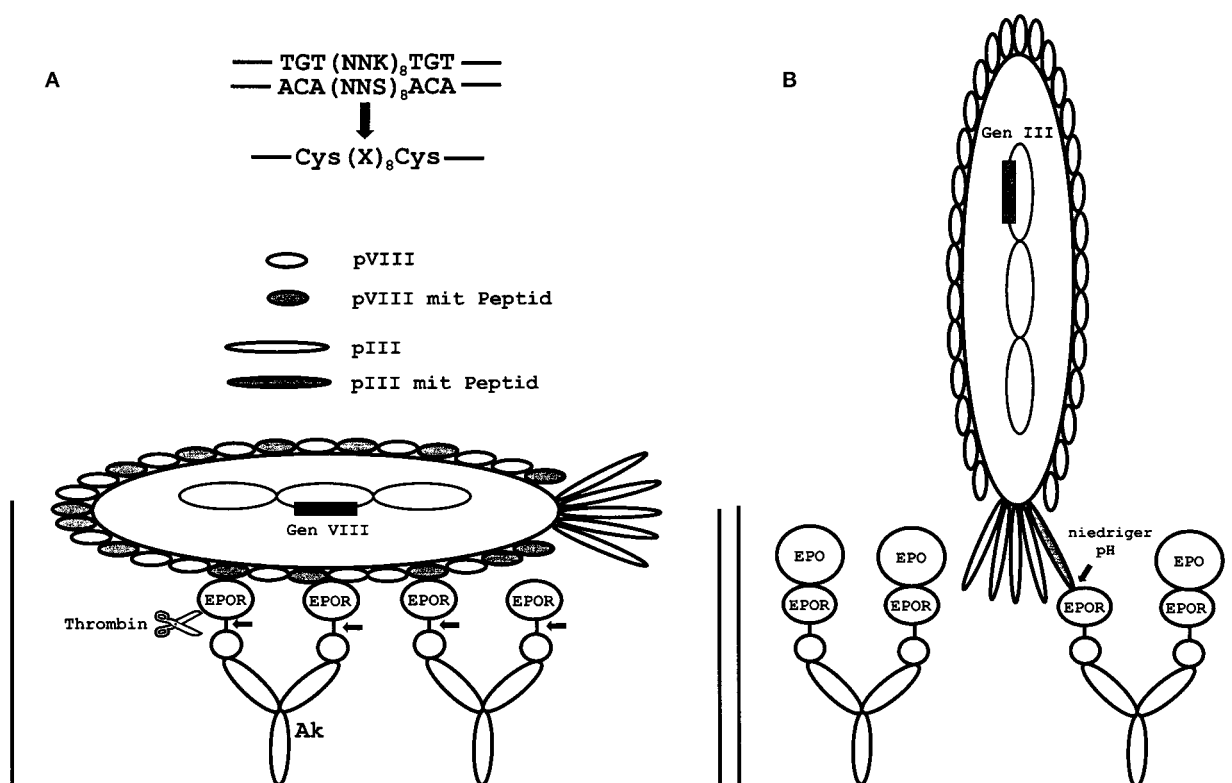


Abb. 2. A) Multivalentes Phagen-Display auf dem Phagenhüllprotein pVIII. Die die unterschiedlichen Peptide der Bibliothek codierende DNA-Zufallssequenz wird in das Gen VIII kloniert.<sup>[1, 10]</sup> Die die 20 Aminosäuren (X) codierenden Tripletts enthalten an den ersten beiden Positionen die vier Nucleotide A, C, G oder T (N), während die dritte Position durch G oder T (K) sowie A oder C (S) im komplementären Strang bestimmt wird. Diese Auswahl codiert alle 20 Aminosäuren, verringert allerdings die Zahl der Stop-Codons von 3 auf 1. Die beiden flankierenden Tripletts codieren die für die Cyclisierung erforderlichen Cysteinreste. Nur 100 bis 200 Kopien des Proteins VIII (pVIII) (kleines graues Oval) enthalten das ausgestellte Peptid. Die Information für nicht mutierte Hüllproteine (weiße Ovale), die für die Phagenreplikation essentiell sind, kommt entweder von einer zweiten Kopie des Wildtyp-Gens oder durch Coinfektion mit Helferphagen.<sup>[10]</sup> Zum Screening der Phagenbibliothek wurde der Erythropoetin-Rezeptor (EPOR) als Fusionsprotein mit einem Antikörper (Ak) an Mikrotiterplatten fixiert. Die bindenden Phagen wurden durch Spaltung einer Thrombin-Schnittstelle zwischen dem EPOR und dem Fusionsanteil eluiert. B) Niedervalentes Display auf dem Protein III (pIII) ermöglicht die Präsentation von 1 bis 5 Peptiden. Das Screening erfolgte in Gegenwart von Erythropoetin (EPO) als Kompetitor zur Selektion auf im Vergleich zum pVIII-Display höheraffin bindende Phagen. In diesem Experiment wurden die Phagen unter sauren Bedingungen vom EPOR eluiert.

der Verlängerung des Peptids auch Substitutionen innerhalb des Loops zugelassen wurden. Das beste daraus hervorgehende Peptid (GGTYSCHFGLTWVCKPQGG) inhibierte die EPO/EPOR-Wechselwirkung mit  $IC_{50} = 200\text{ nM}$ , die Affinität beim natürlichen Komplex beträgt dagegen  $200\text{ pM}$ . Die allen Peptiden der letzten Selektionsrunde gemeinsamen Aminosäuren und die für die Aktivität unerlässlichen Cysteinsteinreste sind hervorgehoben. Dieses Peptid (genannt EMP1 für „EPO mimetic peptide“) war außerdem in mehreren biologischen Testsystemen in der Lage, den EPOR zu aktivieren und ist damit eine vielversprechende Leitstruktur für EPO-Mimetica. Die medizinische und kommerzielle Bedeutung einer solchen Verbindung ist immens. Beispielsweise wird rekombinantes humanes EPO in der Therapie von renalen Anämien infolge von Niereninsuffizienz angewendet. Das weltweite Umsatzvolumen von EPO betrug 1995 2,6 Milliarden Dollar.

In der gleichen Ausgabe der Zeitschrift *Science*, in der die Identifizierung von EMP1 publiziert wurde, erschien auch ein Artikel, in dem die Kristallisation und Strukturaufklärung des EPOR<sub>2</sub>/EMP1<sub>2</sub>-Komplexes beschrieben und die erstaunliche Mimikry eines Proteins durch ein Peptid strukturell verständlich gemacht wird (Abb. 1, links).<sup>[2]</sup> Alle im letzten Abschnitt markierten Reste des EPO-Mimeticums EMP1 sind entweder für die Wechselwirkung mit dem Rezeptor oder die Bildung der Peptidstruktur wichtig. EMP1 bildet ein doppelsträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt und dimerisiert mit einem weiteren ungefähr um  $90^\circ$  gedrehten EMP1-Molekül zu einem viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt. Durch diese Dimerisierung entstehen zwei identische EPOR-Bindungsstellen. Der Rezeptor besteht, wie für einen Klasse-1-Cytokin-Rezeptor zu erwarten ist, aus zwei siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt-domänen. Das EMP1-Dimer wechselwirkt mit dem EPOR über vier der Loops zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen beider Rezeptordomänen. Trotz einiger Unterschiede im Detail besteht eine faszinierende Ähnlichkeit mit dem hGH/hGHR<sub>2</sub>-Komplex (Abb. 1, rechts). Der EPO-EPOR-Komplex konnte bisher nicht kristallisiert werden. EMP1 sowie hGH wechselwirken mit ihren Rezeptoren über homologe Aminosäurereste der Rezeptoren. Im hGH/hGHR-Komplex bilden zusätzlich zu den vier EPOR-Loops zwei weitere Loops Kontakte zum Cytokin, was die Größe von hGH im Vergleich zum EMP1-Dimer widerspiegelt.

Wie war es jedoch möglich, unter der reinen Selektion auf Affinität zu EPOR gleichzeitig ein funktionales Dimer des Peptids zu erhalten, das erst die Rezeptordimerisierung und die Signaltransduktion ermöglicht? Eine Erklärung, die von den Autoren gegeben wird, ist, daß EPOR über einen divalenten Antikörper während des Pannings immobilisiert wurde. Durch dieses Verfahren könnte die räumliche Situation auf der Zelle während der Rezeptordimerisierung imitiert werden. Unklar bleibt auch, ob die Dimerisierung von EMP1 schon auf der Phagenoberfläche erfolgen kann oder ob sie erst beim freien Peptid auftritt. Insgesamt beeindrucken die relativ hohe Affinität zum EPOR ( $200\text{ nM}$  versus  $200\text{ pM}$  für EPO) sowie die Spezifität (verwandte Rezeptoren werden nicht gebunden) des 20meren Protein-Mimeticums. Für das Vergleichssystem hGH/hGHR wurden detaillierte Studien über den Anteil bestimmter Aminosäure-

reste an der Freien Bindungsenergie durchgeführt. Es zeigte sich, daß diese im wesentlichen nur von wenigen der wechselwirkenden Reste abhängt.<sup>[11]</sup> Dieses wahrscheinlich für viele Systeme gültige Prinzip des „hot spots of binding“ macht die Mimikry großer Protein-Wechselwirkungsflächen durch Beschränkung auf das „energetische Epitop“ möglich. So wurde fast zeitgleich ebenfalls am Affymax Research Institute wiederum mit der Phagen-Display-Technik ein in diesem Fall antagonistisches 15meres Peptid identifiziert, daß mit einer Dissoziationskonstante von  $2\text{ nM}$  an den Typ-1-Interleukin-1-Rezeptor bindet.<sup>[4]</sup> Diese Affinität entspricht der des IL-1-Rezeptor-Antagonisten ( $1,6\text{ nM}$ ), eines natürlich vorkommenden  $20\text{-kDa}$ -Glycoprotein. Das Peptid ist jedoch in bezug auf seine biologische Aktivität deutlich schlechter.

Ein drittes Beispiel für Protein-Mimikry wurde ein Jahr später ebenfalls von W. Dower und Mitarbeitern publiziert. Mit einem Display auf Phagen und später *E. coli* wurde ein 14meres Peptid gefunden, das ebenfalls mit sehr hoher Affinität ( $K_D \approx 2\text{ nM}$ ) an den Thrombopoetin-Rezeptor (TPOR) bindet, ihn allerdings nur sehr schwach aktiviert.<sup>[3]</sup> Die synthetische Dimerisierung über einen Peptid-Linker lieferte dagegen eine halbmaximale Wirkungskonstante von  $100\text{ pM}$  (!), die identisch mit der des natürlichen Liganden Thrombopoetin ( $332\text{ AS}$ ) ist und die das Peptid zu einer attraktiven pharmakologischen Leitstruktur macht. Thrombopoetin ist der wichtigste Faktor in der Differenzierung von Stammzellen des Knochenmarks zu Blutplättchen und wird gegenwärtig in rekombinanter Form zur Therapie von Thrombocytopenien infolge von Chemotherapien oder Knochenmarkstransplantationen in klinischen Studien getestet. Analog zur Dimerisierung des Thrombopoetin-Mimeticums berichteten W. Dower und Mitarbeiter kürzlich über eine pseudosymmetrische kovalente Dimerisierung des Erythropoetin-Mimeticums EMP1 mit einem Lysinrest.<sup>[12]</sup> Je ein Monomer wurde an der  $\epsilon$ - und der  $\alpha$ -Aminofunktion mit einem eingeschobenen  $\beta$ -Alanin-Linker simultan synthetisiert. Die beiden Disulfidbrücken wurden über eine orthogonale Schutzgruppenstrategie selektiv geknüpft. Dieses Peptid, EMP1<sub>K-dimer</sub>, hat im Vergleich zum nichtkovalent dimerisierten EMP1 eine 100fach höhere Affinität zum EPOR und in vivo eine mehr als 10fach höhere agonistische Aktivität.

Die hier beschriebenen Proteinmimetica sind eine neue Klasse vielversprechender Leitstrukturen zur Synthese oral verfügbarer Wirkstoffe. Es gibt bisher keinen allgemeinen Ansatz ausschließlich durch kombinatorisch-chemische Verfahren größere Kontaktflächen von Proteinen gezielt zu blockieren, was zur Zeit ein Flaschenhals in der Wirkstofffindung ist. Die Renaissance von Peptiden als Leitstrukturen ist eingeleitet.

**Stichwörter:** Peptide • Phagen-Display-Technik • Proteinmimetica • Protein-Protein-Wechselwirkungen • Rezeptoren

[1] N. C. Wrighton, F. X. Farrell, R. Chang, A. K. Kashyap, F. P. Barbone, L. S. Mulcahy, D. L. Johnson, R. W. Barrett, L. K. Jolliffe, W. J. Dower, *Science* **1996**, 273, 458.

[2] O. Livnah, E. A. Stura, D. L. Johnson, S. A. Middleton, L. S. Mulcahy, N. C. Wrighton, W. J. Dower, L. K. Jolliffe, I. A. Wilson, *Science* **1996**, 273, 464.

- [3] S. E. Cwirla, P. Balasubramanian, D. J. Duffin, C. R. Wagstrom, C. M. Gates, S. C. Singer, A. M. Davis, R. L. Tansik, L. C. Mattheakis, C. M. Boytos, P. J. Schatz, D. P. Baccanari, N. C. Wrighton, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Science* **1997**, 276, 1696.
- [4] S. D. Yanofsky, D. N. Baldwin, J. H. Butler, F. R. Holden, J. W. Jacobs, P. Balasubramanian, J. P. Chinn, S. E. Cwirla, E. Peters-Bhatt, E. A. Whitehorn, E. H. Tate, A. Akeson, T. L. Bowlin, W. J. Dower, R. W. Barrett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 7381.
- [5] J. A. Wells, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1994**, 6, 163.
- [6] A. M. de Vos, M. Ultsch, A. A. Kossiakoff, *Science* **1992**, 255, 306.
- [7] B. Li, J. Y. K. Tom, D. Oare, R. Yen, W. J. Fairbrother, J. A. Wells, B. C. Cunningham, *Science* **1995**, 270, 1657.
- [8] A. C. Braisted, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 5688.
- [9] G. P. Smith, *Science* **1985**, 228, 1315.
- [10] G. P. Smith, J. K. Scott, *Methods Enzymol.* **1993**, 217, 228.
- [11] T. Clackson, J. A. Wells, *Science* **1995**, 267, 383.
- [12] N. C. Wrighton, P. Balasubramanian, F. P. Barbone, A. K. Kashyap, F. X. Farrell, L. K. Jolliffe, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Nature Biotechnology* **1997**, 15, 1261.

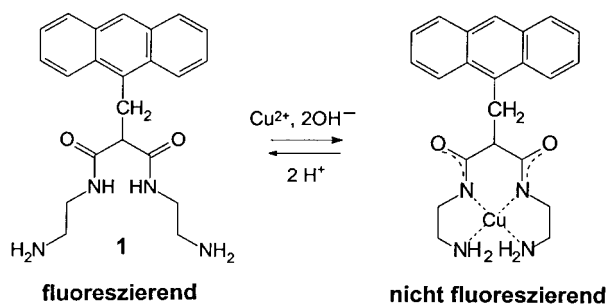
## Fluoreszenz-Chemosensoren für $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen: schnell, selektiv und hochempfindlich

Roland Krämer\*

Das Design von Chelatliganden für die selektive Komplexierung von Metallionen ist seit mehreren Jahrzehnten ein zentrales Anliegen der Koordinations- und der supramolekularen Chemie. Durch Kombination des Erkennungsprozesses mit einer leicht quantifizierbaren Signaltransduktion werden chemische Sensoren für Metallionen zugänglich. Zu den Eigenschaften eines „idealen Sensors“ zählen hohe Selektivität für ein Metallion, hohe Empfindlichkeit, schnelles und reversibles Ansprechverhalten, In-situ-Funktion bis hinab in die Mikrometer-Dimension sowie einfache Handhabung. Signaltransduktion auf Fluoreszenzbasis<sup>[1]</sup> hat den Vorteil der außerordentlichen Empfindlichkeit und der unmittelbaren Anwendbarkeit in Sensoren mit Glasfaseroptik. Eine neue Generation von fluoreszierenden Verbindungen, in denen eine Chelateinheit und ein Fluorophor diskrete Unter-einheiten eines Moleküls sind,<sup>[2]</sup> hat das Potential, den genannten Ansprüchen gerecht zu werden. Versuche, diese Zweikomponentensysteme zur Detektion von Übergangsmetallionen einzusetzen, waren mit  $\text{Cu}^{2+}$  besonders erfolgreich. Dies überrascht nicht, da Kupfer(II) unter den bedeutenderen Übergangsmetallionen eine besonders hohe Affinität zu typischen N,O-Chelatliganden hat und gleichzeitig eine schnelle Kinetik der Metallionenbindung beobachtet wird. Kupfer ist wegen seiner vielfältigen technischen Verwendung ein in der Umwelt verbreitetes Metall und gleichzeitig ein essentielles Spurenelement in biologischen Systemen. Während es im Vergleich zu anderen Schwermetallen für den Menschen nur wenig toxisch ist, werden Mikroorganismen bereits durch submikromolare Konzentrationen beeinträchtigt. Gegenüber klassischen Fluoreszenzsensoren für  $\text{Cu}^{2+}$ , in denen die Donoratome Teil des Fluorophor- $\pi$ -Systems sind,<sup>[3]</sup> ermöglicht die räumliche Trennung von chelatbildender Gruppe und Fluorophor ein viel flexibleres Design. Das

wiederum ist die Voraussetzung für die gezielte Optimierung der Sensoreigenschaften im Hinblick auf spezielle Anwendungen.

Im Fluoreszenzsensor **1** von Fabrizzi et al. ist eine metallbindende Dioxetetraazaeinheit mit einem lichtemittierenden Anthracenfragment verknüpft (Schema 1).<sup>[4]</sup> Unter den in



Schema 1. Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch **1**.

den letzten Jahren beschrieben Kupfer(II)-Fluoreszenzsensoren dieser Art<sup>[5]</sup> zeichnet sich **1** durch reversibles Ansprechverhalten auf nanomolare  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen bei geringer Querempfindlichkeit gegenüber einer Reihe von anderen Übergangsmetallionen und Protonen aus. Bei Bestrahlung mit 372-nm-Licht zeigt **1** eine intensive Emissionsbande bei 415 nm. Die Fluoreszenz wird durch Koordination eines Kupferions vollständig gelöscht, wahrscheinlich durch einen lichtinduzierten Elektronentransfer vom Metallzentrum zum Fluorophor. Die Kupferkonzentration wird durch Messung der Fluoreszenzintensität mit einem Fluorimeter ermittelt. Metallbindung und Signaltransduktion sind schnell und vollständig reversibel. Die untere Nachweisgrenze liegt bei einer Konzentration von 100 nM  $\text{Cu}^{2+}$ . Bei pH 7.1 wird das Ansprechverhalten durch  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  in äquimolarer Konzentration nicht beeinflusst, da diese Metalle nicht an den Rezeptor binden. Die Selektivität beruht auf der hohen Affinität von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu Stickstoffdonoren und auf

[\*] Dr. R. Krämer

Anorganisch-chemisches Institut der Universität  
Wilhelm-Klemm-Straße 8, D-48149 Münster  
Fax: (+49) 251-83-38366  
E-mail: KRAMERR@NWZ.UNI-MUENSTER.DE