

in ihrem Titel ankündigen. Die chemischen (desaminierende Spaltung) und enzymatischen Methoden sind dieselben wie in der eingangs zitierten *Science*-Arbeit,^[1] aber die Analyse der Abbauprodukte erfolgt im ersten Fall^[13] durch Anionenaustauschchromatographie der Tritium-markierten Oligosaccharide, im zweiten Beispiel^[14] durch Gelelektrophorese nach reduktiver Aminierung mit einem Fluorophor. Beide Arbeiten kommen ohne Massenspektrometrie aus.

Bei den vorgestellten Anwendungsbeispielen handelt es sich durchgehend um isolierte, chemisch einheitliche Hexa- bis Decasaccharide. Isolate von natürlichen Oligosacchariden sind häufig mikroheterogen und müssen üblicherweise erst sorgfältig gereinigt werden. Die Bausteinanalyse durch Kapillarelektrophorese ist auch bei Sasisekharan und Mitarbeitern essentiell für die Eingrenzung der möglichen Sequenzen. Worin liegt der Fortschritt dieser Strategie? Die MALDI-MS-Analyse erfordert nach Aussage der Autoren keine erneute Isolierung und Reinigung der Spaltprodukte nach den verschiedenen Manipulationen. Außerdem sehen sie für ihren Ansatz das Potential einer voll automatischen Sequenzierungsmethode, wenn erst mit besser untersuchten und spezifischeren Enzymen die Werkzeuge für einen definierten Partialabbau komplexer Polysaccharide zur Verfügung stehen und so ein verfeinerter und leistungsfähigerer Algorithmus entwickelt werden kann. Dies wird um so wichtiger sein, wenn es in Zukunft gelingen soll, größere Sequenzen sowie

Gemische von Oligosacchariden auf ähnliche Weise zu analysieren und so den Aufwand für Fraktionierung von biologischem Material zu reduzieren, eine Herausforderung, auf deren Bewältigung man gespannt sein kann.

- [1] G. Venkataraman, Z. Shriver, R. Raman, R. Sasisekharan, *Science* **1999**, 286, 537–542.
- [2] M. Maccarana, Y. Sakura, A. Tawada, K. Yoshida, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 17804–17810.
- [3] H. Egge, J. Peter-Katalinic, *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, 6, 331–393.
- [4] V. N. Reinhold, B. B. Reinhold, C. E. Costello, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1772–1784.
- [5] P. Juhasz, K. Biemann, *Carbohydr. Res.* **1995**, 270, 131–147.
- [6] Y. Mechref, A. G. Baker, M. V. Novotny, *Carbohydr. Res.* **1998**, 313, 145–155.
- [7] J. Lemoine, F. Chirat, B. Domon, *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 908–912.
- [8] N. Viseux, C. E. Costello, B. Domon, *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 364–376.
- [9] C. W. Sutton, J. A. O'Neill, J. S. Cottrell, *Anal. Biochem.* **1994**, 218, 34–46.
- [10] B. Küster, T. J. P. Naven, D. J. Harvey, *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 1131–1140.
- [11] Y. Mechref, M. V. Novotny, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 455–463.
- [12] B. Finke, B. Stahl, A. Pfenninger, M. Karas, H. Daniel, G. Sawatzki, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3755–3762.
- [13] R. R. Vivès, D. A. Pye, M. Salmivirta, J. J. Hopwood, U. Lindahl, J. T. Gallagher, *Biochem. J.* **1999**, 339, 767–773.
- [14] J. E. Turnbull, J. J. Hopwood, J. T. Gallagher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 2698–2703.

Direkter Nachweis von H-Brücken in Biopolymeren durch NMR-Spektroskopie

Gerd Gemmecker*

Professor Horst Kessler zum 60. Geburtstag gewidmet

Das Wissen um Existenz und Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen ist heute in der Chemie Allgemeingut. Das Konzept der Wasserstoffbrücken spielt eine wichtige Rolle bei der Erklärung der physikochemischen Eigenschaften von Wasser, anorganischen und organischen Säuren sowie säure- und basenkatalysierten Reaktionen. Wasserstoffbrücken beeinflussen konformative Präferenzen und die Reaktivität vieler Klassen von organischen Verbindungen.

In der Biochemie sind Wasserstoffbrücken verantwortlich für die Selektivität der Basenpaarungen in Nucleinsäuren – die Grundlage der Speicherung und Vererbung genetischer Information. Weiterhin spielen Wasserstoffbrücken eine ent-

scheidende Rolle bei der räumlichen Faltung von Proteinen: Ihre wichtigsten Strukturelemente – helicale Bereiche und β -Faltblätter – werden durch ihr spezifisches Wasserstoffbrückenmuster definiert und stabilisiert.

Schließlich tragen Wasserstoffbrücken zur Affinität und Selektivität bei der molekularen Erkennung bei, von einfachen Wirt-Gast-Systemen bis hin zu den Multikomponentenkomplexen aus Proteinen, Nucleinsäuren etc., die die Grundlage vieler biologischer Funktionen bilden.

Bei der experimentellen Strukturaufklärung durch Röntgenbeugung oder NMR-Spektroskopie konnte bisher allerdings immer nur sehr indirekt auf die Anwesenheit von Wasserstoffbrücken geschlossen werden, indem man in der fertigen hochaufgelösten Struktur nach entsprechend zueinander angeordneten Wasserstoffbrückendonor- und -akzeptorgruppen suchte. Gerade in der NMR-Spektroskopie wurden viele Verfahren entwickelt, um indirekt aus Parametern wie Protonenaustauschgeschwindigkeiten, isotropen und anisotropen chemischen Verschiebungen, Deuterium-Quadru-

[*] Priv.-Doz. Dr. G. Gemmecker
Institut für Organische Chemie und Biochemie
TU München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-mail: Gerd.Gemmecker@ch.tum.de

polaufspaltungen und Deuterium-Isotopenverschiebungen auf die Existenz und Lage von Wasserstoffbrücken zu schließen.

Auf der XVIII. International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS) in Tokio im August 1998 berichteten Andrew Dingley und Stephan Grzesiek über ihre Beobachtung von skalaren Kopplungen über Wasserstoffbrücken hinweg, und zwar innerhalb der Watson-Crick-Basenpaare in einem ^{15}N -markierten RNA-69mer (die Ergebnisse erschienen noch im selben Monat in gedruckter Form).^[1] In einem NMR-Experiment zur Beobachtung von skalaren Kopplungen zwischen ^{15}N -Kernen (also einer Art ^{15}N -COSY-Spektrum) tauchten recht intensive Kreuzsignale auf (Abbildung 1), die nur Korrelationen zwischen N3 eines Uridin- und N1 eines Adenosinrestes bzw. N1 eines Guanodin- und N3 eines Cytosinrestes zugeordnet werden konnten, die jeweils über die Wasserstoffbrücken innerhalb eines U-A- bzw. G-C-Watson-Crick-Basenpaares verknüpft waren (Abbildung 2).

Grzesieks Enthüllungen führten zu einer äußerst lebhaften Diskussion und natürlich zu etlichen kritischen Fragen, ob die beobachteten Korrelationen denn nicht auch durch andere Mechanismen erklärt werden könnten, z. B. durch dipolare Kreuzkorrelation. Grzesieks experimentelle Daten bewiesen jedoch recht überzeugend, dass sich die geheimnisvolle Korrelation über die Wasserstoffbrücken in jeder Hinsicht wie eine skalare Kopplung von ca. 6.5–7.0 Hz verhält.

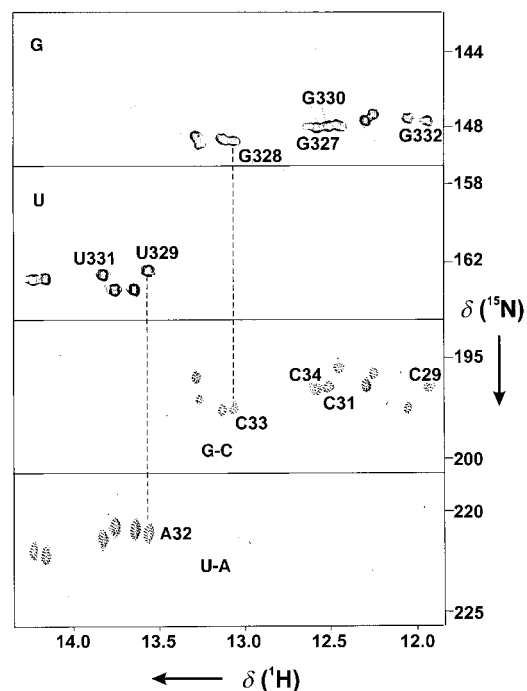


Abbildung 1. Ausschnitte aus dem HNN-COSY-Spektrum einer ^{13}C , ^{15}N -markierten, 69 Nucleotide umfassenden RNA-Domäne.^[1] Die oberen beiden Ausschnitte zeigen die COSY-„Diagonalsignale“, d. h. ^{15}N -Spins (in F1) korreliert mit ihrem direkt gebundenen Proton (in F2). Die Kreuzsignale in den unteren beiden Ausschnitten werden dagegen durch ^{15}N - ^{15}N -Korrelationen über eine $^2J_{^{15}\text{N},^{15}\text{N}}$ -Kopplung über die Wasserstoffbrücken innerhalb eines Watson-Crick-Basenpaares verursacht; die Korrelationen G328-N1/C33-N3 und U329-N3/A32-N1 sind beispielhaft durch die gestrichelten Linien angedeutet. (Übernommen mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society 1998.)

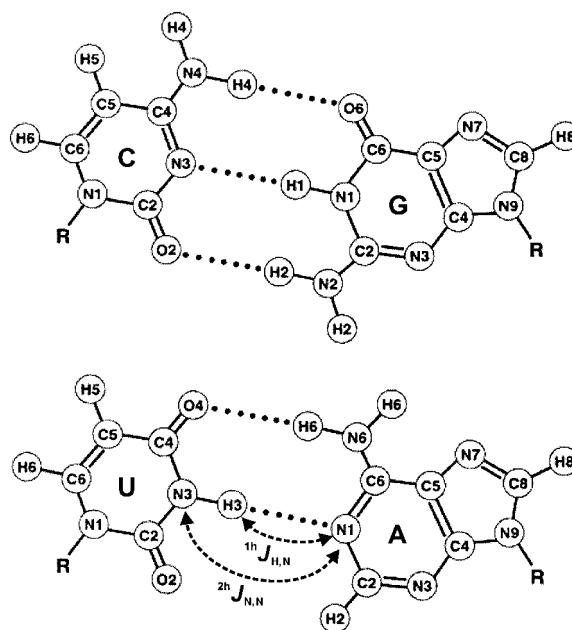


Abbildung 2. Wasserstoffbrückenmuster in den Watson-Crick-Basenpaaren Uridin-Adenosin (U-A) und Cytidin-Guanosin (C-G).

Es ist wohlbekannt, dass Wasserstoffbrücken nicht nur rein ionische Wechselwirkungen aufgrund elektrostatischer Anziehung sind, sondern einen erheblichen kovalenten Bindungsanteil aufweisen können. Damit erscheint die Existenz einer skalaren Kopplung über eine Wasserstoffbrücke hinweg im Prinzip möglich, ja sogar wahrscheinlich. Die große Überraschung in Grzesieks Ergebnissen war die Größe der beobachteten Kopplung: 7 Hz entsprechen in etwa der durchschnittlichen Kopplung zwischen vicinalen Protonen in einem H-C-C-H-Fragment – Kopplungen von ^{15}N -Kernen sind gewöhnlich viel kleiner. Die beobachtete Kopplung ist im Prinzip eine $^2J_{^{15}\text{N},^{15}\text{N}}$ -Kopplung, also eine Kopplung über zwei Bindungen; um zu betonen, dass es sich dabei nicht um zwei übliche Bindungen, sondern um eine Wasserstoffbrücke handelt, schlug Kurt Wüthrich (der die gefundenen Werte bald bestätigte) dafür das Symbol $^2J_{^{15}\text{N},^{15}\text{N}}$ vor.^[2]

In Anbetracht der Größe der $^2J_{^{15}\text{N},^{15}\text{N}}$ -Kopplung erscheint es interessant, nach einer $^1J_{\text{H},^{15}\text{N}}$ -Kopplung über Wasserstoffbrücken zu suchen, die potentiell noch leichter nachweisbar sein sollte. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Wüthrich belegen allerdings, dass die $^1J_{\text{H},^{15}\text{N}}$ -Kopplung nur ca. 2–4 Hz beträgt.^[2]

Es gibt bereits seit längerem Berichte über skalare Kopplungen zwischen zwei räumlich benachbarten Spins, die nicht über normale kovalente Bindungen übertragen werden (z. B. zwischen ^{15}N - und ^{19}F -Atomen).^[3, 4] Diese wurden mit dem etwas missverständlichen Begriff „J-Kopplungen durch den Raum“ belegt, obwohl es sich dabei um echte skalare Kopplungen handelt, die durch die Valenzelektronen vermittelt werden. Vor einigen Jahren wurde solche eine skalare Kopplung bereits zwischen einem Amidproton und einem ^{113}Cd -Spin in einer N-H...S-Cd-Wasserstoffbrücke eines Cd-substituierten Eisen-Schwefel-Proteins gemessen.^[5] Kürzlich untersuchten die Arbeitsgruppen von Limbach und Denisov die ^{19}F - ^1H ... ^{15}N -Wasserstoffbrücke im Komplex aus Fluorwasserstoff und Trimethylpyridin bei tiefen Tempe-

raturen. Sie fanden ein ähnliches Muster von (temperaturabhängigen) skalaren Kopplungen: $^1J_{\text{H,N}} = 39\text{--}54\text{ Hz}$, $^1J_{\text{F,H}} = 15\text{--}105\text{ Hz}$ und $^2J_{\text{F,N}} = 96\text{ Hz}$.^[6] Auch hier war die Kopplung über zwei Bindungen im Mittel deutlich größer als die beiden Kopplungen über eine Bindung, was nahelegt, dass die Molekülorbitale mit starkem s-Anteil am ^{19}F - und am ^{15}N -Zentrum nur wenig s-Charakter am Brücken-Wasserstoffatom selbst aufweisen.

Das Phänomen der skalaren Kopplungen über N–H...N-Wasserstoffbrücken in Nucleinsäuren hinweg und ihre Abhängigkeit von der Wasserstoffbrücken-Geometrie konnte mittlerweile mit Dichtefunktional-Rechnungen reproduziert und „erklärt“ werden.^[7] Die Rechnungen stimmten mit den experimentell ermittelten Werten darin überein, dass die $^2J_{\text{N,N}}$ -Kopplung deutlich größer und weniger stark vom N–N-Abstand abhängig ist als die $^1J_{\text{H,N}}$ -Kopplung (Abbildung 3).

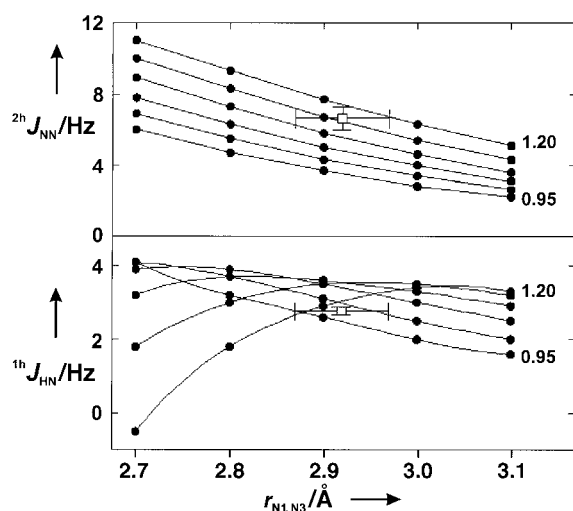


Abbildung 3. Größe der $^2J_{^{15}\text{N}_1,^{15}\text{N}_3}$ (oben) und der $^1J_{\text{H}_1,^{15}\text{N}_3}$ -Kopplung (unten) als Funktion der Länge $r_{\text{N}_1, \text{N}_3}$ der Wasserstoffbrücke, berechnet mit Hilfe der Dichtefunktionaltheorie für ein G–C-Fragment und N1–H1-Abstände von 0.95–1.20 Å (siehe Angaben am rechten Rand).^[7] Die offenen Rechtecke und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Abweichungen von $r_{\text{N}_1, \text{N}_3}$ aus DNA-Röntgenstrukturen. (Übernommen mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society 1999.)

Nach dem Nachweis der Existenz und der experimentellen Zugänglichkeit der skalaren Kopplungen über Wasserstoffbrücken hinweg begaben sich mehrere Gruppen sofort auf die Suche nach ähnlichen Kopplungen in Proteinen. Hier ist der Wasserstoff-Acceptor in der Regel ein Carbonyl-Sauerstoffatom im Peptidrückgrat und kein Stickstoffatom wie im Falle der Nucleinsäuren (eine $^2J_{\text{N,N}}$ -Kopplung wurde allerdings kürzlich zwischen zwei Histidin-Seitenketten in Apomyoglobin nachgewiesen^[8]). Leider gibt es kein (zu ^{15}N analoges) für NMR-Messungen gut geeignetes Sauerstoffisotop: Das Hauptisotop ^{16}O ist magnetisch nicht aktiv, und die beiden anderen Stabilisotope ^{17}O und ^{18}O weisen ein Quadrupolmoment auf. In einer $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -angereicherten Proteinprobe (wie sie heute generell für NMR-Untersuchungen eingesetzt werden) ist der nächste geeignete Spin auf der Acceptorseite einer Wasserstoffbrücke das Carbonylkohlenstoffatom $^{13}\text{C}'$. Über eine N–H...O=C-Wasserstoffbrücke hinweg kann man

daher die Kopplung über zwei Bindungen, $^2J_{\text{H,C}}$, und die Kopplung über drei Bindungen, $^3J_{\text{N,C}'}$, erwarten (Abbildung 4).

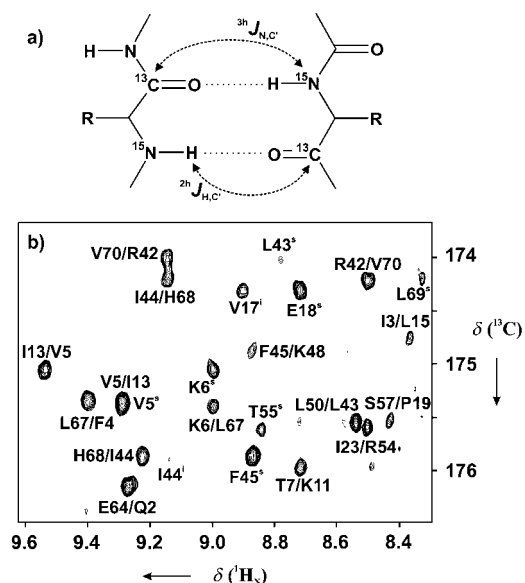


Abbildung 4. a) Nomenklatur für Kopplungen über Wasserstoffbindungen in Proteinen. b) Ausschnitt aus einem auf kleine $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -Kopplungen optimierten HNCO-Spektrum von humanem Ubiquitin.^[9] Einige Kreuzsignale stammen von nicht vollständig unterdrückten $^1J_{\text{N,C}'}$ (mit s indiziert) sowie $^2J_{\text{N,C}'}$ -Kopplungen (Index i). Die Mehrzahl der Signale korreliert jedoch zwei über Wasserstoffbrücken verknüpfte Aminosäuren über eine skalare $^3J_{\text{N,C}'}$ -Kopplung von 0.3–0.9 Hz. (Übernommen mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society 1999.)

Wiederum konnte die Kopplung über die längere Distanz, $^3J_{\text{N,C}'}$, von Cordier und Grzesiek zuerst gefunden werden,^[9] kurz darauf gefolgt von ähnlichen Resultaten aus der Arbeitsgruppe von Ad Bax.^[10] Zum Nachweis dieser Kopplung war nicht einmal eine neue Pulssequenz nötig, es genügte eine kleine Modifikation am HNCO-Experiment, einer Standardtechnik, die von NMR-Spektroskopikern seit längerem für die Korrelation von Amidproton zum Amidstickstoffatom und weiter zum unmittelbar benachbarten Carbonylkohlenstoffatom der Aminosäure $i-1$ verwendet wird, wobei die Kopplungen über eine Bindung $^1J_{\text{H},^{15}\text{N}}$ (ca. 92 Hz) und $^1J_{^{15}\text{N},^{13}\text{C}'}$ (ca. 15 Hz) genutzt werden (Abbildung 4). Der Magnetisierungstransfer in diesen Experimenten erreicht ein Maximum von zurzeit $1/2J$ und einen Nulldurchgang bei ganzzahligen Vielfachen von $1/J$. Für den Nachweis der viel kleineren Kopplung $^3J_{^{15}\text{N},^{13}\text{C}'}$ über die Wasserstoffbrücke hinweg muss daher nur die Zeit des Transfers von ^{15}N auf $^{13}\text{C}'$ von ca. 33 ms (dem Maximum für $^1J_{^{15}\text{N},^{13}\text{C}'}$) auf stolze 133 ms (das Maximum für eine Kopplung von ca. 3–4 Hz und einen Nulldurchgang für $^1J_{^{15}\text{N},^{13}\text{C}'}$) verlängert werden. Im Ergebnis wird daher die direkte 1J -Korrelation zwischen $^{15}\text{N}_i$ und $^{13}\text{C}'_{i-1}$ unterdrückt und eine andere, schwächere Korrelation kann in der Tat beobachtet werden: vom Amidstickstoffatom zum Carbonylkohlenstoffatom auf der anderen Seite einer Wasserstoffbrückenbindung!

Die ersten Experimente wurden an dem kleinen Protein Ubiquitin durchgeführt, für das sowohl alle ^{15}N - und ^{13}C -

Zuordnungen als auch die räumliche Struktur bekannt sind. Die im auf kleine $^3\text{hJ}_{15\text{N},13\text{C}'}$ -Kopplungen optimierten HNCO-Spektrum gefundenen Korrelation stimmten hervorragend mit dem bekannten Wasserstoffbrückenmuster von Ubiquitin überein. Die $^3\text{hJ}_{15\text{N},13\text{C}'}$ -Kopplung selbst erwies sich jedoch als relativ klein und betrug nur ca. 0.3–0.5 Hz in α -helicalen Bereichen und 0.5–0.9 Hz im β -Faltblatt. Für Proteine mit ihren typischen Linienbreiten von über 10 Hz sind dies extrem kleine Kopplungskonstanten, und es verwundert daher nicht, dass sie nicht schon früher zufällig beobachtet worden sind.

Auch hier gelang es wieder, aus umfangreichen experimentellen Daten einen quantitativen Zusammenhang zwischen der Länge der Wasserstoffbrücke (d.h. dem ^{15}N - $^{13}\text{C}'$ -Abstand) und der Größe der $^3\text{hJ}_{15\text{N},13\text{C}'}$ -Kopplungskonstante aufzustellen, wonach die Kopplung für ^{15}N - $^{13}\text{C}'$ -Abstände über ca. 3.2 Å unter 0.2 Hz fällt.^[11]

In der Zwischenzeit ist auch die $^2\text{hJ}_{1\text{H},13\text{C}'}$ -Kopplung beobachtet worden, deren Kopplungskonstante noch geringfügig unter den 0.4–0.6 Hz der Kopplung über drei Bindungen liegen.^[12] Die $^2\text{hJ}_{1\text{H},13\text{C}'}$ -Kopplung ist jedoch noch aus anderen Gründen deutlich schwieriger zu beobachten als die $^3\text{hJ}_{15\text{N},13\text{C}'}$ -Kopplung, und zwar wegen der Störung durch die größeren „normalen“ ^2J - und ^3J -Kopplungen zwischen den Amidprotonen und $^{13}\text{C}'$ im Proteinerückgrat. Kürzlich konnte sogar die $^3\text{hJ}_{1\text{H},13\text{C}'}$ -Kopplung von Meissner und Sørensen nachgewiesen und quantifiziert werden.^[13]

Es ist absehbar, dass der direkte Nachweis von Wasserstoffbrückendonoren und -acceptoren die NMR-Untersuchungen von Nucleinsäuren deutlich vereinfachen wird, indem die Existenz, die genaue Lage und sogar die Länge der Wasserstoffbrücken bei der Basenpaarung experimentell zugänglich werden.^[14] Bei Proteinen ist die Anwendung dagegen wegen der geringen Größe der zugänglichen Kopplungen über die Wasserstoffbrücke hinweg etwas problematischer. Es steht jedoch zu erwarten, dass sich diese Kopplungen durch Kombination mit dem TROSY-Ansatz auch bei größeren Proteinen als nützlich erweisen werden. Das TROSY-Konzept (TROSY = Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy, Spektroskopie mit optimierter trans-

versaler Relaxation) wurde vor etwa zwei Jahren in der Arbeitsgruppe von Wüthrich entwickelt und ermöglicht es, die normalerweise mit steigender Molekülgröße zunehmenden Linienbreiten und Relaxationsgeschwindigkeiten deutlich zu verringern.^[15] Aufgrund der sehr langen Zeiten, die für die Entwicklung der kleinen skalaren Kopplungen über die Wasserstoffbrücken hinweg im NMR-Experiment benötigt werden, ist hier eine Herabsetzung der Relaxationsverluste entscheidend. Die TROSY-Technik ist daher praktisch von Anfang an für die Detektion der kleinen Wasserstoffbrücken-Kopplungen eingesetzt worden.^[1, 2] Kombiniert mit dem Einsatz von (bis auf die austauschenden Protonen) perdeuterierten Proteinproben sollten so Messungen von Kopplungen über Wasserstoffbrücken hinweg auch bei Strukturuntersuchungen an Proteinen mittlerer Größe bald eine wichtige Rolle spielen.

- [1] A. J. Dingley, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8293–8297.
- [2] K. Pervushin, A. Ono, C. Fernandez, T. Szyperski, M. Kainosho, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14147–14151.
- [3] B. J. Kimber, J. Feeney, G. C. K. Roberts, B. Birdsall, D. V. Griffiths, A. S. V. Burgen, *Nature* **1978**, *271*, 184–185.
- [4] F. B. Mallory, E. D. Luzik, C. W. Mallory, P. J. Carroll, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 366–370.
- [5] P. R. Blake, B. Lee, M. F. Summers, M. W. W. Adams, J.-B. Park, Z. H. Zhou, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 527–533.
- [6] N. S. Golubev, I. G. Shenderovich, S. N. Smirnov, G. S. Denisov, H.-H. Limbach, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 492–497.
- [7] A. J. Dingley, J. E. Masse, R. D. Peterson, M. Barfield, J. Feigon, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6019–6027.
- [8] M. Hennig, B. H. Geierstanger, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5123–5126.
- [9] F. Cordier, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1601–1602.
- [10] G. Cornilescu, J.-S. Hu, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2949–2950.
- [11] G. Cornilescu, B. E. Ramirez, M. K. Frank, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6275–6279.
- [12] F. Cordier, M. Rogowski, S. Grzesiek, *J. Magn. Reson.* **1999**, *140*, 510–512.
- [13] A. Meissner, O. W. Sørensen, *J. Magn. Reson.* **2000**, *143*, im Druck.
- [14] J. Wohnert, A. J. Dingley, M. Stoldt, M. Gorch, S. Grzesiek, L. R. Brown, *Nucl. Acids Res.* **1999**, *27*, 3104–3110.
- [15] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366–12371.