

Strukturell diverse Isomere des μ -Conotoxins PIIIA blockieren den Natriumkanal $\text{Na}_v1.4^{**}$

Alesia A. Tietze, Daniel Tietze, Oliver Ohlenschläger, Enrico Leipold, Florian Ullrich, Toni Kühn, André Mischo, Gerd Buntkowsky, Matthias Görlach, Stefan H. Heinemann und Diana Imhof*

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (voltage-gated sodium channels, VGSCs) spielen eine Schlüsselrolle für die elektrische Aktivität von Neuronen und anderen erregbaren Zellen.^[1] Bestimmte VGSC-Subtypen ($\text{Na}_v1.3$, 1.7, 1.8 und 1.9) werden im peripheren Nervensystem exprimiert und vermitteln die Übertragung von Signalen, die zur Wahrnehmung verschiedener Formen von Schmerz, wie Nozizeption ($\text{Na}_v1.8$) und akutem inflammatorischem ($\text{Na}_v1.7$) und neuropathischem ($\text{Na}_v1.2$) Schmerz führen.^[2] Daher sind VGSCs potentielle Ziele für neue Analgetika, idealerweise solche mit hoher Spezifität für bestimmte Kanäle. Unter den bekannten Natriumkanal-Antagonisten sind μ - und μO -Conotoxine aus den Giften mariner Kegelschnecken wegen ihres analgetischen Potentials von besonderem Interesse.^[2a,3] μ -Conotoxine sind 14- bis 26-mer Peptide mit 6 Cysteinresten (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).^[4] Sie inhibieren muskuläre und/oder neuronale VGSCs, indem sie die Kanalpore blockieren.^[5] Die spezifische Verteilung der Cysteinreste, $\text{CCX}_n\text{CX}_n\text{CX}_n\text{CC}$, verleiht der dreidimensionalen Struktur dieser Toxine eine konformationelle Restriktion durch Ausbildung von drei Disulfidbindungen. Es ist allgemein akzeptiert, dass die native Faltung der Toxine folgende Konnektivität zeigt: Cys1–Cys4, Cys2–Cys5 und Cys3–Cys6 (Nummerierung entsprechend der Reihenfolge in der Aminosäure-

sequenz).^[3,5b] Dreidimensionale Strukturen sind jedoch nur für eine Auswahl von μ -Conotoxinen verfügbar: PIIIA,^[6] GIPIA,^[7] GIPIB,^[8] TIPIA,^[2c] SmPIIA,^[9] SIPIA^[10] und KIPIA^[11] (Tabelle S1).

Bei der Synthese Disulfid-verbrückter Conopeptide ist die Oxidation zum korrekt gefalteten Isomer der schwierigste Schritt, der durch eine hohe Anzahl an Cysteinen zusätzlich noch erschwert wird. μ -Conotoxine mit ihren sechs Cysteinresten können bei der Oxidation fünfzehn verschiedene Disulfid-verbrückte Isomere bilden, wobei man davon ausgeht, dass bestimmte Konformationen energetisch begünstigt sind.^[12] Biologische Aktivität nicht nativ gefalteter Isomere von μ -Conotoxinen konnte bisher nicht nachgewiesen werden, und die Rolle des konservierten Musters der Disulfidkonnektivität ist ebenfalls noch unklar. Das nicht nativ gefaltete Isomer des 15-meren α -Conotoxins AuIB (zwei Disulfidbindungen) zeigte aber beispielsweise eine nahezu zehnfach größere Potenz als das nativ gefaltete Peptid.^[13] Dieses Ergebnis sowie die weit größere Komplexität der dreifach Disulfid-verbrückten μ -Conotoxine machte uns auf deren Vertreter μ -PIPIA aus der Kegelschnecke *Conus purpurascens* aufmerksam (Abbildung 1).^[5d,6,14]

Wir haben die NMR-Struktur von μ -PIPIA, das aus synthetischem Material durch oxidative Faltung in wässriger Lösung gewonnen wurde,^[15] in Lösung bestimmt. Im Resultat der Synthese wurde dabei die reproduzierbare Bildung verschiedener Disulfid-verbrückter Peptidomere beobachtet (Abbildung 1a–c und S1). Die drei Hauptkomponenten des Rohprodukts, bezeichnet als μ -PIPIA-1, -2 und -3 (**1–3**), wurden gereinigt und weiteren Analysen unterzogen (Abbildung S2, Tabellen S2–S5). Das Auftreten verschiedener μ -PIPIA-Isomere in einer aus oxidativer Faltung gewonnenen Mischung konnte zwar bereits zuvor gezeigt werden, jedoch wurde für diese Peptide keine Strukturanalyse durchgeführt.^[14a,c]

Die Lösungsstruktur von synthetisch hergestelltem μ -PIPIA ist ebenfalls bereits ermittelt worden,^[6] und darüber hinaus wurde das Vorhandensein einer Haupt- und Nebenkongformation basierend auf dem Auftreten von *cis/trans*-Isomerisierung an der Phe7-Hyp8- und/oder Lys17-Hyp18-Peptidbindung diskutiert. Allerdings wurde die dreidimensionale Struktur nur für das Hauptisomer bestimmt (PDB ID: 1R9I) und für das Nebenisomer lediglich modelliert.^[6]

Die Struktur der μ -PIPIA-Isomere **1** und **2** (Abbildung 1c) wurde durch ¹H-NMR-Spektroskopie ermittelt. Die gute Verteilung der chemischen Verschiebung der Rückgrat-¹H-Resonanzen für μ -PIPIA-1 und μ -PIPIA-2 erlaubte eine ein-

[*] A. A. Tietze, T. Kühn, Prof. Dr. D. Imhof
Pharmazeutische Chemie I, Pharmazeutisches Institut
Universität Bonn, Brühler Straße 7, 53119 Bonn (Deutschland)
E-Mail: dimhof@uni-bonn.de

Dr. D. Tietze, Prof. Dr. G. Buntkowsky
Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie
Technische Universität Darmstadt
Petersenstraße 20, 64287 Darmstadt (Deutschland)

Dr. O. Ohlenschläger, A. Mischo, Dr. M. Görlach
Biomolekulare NMR-Spektroskopie
Leibniz-Institut für Altersforschung, Fritz-Lipmann-Institut
Beutenbergstraße 11, 07745 Jena (Deutschland).

Dr. E. Leipold, F. Ullrich, T. Kühn, Prof. Dr. S. H. Heinemann
Lehrstuhl für Biophysik, Center for Molecular Biomedicine, Friedrich-Schiller-Universität Jena und Universitätsklinikum Jena
Hans-Knöll-Straße 2, 07745 Jena (Deutschland)

[**] Wir danken Prof. C. Hertweck (HKI Jena) für die Nutzung des MALDI-TOF-MS/MS-Instruments und Dr. U. Neugebauer (IPHT Jena) für die Aufnahme der Raman-Spektren. Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die Friedrich-Schiller-Universität Jena, den Freistaat Thüringen und das Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201107011> zu finden.

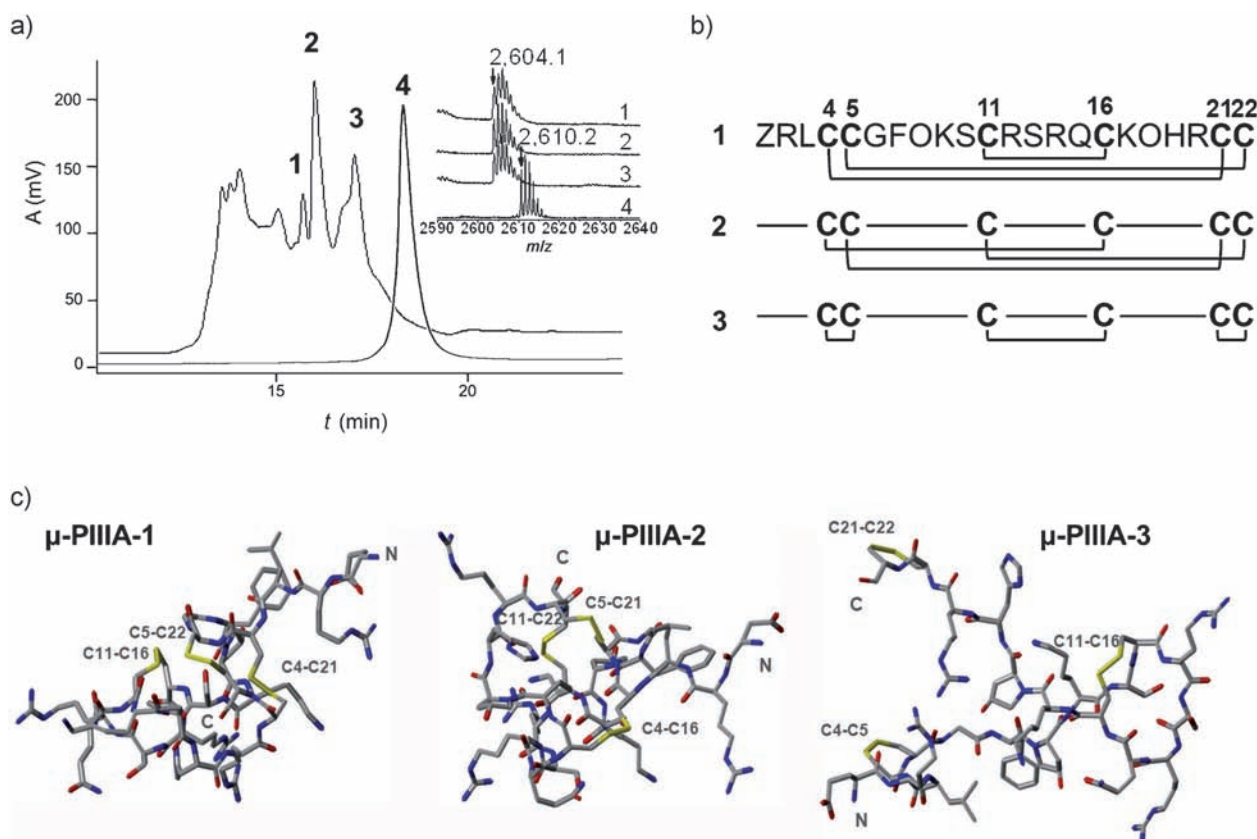


Abbildung 1. Untersuchung von μ -PIIIA-Oxidationsprodukten. a) RP-HPLC-Chromatogramm von μ -PIIIA aus oxidativer Faltung in Puffer unter Zusatz von GSH/GSSG bei 4 °C unter Argonatmosphäre.^[14c, 15a,b] Die Elution erfolgte auf einer Vydac-C18-Säule (250×4.6 mm) mit den Laufmitteln A (Wasser/0.1 % TFA (Trifluoressigsäure)) und B (Acetonitril/0.1 % TFA) und dem linearen Gradienten: 10–40 % Eluent B in 30 min. MALDI-TOF-Massenspektren der Peptide **1** (μ -PIIIA-1), **2** (μ -PIIIA-2) und **3** (μ -PIIIA-3) im Vergleich zur reduzierten Form **4**. Die $[M+H]^+$ -Peaks bei m/z 2610.20 Da (reduzierte Vorstufe) und 2604.10 Da (oxidierte Produkte) sind markiert. b) Drei (1–3) von 15 möglichen Disulfid-Konnektivitäten der μ -PIIIA-Sequenz und Nummerierung der Cysteinreste in der Sequenz. Regionen zwischen den Cysteinen sind als Loopregionen definiert. c) NMR-Lösungsstrukturen von μ -PIIIA-1 (links) und μ -PIIIA-2 (Mitte) sowie ein strukturelles Modell des gestreckten μ -PIIIA-3 (rechts).

deutige Resonanzzuordnung und lieferte einen ersten Hinweis auf eine gut definierte Struktur dieser Peptide. Drei der vier X-Hyp-Peptidbindungen in μ -PIIIA-1 und -2 wurden, basierend auf der Beobachtung eines starken Kern-Overhauser-Effekts zwischen $H^{\alpha}_i-H^{\delta}_{i+1}$ und der Abwesenheit von $H^{\alpha}_i-H^{\alpha}_{i+1}$ -Kreuzsignalen für die Phe7-Hyp8- und Lys17-Hyp18-Peptidbindungen, jeweils als *trans* festgelegt. Für μ -PIIIA ist dies konsistent mit den Ergebnissen von Nielsen und Mitarbeitern.^[6] Die Lösungsstruktur der μ -PIIIA-Isomere **1** und **2** wurde anhand der NOE-Daten berechnet (Tabelle S5). Die Struktur beider μ -PIIIA-Isomere ist durch eine kompakte globale Faltung charakterisiert (Abbildung S3a,b), Aminosäuren mit langen Seitenketten sind nach außen, in das Lösungsmittel, gerichtet (Abbildung 1c). Insgesamt unterscheiden sich jedoch die Strukturen beider Isomere stark voneinander (Standardabweichung (rmsd) gesamt: 5.68 Å). Allerdings zeigen beide Isomere auch α -helikale Elemente zwischen Phe7 und Arg12, die mit einer Rückgrat-rmsd von 0.46 Å überlagern. Die Disulfidverbrückungen der Peptide wurden durch Auswertung der NOEs zwischen den Cysteinresten bestätigt und lagen bei μ -PIIIA-1 zwischen Cys4–Cys21, Cys5–Cys22 und Cys11–Cys16, was sich in der Intensität der entsprechenden diagnostischen NOE-Kreuzsignale

Cys11H $^{\alpha}$ –Cys16H $^{\beta}$ (mittel), Cys11H $^{\alpha}$ –Cys16H N (schwach) und Cys5H $^{\alpha}$ –Cys22H $^{\beta}$ (mittel) widerspiegelt. Hingegen wurde ein anderes Verbrückungsmuster (Cys4–Cys16, Cys5–Cys21 und Cys11–Cys22) für μ -PIIIA-2 identifiziert, angezeigt durch NOE-Kreuzsignale für Cys4H $^{\beta}$ –Cys16H $^{\beta}$ (stark), Cys5H $^{\beta}$ –Cys22H $^{\beta}$ (schwach) und Cys11H $^{\beta}$ –Cys22H $^{\beta}$ (stark). Demgegenüber schien das dritte Isomer μ -PIIIA-3 zu flexibel für eine Strukturbestimmung zu sein, was sich an der niedrigeren Dispersion der Protonenresonanzen zeigte (Abbildung S4). Diese erhöhte Flexibilität ist durch eine Disulfidkonnektivität zwischen Cys4–Cys5, Cys11–Cys16 und Cys21–Cys22 bedingt, die mittels Trypsin-Proteolyse und MALDI-TOF-MS/MS nachgewiesen werden konnte (Abbildung S5).

Ein genauerer Blick auf die drei Isomerstrukturen zeigt, dass nur μ -PIIIA-2 die für native μ -Conotoxine als typisch beschriebene Cysteinverbrückung enthält. Daher haben wir die biologische Aktivität der μ -PIIIA-Isomere **1–3**, auf ihre Potenz hin untersucht, den heterolog in HEK-293-Zellen exprimierten Skelettmuskelkanal Na $_v$ 1.4 zu blockieren (Abbildung 2 und S6). Überraschenderweise blockierten alle drei unterschiedlich gefalteten Isomere Na $_v$ 1.4-vermittelte Ionenströme, die elektrophysiologisch in der Whole-cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Methode gemessen wurden. Die

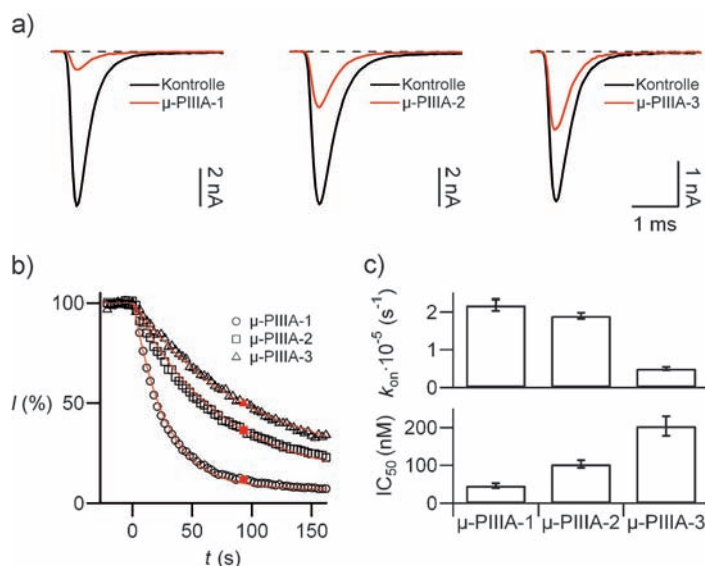


Abbildung 2. Blockierung von Natriumkanälen durch μ -PIIIA-Isomere. $\text{Na}_v1.4$ -Natriumkanäle wurden transient in HEK293-Zellen exprimiert, und Natriumströme wurden durch wiederholte Depolarisationen auf -10 mV hervorgerufen. a) Repräsentative Stromspuren vor (Kontrolle, schwarz) und 90 s nach der Applikation von $1 \mu\text{M}$ des angezeigten μ -PIIIA-Isomers (rot). b) Zeitverlauf des normalisierten Maximalstroms nach Toxinapplikation bei $t=0$. Durchgezogene Linien repräsentieren Daten nach einfach-exponentieller Anpassung, die gefüllten Symbole zeigen die in (a) gezeigten Stromspuren an. c) Mittlere Geschwindigkeitskonstante der Blockierung (k_{on} , oben) und ermittelte IC_{50} -Werte (unten) für die angezeigten Toxinisomere aus Experimenten mit unterschiedlichen Toxinkonzentrationen (Abbildung S6).

inhibitorische Aktivität, bestimmt in Experimenten mit unterschiedlichen Toxinkonzentrationen (Abbildung S6), verringerte sich in der Reihenfolge μ -PIIIA-1 > μ -PIIIA-2 > μ -PIIIA-3. Die mittleren Werte für die IC_{50} waren 46.7 ± 6.5 nM für μ -PIIIA-1, 103.2 ± 9.9 nM für μ -PIIIA-2 und 203.7 ± 25.7 nM für μ -PIIIA-3, während vollständig reduziertes μ -PIIIA nicht aktiv war (nicht gezeigt). Die beobachtete Aktivität korreliert mit den CD-Daten (Abbildung S2), die eine Verringerung der gefalteten Konformation in der Reihenfolge μ -PIIIA-1 > μ -PIIIA-2 > μ -PIIIA-3 > reduziertes μ -PIIIA nahelegen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass ungefaltetes μ -PIIIA-Vorläuferpeptid nicht in der Lage ist, eine geeignete Konformation einzunehmen, um den Na_v -Kanal zu blockieren, und dass die Faltung von Isomer 1 gegenüber der bisher angenommenen nativen Faltung von Isomer 2 bevorzugt ist. Dies deutet darauf hin, dass μ -PIIIA-1 potenter als das μ -PIIIA-2-Isomer ist, dessen Faltung als die native vorgeschlagen wurde.^[6]

Mitglieder der μ -Familie von Conotoxinen diskriminieren zwischen Na_v -Kanal-Subtypen. Für μ -PIIIA ist beispielsweise bekannt, dass es Tetrodotoxin-sensitive Na_v -Kanäle ($\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.4$) inhibiert, eine Präferenz für Muskel gegenüber Nerv zeigt und einen vernachlässigbaren Effekt auf TTX-resistente Na_v -Kanäle ($\text{Na}_v1.5$) hat.^[2c,6,14b,c] Die molekulare Basis für eine solche Kanalselektivität zu verstehen, ist essentiell für die Entwicklung spezifischer VGSC-Inhibitoren auf Conotoxin-Basis. Im Kontext der Identifizierung kanalseitiger Ligandenbindungsstellen und dem daraus erlangten Verständ-

nis über die Wirkung von Conotoxinen konnten Untersuchungen, die auf Strukturen spannungsgesteuerter Kaliumkanäle (VGPCs) basieren, kürzlich Aufmerksamkeit erregen. Zum Beispiel zeigte der mittels NMR-Spektroskopie untersuchte Komplex aus Charybdotoxin (38-meres Peptid mit 6 Cysteinen) und der Kanalpore von KcsA (Reste 1–132) einige Stellen auf der Oberfläche des Kanalproteins, für die eine Interaktion mit dem Toxin nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip vorgeschlagen wurde.^[16] Ein anderes Beispiel ist der Komplex aus Kalitoxin (38-meres Peptid mit 6 Cysteinen) und einer Chimäre aus den Kanälen KcsA und $\text{K}_v1.3$, dessen Struktur mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie bestimmt wurde.^[17] Interessanterweise zeigten diese Studien, dass die lange Seitenkette von Lysin-27 (K27) in die Kanalpore eindringt, während andere Aminosäuren (R24, N30) mit langen Seitenketten den Kanal durch zusätzliche Interaktionen mit spezifischen Resten auf der extrazellulären Seite des Proteins blockieren. Diese Erkenntnisse führten uns zu Vermutungen über die Aktivität der verschiedenen μ -PIIIA-Isomere im Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines konservierten basischen Rests, Lysin oder Arginin (R14 in μ -PIIIA) in allen μ -Conotoxinen, der zu K27 in Kalitoxin homolog ist. Ein Vergleich der Strukturen von μ -PIIIA-1 und -2 zeigte eine erhöhte Ähnlichkeit, ersichtlich aus einem rmsd-Wert 1.13 \AA (Abbildungen S3 und S7) in der Rückgratregion bestehend aus den Aminosäuren 7–15, wo sich R14 (Loop 2) befindet. μ -PIIIA-2 weist eine große Ähnlichkeit zu der früher bestimmten NMR-Lösungsstruktur von μ -PIIIA (PDB ID: 1R9I, Abbildungen S3 und S7) auf,^[7b] insbesondere für die Reste 1–12 (N-terminal). Es zeigt im Vergleich zu μ -PIIIA_{1R9I} eine verlängerte und reguläre α -Helix mit einer Rückgrat-rmsd von 1.13 \AA für die Reste 4–13. Hingegen hat dieser Bereich in μ -PIIIA-1 eine Rückgrat-rmsd von 2.35 \AA . Trotz unterschiedlicher Disulfidkonnektivitäten offenbaren die drei Isomerstrukturen von μ -PIIIA eine vergleichbare Flexibilität und eine dem Lösungsmittel zugewandte Seitenkette R14. Diese Erkenntnis könnte ihre generelle Fähigkeit erklären, den VGSC $\text{Na}_v1.4$ zu blockieren.

Um unsere Ergebnisse besser zu verstehen, haben wir zusätzlich Molekulardynamiksimulationen der drei Isomere im Komplex mit $\text{Na}_v1.4$ durchgeführt (Abbildungen S8–S12). Die simulierte Struktur von $\text{Na}_v1.4$ basiert auf der kürzlich publizierten Kristallstruktur des VGSC Na_vAB ^[18] (Abbildung S9). Passend zu den Ergebnissen der elektrophysiologischen Experimente blockierten in den Simulationen alle Isomere die Kanalpore von $\text{Na}_v1.4$ (Abbildung 3 und S10–S12). Der Rest R14 von μ -PIIIA-1 bindet dabei im Vergleich zu μ -PIIIA-2 und μ -PIIIA-3 viel tiefer in der Pore, was uns zu der Schlussfolgerung führte, dass eine tiefere Insertion des Toxins in die Pore eine Schlüsselvoraussetzung für eine hochaffine Bindung sein könnte. Ähnlich könnte die Isomerspezifische Toxinbindung an $\text{Na}_v1.4$ den besseren IC_{50} -Wert für μ -PIIIA-1 im Vergleich zu den Isomeren 2 und 3 erklären.

Da sich die aktiven Isomere von μ -PIIIA in ihrer Faltung, nicht jedoch in ihrer primären Aminosäuresequenz unterscheiden, stellen sie in jedem Fall interessante neue Werk-

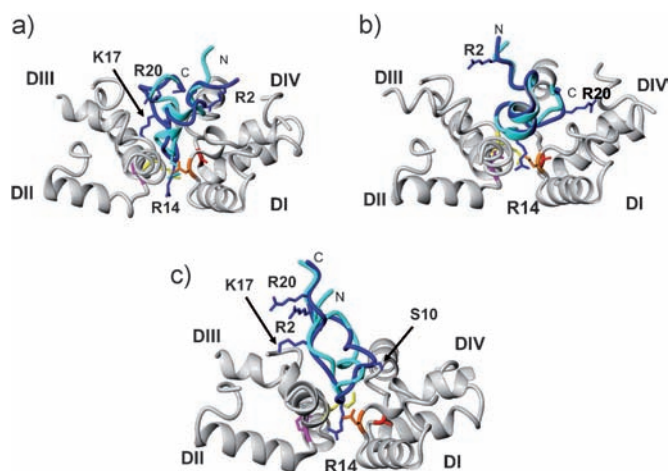


Abbildung 3. MD-Simulationen gebundener μ -PIIIA-Isomere: a) μ -PIIIA-1, b) μ -PIIIA-2 und c) μ -PIIIA-3 am Porenvorhof von $\text{Na}_v1.4$ (Homologiemodell basierend auf dem VGSC $\text{Na}_v\text{AB}^{[18]}$). Zur besseren Übersicht sind S5–S6 von DI–DIV ausgeblendet. Die P-Loops sind grau dargestellt, die Aminosäurereste des DEKA-Selektivitätsfilters sind folgendermaßen markiert: Asp400 (orange), Glu755 (magenta), Lys1237 (gelb), Ala1529 (rot). Die Peptidstrukturen (blau) repräsentieren die Konformationen nach MD-Simulation und die initialen Strukturen (cyan) von μ -PIIIA-1, μ -PIIIA-2 (energieminimierte NMR-Strukturen dieser Peptide) und μ -PIIIA-3 (MD-äquilibrierte Struktur nach 5.85 ns Simulation). Die rmsd-Werte der Strukturen betragen 5.26 Å (a), 2.89 Å (b) und 3.34 Å (c). Alignments erfolgten entsprechend einem Algorithmus für multiple Strukturalignments (MUSTANG)^[19] mit YASARA.^[20]

zeuge für die Strukturaufklärung und Untersuchung der Funktionsweise spannungsgesteuerter Ionenkanäle dar. Da unsere Ergebnisse neue und unerwartete Einblicke in die Wirkung von μ -Conotoxinen bieten, ohne dass wir dafür die chemische Zusammensetzung dieser Liganden verändern mussten, liefern die gewonnenen Erkenntnisse einen großen Anreiz, auch die Forschung an Mitgliedern anderer Conotoxin-Familien zu intensivieren.

Eingegangen am 4. Oktober 2011,
veränderte Fassung am 22. Dezember 2011
Online veröffentlicht am 12. März 2012

Stichwörter: Conotoxin · Disulfidkonnektivität · Natriumkanäle · NMR-Spektroskopie · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

- [1] F. H. Yu, W. A. Catterall, *Genome Biol.* **2003**, *4*, 207.1–207.7.
[2] a) J. N. Wood, J. P. Boorman, K. Okuse, M. D. Baker, *J. Neurobiol.* **2004**, *61*, 55–71; b) S. G. Waxman, *Nature* **2006**, *444*, 831–832; c) R. J. Lewis, C. I. Schroeder, J. Ekberg, K. J. Nielsen, M.

- Loughnan, L. Thomas, D. A. Adams, R. Drinkwater, D. J. Adams, P. F. Alewood, *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 676–685.
[3] H. Terlau, B. M. Olivera, *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 41–68.
[4] a) Q. Kaas, J. C. Westermann, D. J. Craik, *Toxicol.* **2010**, *55*, 1491–1509; b) Q. Kaas, J. C. Westermann, R. Halai, C. K. Wang, D. J. Craik, *Bioinformatics* **2008**, *24*, 445–446.
[5] a) R. J. French, D. Yoshikami, M. F. Sheets, B. M. Olivera, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2153–2161; b) R. B. Jacob, O. M. McDougal, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 17–27; c) R. A. Li, I. L. Ennis, R. J. French, S. C. Dudley, Jr., G. F. Tomaselli, E. Marban, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11072–11077; d) J. R. McArthur, G. Singh, M. L. O'Mara, D. McMaster, V. Ostroumov, D. P. Tieleman, R. J. French, *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 219–227.
[6] K. J. Nielsen, M. Watson, D. J. Adams, A. K. Hammarstrom, P. W. Gage, J. M. Hill, D. J. Craik, L. Thomas, D. Adams, P. F. Alewood, R. J. Lewis, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 27247–27255.
[7] K. Wakamatsu, D. Kohda, H. Hatanaka, J. M. Lancelin, Y. Ishida, M. Oya, H. Nakamura, F. Inagaki, K. Sato, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12577–12584.
[8] J. M. Hill, P. F. Alewood, D. J. Craik, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8824–8835.
[9] D. W. Keizer, P. J. West, E. F. Lee, D. Yoshikami, B. M. Olivera, G. Bulaj, R. S. Norton, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46805–46813.
[10] S. Yao, M. M. Zhang, D. Yoshikami, L. Azam, B. M. Olivera, G. Bulaj, R. S. Norton, *Biochemistry* **2008**, *47*, 10940–10949.
[11] K. K. Khoo, Z. P. Feng, B. J. Smith, M. M. Zhang, D. Yoshikami, B. M. Olivera, G. Bulaj, R. S. Norton, *Biochemistry* **2009**, *48*, 1210–1219.
[12] T. Kimura in *Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Vol. E22b* (Hrsg.: M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo), Thieme, Stuttgart, **2002**, S. 142–161.
[13] J. L. Dutton, P. S. Bansal, R. C. Hogg, D. J. Adams, P. F. Alewood, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48849–48857.
[14] a) E. Fuller, B. R. Green, P. Catlin, O. Buczek, J. S. Nielsen, B. M. Olivera, G. Bulaj, *FEBS J.* **2005**, *272*, 1727–1738; b) P. Safo, T. Rosenbaum, A. Shcherbatko, D. Y. Choi, E. Han, J. J. Toledo-Aral, B. M. Olivera, P. Brehm, G. Mandel, *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 76–80; c) K. J. Shon, B. M. Olivera, M. Watkins, R. B. Jacobsen, W. R. Gray, C. Z. Floresca, L. J. Cruz, D. R. Hillyard, A. Brink, H. Terlau, D. Yoshikami, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 4473–4481.
[15] a) R. DeLa Cruz, F. G. Whitby, O. Buczek, G. Bulaj, *J. Pept. Res.* **2002**, *61*, 202–212; b) A. A. Miloslavina, E. Leipold, M. Kijas, A. Stark, S. H. Heinemann, D. Imhof, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 72–77; c) S. Zorn, E. Leipold, A. Hansel, G. Bulaj, B. M. Olivera, H. Terlau, S. H. Heinemann, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1360–1364.
[16] L. Yu, C. Sun, D. Song, J. Shen, N. Xu, A. Gunasekera, P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, *Biochemistry* **2005**, *44*, 15834–15841.
[17] A. Lange, K. Giller, S. Hornig, M. F. Martin-Eauclaire, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, *Nature* **2006**, *440*, 959–962.
[18] J. Payandeh, T. Scheuer, N. Zheng, W. A. Catterall, *Nature* **2011**, *475*, 353–358.
[19] A. S. Konagurthu, J. C. Whisstock, P. J. Stuckey, A. M. Lesk, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2006**, *64*, 559–574.
[20] E. Krieger, T. Darden, S. B. Nabuurs, A. Finkelstein, G. Vriend, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2004**, *57*, 678–683.