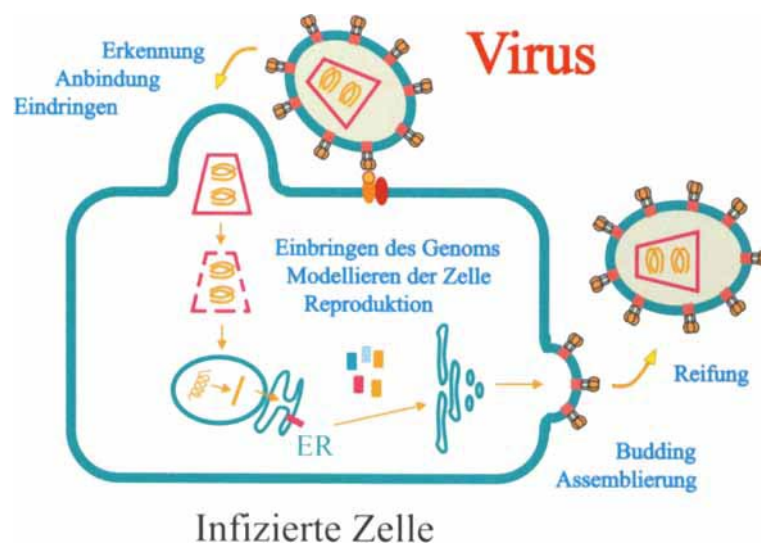


## Virale Ionenkanäle: Bildung, Modelling, Drug Targeting

**Viren manipulieren den Stoffwechsel einer infizierten Zelle zu ihren Gunsten. Dafür nutzen sie kleine Proteine, die Ionenkanäle bilden. Doch wie lagern sich diese Proteine zu funktionellen, membrandurchspannenden Einheiten zusammen? Leitfähigkeitsmessungen und Computersimulation sind zwei der vielen Methoden, die dazu beitragen, die Vorgänge zu verstehen und letztlich neue antivirale Wirkstoffe zu entwerfen.**

Abb. 1. Lebenszyklus eines Virus am Beispiel von HIV-1, schematische Darstellung. Das Ionenkanalbildende Protein Vpu ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) rot eingezeichnet, farbige Rechtecke stellen virale Makromoleküle dar; siehe auch Infokasten auf S.1217).



virale Ionenkanäle ihrer geringen Größe wegen in der Bionanotechnik für Sensorarrays, zur Medikamentenentwicklung, als Filter oder zur Konstruktion künstlicher Kanäle genutzt werden können. Auf die Anwendungen wird hier jedoch nicht eingegangen.

Virale Ionenkanäle sind für einige Viren, z.B. Poliovirus, überlebenswichtig, für andere Viren wie HIV-1 dienen sie lediglich dazu, die Vermehrung zu steigern. Die bisher bekannten kanalbildenden Proteine bestehen aus ein oder zwei Bereichen, die aus überwiegend hydrophoben Aminosäuren aufgebaut sind und sich daher in Lipidmembranen einlagern und diese durchspannen können. Das Strukturmotiv für diesen Transmembranbereich (TM-Bereich) ist für alle heute bekannten viralen Proteine eine Helix. Influenza, HIV-1, Hepatitis-C-Virus (HCV), Poliovirus oder SARS-Coronavirus sind nur einige der Viren, deren Genom für Ionenkanalbildende Proteine kodiert.

### Die Datenlage

◆ Einer der am besten untersuchten Kanäle ist M2 von Influenza A. Um in die Wirtszelle eindringen zu können, bindet das Virus über Erkennungs-

◆ Lipidmembranen bilden für Ionen und polare Substanzen eine nahezu unüberwindliche Barriere. Für den Metabolismus der Zelle ist es jedoch essentiell, die Barriere für Substrate in geordneten Bahnen permeabel zu machen. Während der Evolution wurden daher hochspezifische Membranproteine, die Ionenkanäle, entwickelt, die zum Beispiel elektrochemische Gradienten über eine Membran hinweg modulieren.

Ionenkanäle von Zellen sind Heterooligomere aus vier oder fünf assemblierten Proteinen, welche typischerweise aus jeweils ungefähr 500 Aminosäuren aufgebaut sind. Viren

nutzen für ihren Lebenszyklus ebenfalls solche Proteine (Abbildung 1).<sup>1)</sup> Allerdings bestehen die Proteine, welche die viralen Ionenkanäle konstituieren, lediglich aus ungefähr 50 bis 100 Aminosäuren, sind also „miniaturisierte“ Ausgaben der Kanäle höherer Organismen und bilden Homooligomere (Tabelle).

Untersuchungen an viralen Ionenkanälen werden in der Medizin immer wichtiger – man denke nur an hochinfektiöse, sich den Menschen anpassende Viren aus tierischen Organismen, für die keine Impfstoffe bereit stehen – und zudem liegt die Frage nahe, inwieweit

proteine an die Zellmembran der Wirtszelle, die sich daraufhin einstülpt und einen Vesikelkörper (Endosom) um das Virus bildet. Das Innere des Endosoms wird dann von der Zelle angesäuert. Dies geschieht mit membranständigen V-Typ-ATPasen (Protonenpumpen). Die Protonierung von Histidinresten im TM-Bereich von M2 führt zur Öffnung der durch M2 gebildeten Kanäle und dem Einfließen von Protonen in das Innere des Viruskörpers. Als Folge tritt eine Reihe struktureller Änderungen an Proteinen innerhalb des Virus auf. Eines dieser Proteine, das Hämagglutinin, leitet daraufhin die Fusion der viralen Membran mit der des Endosoms ein und führt damit zur Infektion der Zelle.

Über die Struktur des Ionenkanalbildenden Proteins Vpu von HIV-1 ist dank umfangreicher NMR-spektroskopischer Studien und dessen einfacher Zusammensetzung sehr viel bekannt.<sup>2)</sup> Vpu besteht aus einem helicalen TM-Bereich und einem längeren cytoplasmatischen Abschnitt. In der infizierten Zelle tritt der cytoplasmatische Abschnitt mit CD4, dem Rezeptorprotein der T-Helferzellen, in Wechselwirkung und induziert dadurch dessen Abbau durch das zell-eigene Verdauungssystem.

Der TM-Bereich ist indirekt am Austritt neuer HI-Viren aus der infizierten Zelle (Budding) beteiligt. Aller Wahrscheinlichkeit nach assemblieren fünf Vpu-Proteine<sup>1)</sup> zu schwach kationenselektiven Kanälen, modulieren dadurch den elektrochemischen Gradienten in der Nähe der Plasmamembran und begünstigen das Budding.

Für andere, erst kürzlich entdeckte kanalbildende Proteine stehen spärlichere Strukturinformationen zur Verfügung. Im Gegensatz zu M2 und Vpu werden für p7 von HCV und 2B des Poliovirus zwei TM-Bereiche vermutet. Das Protein Kcv des Pflanzenvirus PBCV-1 soll, das legen Sequenzhomologien nahe, K<sup>+</sup>-Kanälen ähneln. Andere Proteine werden als Ionenkanalbildend eingestuft, da sie, in künstliche Lipidmembranen integriert (Rekonstitution), Kanalaktivität zeigen.

| Protein | Virus              | Familie          | Länge | Selektivität  |
|---------|--------------------|------------------|-------|---------------|
| 3A      | Poliovirus         | Picornaviridae   | 87    |               |
| 2B      | Polio/Coxsackie B3 | Picornaviridae   | 99    |               |
| 6K      | Alphavirus         | Togaviridae      | 58–61 | Kation        |
| E       | SARS-Coronavirus   | Coronaviridae    | 76    | Kation        |
| Kcv     | PBCV-1             | Phycodnaviridae  | 94    | Kation        |
| M2      | Influenza A        | Orthomyxoviridae | 97    | Proton        |
| NB      | Influenza B        | Orthomyxoviridae | 100   | Kation/Proton |
| p7      | HCV                | Flaviviridae     | 63    | Kation        |
| Vpr     | HIV-1              | Retroviridae     | 96    | Kation        |
| Vpu     | HIV-1              | Retroviridae     | 81    | Kation        |

Die viralen kanalbildenden Proteine werden im rauen endoplasmatischen Retikulum produziert und in die intrazelluläre Membran integriert. Die Zahl der Proteine, die jeweils einen Kanal bilden, ist mit Ausnahme von M2 allerdings für sämtliche Kanäle unbekannt. Wenn die Kanäle gebildet sind, sollten sie schaltbar sein (Gating), d. h. geöffnet und geschlossen werden können und letztlich auch durch Liganden blockierbar oder modulierbar sein – wichtig für die Entwicklung von Medikamenten gegen virale Infektionen. In Bezug auf das Gating ist ebenfalls M2 am besten verstanden.

#### ◆ Der Lebenszyklus von Viren

Der virale Lebenszyklus umfasst in etwa folgende Phasen:

- Der Virus erkennt und bindet über Erkennungsproteine an die spezifischen Rezeptormoleküle der Wirtszelle und dringt dann in die Zelle ein.
- Das virale Genom wird in die Zelle eingebracht und verändert das Zellmilieu so, dass die Zelle virale Makromoleküle reproduziert.
- Die Virushülle sowie das Erbgut des Virus assemblieren an intrazellulären Membranen oder an der Plasmamembran und treten dann schließlich aus der Zelle aus.
- Eventuell reift das Virus außerhalb der Zelle weiter, d. h. die Makromoleküle innerhalb des Virus ändern ihre Struktur.

#### Experimentelle Struktur- und Funktionsanalyse

◆ Neben physiologischen Untersuchungen sind Leitfähigkeitsmessungen mit künstlichen Membranen eine wichtige Methode zur Bestimmung der Kanalaktivität (Abbildung 2). Dabei wird das Protein oder auch nur sein TM-Bereich in einer Lipidmembran rekonstituiert. Die Proteine werden über Expression erhalten, während der TM-Bereich üblicherweise über Festphasen-Peptidsynthese hergestellt wird. Die künstlichen Membranen werden über Aperturen von ungefähr 150 µm ge-

Tabelle.

*Bekanntes virales Ionenkanalbildendes Membranprotein. Die Kanalaktivität ist durch Rekonstitution der Proteine in künstlichen Lipidmembranen nachgewiesen. Die Länge ist durch die Zahl der Aminosäuren ausgedrückt.*

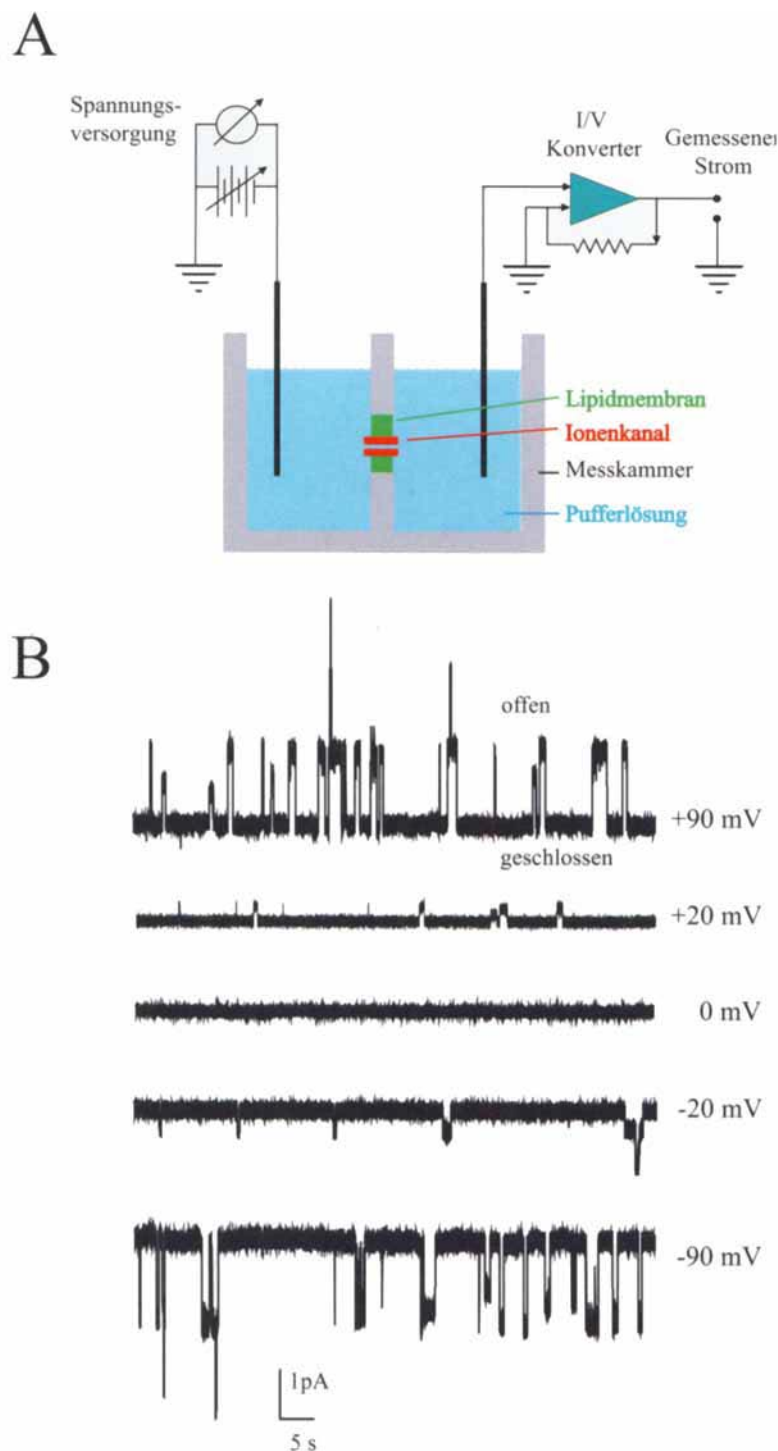


Abb. 2.

**A) Apparatur für Leitfähigkeitsmessungen an Lipidmembranen, schematische Darstellung.** Die Lipidmembran (grün) überspannt eine Apertur von ungefähr 150  $\mu\text{m}$ . In dieser Membran wird der Kanal (rot) rekonstituiert. Über Elektroden (schwarz) wird die Spannung angelegt. **B) Leitfähigkeitsmessungen mit einem Peptid, das den ersten 32 Aminosäuren von Vpu (HIV-1) entspricht und dessen TM-Bereich umfasst.** Aufgetragen ist der gemessene Strom als Funktion der über eine Membran abfallenden Spannung. Die Kanalöffnungen werden durch einen sprunghaften Anstieg des Stromes angezeigt. Diese erhöhten Leitfähigkeiten können einige Millisekunden bis hin zu Sekunden andauern.

spannt. Die durch Rekonstitution und nachfolgender Selbstassemblierung gebildeten Kanäle weisen Leitfähigkeiten zwischen 10 und 40 pS auf<sup>(3-6)</sup> (Abbildung 2B) und liegen damit in der gleichen Größenordnung wie die der großen Kanäle in der Wirtszelle. Auf Grund der geringen Größe der viralen Ionenkanäle gestalten sich Röntgenstrukturanalysen äußerst schwierig. Daher sind Methoden wie NMR-, CD- oder FTIR-Spektroskopie die wichtigsten Quellen für Strukturinformationen (Übersicht in Lit.<sup>1)</sup>). Oftmals mangelt es aber an experimentellen Daten. In diesem Fall bieten insbesondere computergestützte Simulationen eine weitere wesentliche Möglichkeit, um zu Aussagen über Struktur und Funktionsweise viraler Ionenkanäle zu gelangen und ermöglichen ein Screening nach potenziellen Liganden.

#### Modellierung der Kanäle

◆ Für M2 und Vpu ergibt sich aus den Programmen zur Vorhersage der Sekundärstruktur von TM-Bereichen in Membranproteinen ein einziger solcher Bereich. Die Existenz einzelner Aminosäurereste innerhalb dieses Bereiches gibt Hinweise darauf, wie die Proteine im homooligomeren Bündel angeordnet sind. So sind beispielsweise zwei M2-Proteine über Disulfidbrücken (Cysteinreste) kovalent miteinander verbunden, und zwei dieser dimeren Einheiten bilden dann einen tetrameren Kanal. In dieser Anordnung weisen Histidinreste in die Pore; sie sind die Schlüsselaminosäuren zur Öffnung des Kanals und zur Protonenleitung.

Vpu hat im TM-Bereich eine hydrophile Aminosäure, Serin (Abbildung 3A). Eine Orientierung des Serinrests ins Bündelinnere erscheint naheliegend und deckt sich mit dem Wissen um dessen Ausrichtung in anderen Kanälen, beispielsweise den nikotinischen Acetylcholinrezeptor. In diesem Fall befindet sich der Tryptophanrest eines Vpu-Proteins am äußeren Rand des Bündels. Dabei handelt es sich um eine Position, die auch bei anderen Kanälen zu fin-

den ist. Tryptophan verankert Proteine innerhalb der Lipidmembran.

Die Analyse der Primärsequenz von p7 ergibt zwei hydrophobe TM-Bereiche, die durch eine kurze Aminosäuresequenz miteinander verbunden sind. Diese müssen sich zunächst in der richtigen Weise zusammenlagern, bevor ein homooligomeres Bündel und damit ein Kanal gebildet werden kann. Diese vergleichsweise komplizierte Kanal-konstruktion erfordert für Computersimulationen die Anwendung differenzierter Analysestrategien.

Die möglichen Orientierungen der beiden transmembranen Helices können unter Berücksichtigung intermolekularer Wechselwirkungen bestimmt werden. Für diese Orientierungsexperimente eignet sich das Programm CNS (Crystallography & NMR System) mit entsprechenden Anwendungsroutinen, beispielsweise CHI (CNS-Helix-Interaction). Damit erhält man ein Monomer, das daraufhin repliziert und in einem Bündel angeordnet werden kann. Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von p7 geht ein Porendurchmesser von etwa 2,3 nm und ein Außendurchmesser des Bündels von 3 bis 5 nm hervor.

Diese Daten können dann mit denen verglichen werden, die sich an Hand der computergestützten Modelle errechnen lassen. Die beste Übereinstimmung ergibt sich, wenn ein hexameres Bündel erstellt wird.

### Computergestützte Analyse

◆ Ist ein Kanalmodell erstellt, müssen strukturelle (z. B. die Neigung der Helices des Proteins) oder funktionelle Daten (z. B. Leitfähigkeit) errechnet werden (Übersicht in Lit.<sup>7)</sup>), die durch Experimente verifiziert werden können. Die Fragen, welche es dann weiterhin zu beantworten gilt, lassen sich wie folgt zusammenfassen: Wie weit dringen Blocker in die Pore, und, wie öffnet und schließt der Kanal?

Für die Vorhersage der Leitfähigkeit gibt es eine Reihe von Berechnungsmöglichkeiten. Sie berücksichtigen Strukturdetails in unterschiedlichem Maß und können für alle Ionenkanäle genutzt werden. Ein Kanal kann als einfache Röhre betrachtet und der Ionenfluss auf Basis der kontinuierlichen Elektrodifusionstheorie (Nernst-Planck-Beziehung) berechnet werden. Der Einfluss des durch die Ionen im Kanal erzeugten

### ◆ Strukturvorhersagen und Berechnung der Leitfähigkeit

Programme zur Vorhersage der Sekundärstruktur ermöglichen, den membrandurchspannenden Bereich eines Proteins zu ermitteln. Die Vorhersage basiert darauf, dass in den membrandurchspannenden Bereichen vermehrt hydrophobe Aminosäuren wie Isoleucin oder Valin auftreten. Dieses Phänomen zusammen mit anderen Hinweisen gestattet dann, die Länge des Bereichs zu prognostizieren. Ebenso ist aus Experimenten bekannt, dass eine  $\alpha$ -Helix das überwiegende Strukturmotiv für den membrandurchspannenden Teil ist. Eine  $\beta$ -Faltblattmotiv nehmen nur wenige Proteine an. Mit Brownschen-Dynamik-Simulationen wird die Ionenbewegung in

einem engen Kanal auf Basis der Langevin-Gleichung in diskreten Zeitschritten unter einem angelegten Potential berechnet. Daraus erhält man die Zahl der Ionen, die den Kanal pro Zeiteinheit passieren (Strom).

Erweiterte Rechnungen berücksichtigen das Profil der freien Energie eines Ions im Kanal, um die Vorhersagegenauigkeit zu erhöhen. Das Profil erhält man durch Nichtgleichgewichts-MD-Simulationen, wie Steered MD-Simulationen oder „Umbrella Sampling“. Im ersten Fall wird das Ion durch die Pore gezogen, im zweiten Fall wird durch ein Potential das Ion an diskreten Positionen entlang des Kanals festgehalten.

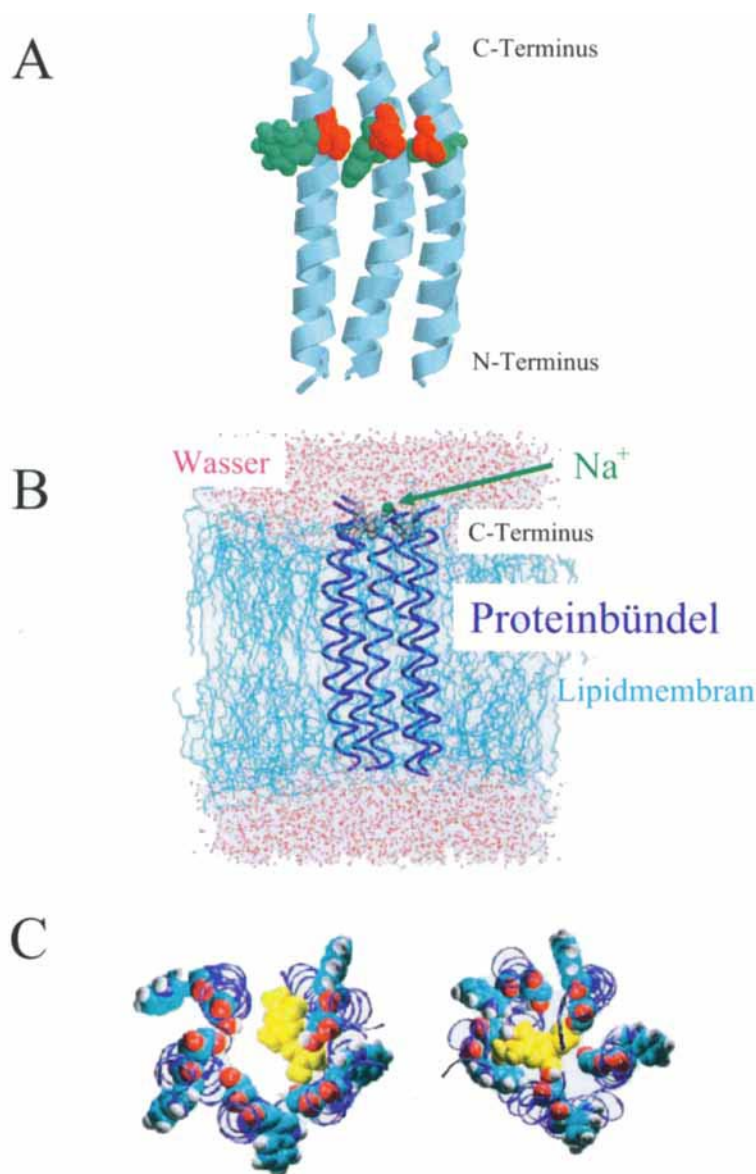


Abb. 3. Computermodelle der ersten 32 Aminosäuren von Vpu ( $Vpu_{1-32}$ ).

A) Drei Helices, die zu einem Ionenkanal assembliert sind. Um den Blick auf das Poreninnere freizumachen, wurden zwei von insgesamt fünf Helices entfernt. Am oberen Ende (C-Terminus) weisen Serinreste (rot) in das Innere der Pore. Die Tryptophanreste (grün) zeigen nach außen. Zum N-Terminus hin kleiden hydrophobe Aminosäuren (Isoleucin, Leucin, Valin; nicht gezeigt) das Poreninnere aus.

B) Seitenansicht des hydratisierten pentameren Bündels von  $Vpu_{1-32}$  (blaue Helices; Wassermoleküle als rote Winkel), eingebaut in eine Lipidmembran (hellblau). Ein  $Na^+$ -Ion (grüne Kugel) kann in Steered-MD-Simulationen durch die Pore gezogen werden. Die Aminosäure Arginin in jeder Helix ist in grau gezeigt.

C) Blick vom C-Terminus in die Pore eines  $Vpu_{1-32}$ -Kanals. Die Lipid- und Wassermoleküle sind der Übersichtlichkeit halber weggelassen. Die Strukturen ergaben sich nach einer MD Simulationszeit von 12 ns. Die blockenden Moleküle (gelb) wurden vor Beginn der Simulation in die Bündel eingesetzt; die Koordinaten stammen aus Dockingsimulationen. Im linken Bündel ist die Positionierung eines Moleküls des nicht blockierenden Wirkstoffs Amilorid (3,5-Diamino-6-chlor-N-(diaminomethylen)pyrazincarboxamid) gezeigt, im rechten Bündel diejenige des blockierenden Derivats 5-(N,N-Hexamethylen)amilorid.

Potenzials auf die Flussdichte wird hierbei mit der Poisson-Gleichung beschrieben und in die Rechnungen implementiert (Poisson-Nernst-Planck-Berechnungen). Die daraus resultierenden gekoppelten partiellen Differentialgleichungen werden dann selbstkonsistent gelöst. Mittlerweile werden jedoch zunehmend auch Strukturinformationen wie die Verteilung von Ladungen entlang der Kanalwand in solche Rechnungen einbezogen.

Andere Methoden zur Leitfähigkeitsbestimmung, zum Beispiel Brownsche-Dynamik-Simulationen, berechnen die Bewegung einzelner Ionen innerhalb einer Pore, basierend auf dem in der Pore zur Verfügung stehenden Platz. Die Struktur der Pore wird dabei als starr angenommen und die Eigenschaften der wässrigen Lösung über die Dielektrizitätskonstante berücksichtigt. Realistischere Bedingungen können erzielt werden, wenn eine große Zahl von Ionen in die Rechnungen einbezogen wird. Dazu werden die Brownschen-Dynamik-Simulationen mit Monte-Carlo-Algorithmen gekoppelt, die den Zu- und Abfluss von Ionen zum bzw. vom Kanal simulieren.

Letztendlich ist es natürlich wünschenswert, alle Atome und Moleküle, die am Ionenfluss (oder Molekülfluss) beteiligt sind, explizit in die Rechnungen einzubeziehen. Hier haben sich molekulardynamische (MD) Simulationen etabliert.<sup>8)</sup> Dabei werden die Koordinatenände-



**Wolfgang Fischer,** Jahrgang 1962, studierte Chemie in Heidelberg und promovierte dort 1991. Nach einem Postdoc-Aufenthalt 1992

bis 1993 an der Boston University, USA, ging er an die TU Dresden und habilitierte sich dort 2002. Seit 1998 lehrt er an der Universität Oxford biologische Physik und Bionanotechnologie. Am Department für Physik forscht er über die Modellierung viraler Membranproteine, über die Ionendiffusion und arbeitet an der Verbindung von Computersimulation und Experiment.



rungen aller Moleküle oder Atome über einen gewissen Zeitraum hinweg mit den Newtonschen Bewegungsgleichungen verfolgt. Aus den Berechnungen lassen sich dann Gleichgewichtsstrukturen der Proteine und mehrere physikalische Größen ermitteln. Ionenfluss heißt allerdings immer, dass sich das System im Nichtgleichgewicht befindet. Dieser Zustand kann durch die Ausübung einer Kraft auf bestimmte Atome – in diesem Fall das Ion in der Pore – während einer Simulation dargestellt werden. Zum Beispiel ist es möglich, ein einzelnes Ion durch die Pore zu „ziehen“ (Steered MD-Simulationen), um Informationen über die Wechselwirkungen des Ions mit den Kanalwänden oder den Seitenketten der Aminosäuren zu erhalten (Abbildung 3B). Aus den Simulationen kann die freie Energie des Ions entlang der Pore berechnet und, gekoppelt mit Brownschen-Dynamik-Simulationen, ebenfalls die Leitfähigkeit bestimmt werden. Steered MD-Simulationen erlauben auch Vorhersagen hinsichtlich des Gating. Solche Untersuchungen liefern die Basis für weiterführende Analysen von Wechselwirkungen zwischen Liganden oder Blockern und den kanalbildenden Proteinen<sup>9)</sup> (Abbildung 3C). Passagen für die Diffusion von Liganden in Bindungstaschen konnten bereits mit MD-Simulationen berechnet werden.<sup>10)</sup>

### Ionenkanalbildner als Drug Targets

◆ Die zunehmende Resistenz von Viren gegen Medikamente, welche die größeren viralen Proteine blockieren, verlangt eine genaue Untersuchung der Ionenkanalbildenden Proteine als potentielle Drug Targets. Einige dieser Proteine werden bereits durch Medikamente attackiert: Amantadin, eines der ersten antiviralen Medikamente, blockiert genau den M2-Kanal. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Derivate des Na<sup>+</sup>-Kanal-Blockers Amilorid auch Vpu inhibieren. Gegen p7 scheinen Aminozucker geeignete Wirkstoffkandidaten zu sein, wie erste Versuche bereits gezeigt haben.

### Ausblick

◆ Zukünftige Arbeiten werden sich weiter mit der Entwicklung potenzieller Blocker beschäftigen. Im Zusammenhang damit ist klar, dass lediglich der TM-Bereich für Wechselwirkungen mit Blockern relevant ist. Da die kurzen TM-Bereiche als Peptide über Festphasensynthese zugänglich sind, können damit Sensor-arrays für das Drug Screening entwickelt werden.

Wolfgang B. Fischer  
Bionanotechnology Interdisciplinary  
Research Collaboration  
Clarendon Laboratory, Department of  
Physics, Oxford University, UK, and  
Biomembrane Structure Unit,  
Department of Biochemistry,  
Oxford University,  
wolfgang.fischer@bioch.ox.ac.uk

### ◆ Glossar

**Blocker:** Moleküle, die Durchgänge oder Aktivitäten von Proteinen behindern oder blockieren.

**Budding:** Freisetzung oder Knospung der Viren von der Plasmamembran. Die Assemblierung von Membranproteinen löst Budding in einem begrenzten Bereich der Plasmamembran aus.

**Endosom:** Membranzusammenschlossenes Vesikel oder Bläschen, das sich aus der Zellmembran herausbildet. Dadurch können Makromoleküle in das Zellinnere geschleust werden. Das Endosom wird innerhalb der Zelle durch in der Membran eingebundene Protonenpumpen angesäuert. Die in dem Endosom enthaltenen Makromoleküle werden dadurch hydrolytisch gespalten.

**Ligand:** Meist ein kleines Molekül (z. B. Hormon oder Neurotransmitter), das an große Proteine (Rezeptoren) bindet. Die Bindung ist nicht-kovalent und befindet sich in spezifischen Bereichen des Proteins.

- 1) „Viral ion channels: structure and function“: W. B. Fischer, M. S. P. Sansom, *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1561, 27–45.
- 2) „Vpu from HIV-1 on an atomic scale: experiments and computer simulations“: W. B. Fischer, *FEBS Lett.* 2003, 552, 39–46.
- 3) „Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells“: U. Schubert et al., *FEBS Lett.* 1996, 398, 12–18.
- 4) „Transmembrane peptide NB of influenza B: a simulation, structure, and conductance study“: W. B. Fischer et al., *Biochemistry* 2000, 39, 12708–12716.
- 5) „Bundles consisting of extended transmembrane segments of Vpu from HIV-1: computer simulations and conductance measurements“: F. S. Cordes, A. Tustian, M. S. P. Sansom, A. Watts, W. B. Fischer, *Biochemistry* 2002, 41, 73597365.
- 6) „The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives“: D. Pavlovic et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 6104–6108.
- 7) „Theoretical and computational models of biological ion channels“: B. Roux, T. Allen, S. Berneche, W. Im, *Quart. Rev. Biophys.* 2004, 37, 15–103.
- 8) „Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF“: B. L. de Groot, H. Grubmüller, *Science* 2001, 294, 2353–2357.
- 9) „Interaction of amiloride and one of its derivative with Vpu from HIV-1: a molecular dynamics simulation“: V. Lemaître, R. Ali, C. G. Kim, A. Watts, W. B. Fischer, *FEBS Lett.* 2004, 563, 75–81.
- 10) „How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms“: S. K. Lüdemann, V. Lounnas, R. C. Wade, *J. Mol. Biol.* 2000, 303, 797–811.