

1. Einleitung

1.1. Membranproteine

Membranproteine dienen der Signalübermittlung zwischen dem extra- und intrazellulärem Milieu, beteiligen sich an der Energieumwandlung und halten sowohl die Struktur als auch das zelluläre Milieu aufrecht. Die hohe Relevanz der Membranproteine wird durch die Analyse der sequenzierten Genome des Menschen, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, Hefe und vieler Bakterien und Archaeen durch verschiedene Genomprojekte unterstrichen. So konnte abgeschätzt werden, dass der Anteil der Membranproteine in Bezug zu allen Proteinen etwa zwischen 25 und 30% liegt (Wallin, 1998). Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass viele genetisch bedingte Krankheiten in direktem Zusammenhang mit funktionsgeminderten Membranproteinen stehen und schätzungsweise 70% der Medikamente auf Membranproteine einwirken (Byrne and Iwata, 2002).

Im Vergleich zu den löslichen Proteinen ist die Strukturaufklärung von Membranproteinen deutlich problematischer, was sich auch an der Anzahl der bisher gelösten Strukturen in der Protein-Datenbank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) erkennen lässt. Zur Zeit sind knapp 0.8% aller in der Datenbank deponierter Proteinstrukturen Membranproteine. Im Vergleich zu 30000 Strukturen löslicher Proteine sind bis zum heutigen Zeitpunkt weniger als 270 Membranproteine in ihrer Struktur bestimmt. Trotz der hohen Relevanz der Membranproteine bleibt ihre strukturelle Charakterisierung aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften schwierig. Die Überexpression und Reinigung einer ausreichenden Menge an Membranprotein ist eine der größten Barrieren für strukturelle Untersuchungen, weil Membranproteine sowohl aus natürlichen Ressourcen als auch durch die Produktion mittels heterologer Expressionssysteme häufig nur in geringen Mengen gewonnen werden können (Bill et al., 2011a; Tate, 2001).

1.2. Solubilisierung von Membranproteinen

Detergenzien spielen bei der Reinigung von Membranproteinen eine essentielle Rolle. Es lassen sich generell topologisch drei Domänen bei einem Membranprotein abgrenzen. Zwei Domänen entsprechen den extra- oder intrazellulären hydrophilen Bereichen des Membranproteins. Diese Domänen haben Kontakt zu der wässrigen Phase oder interagieren mit den polaren Kopfgruppen der Lipide. Die dritte Lipiddoppelschicht-durchspannende hydrophobe Domäne hat Kontakt zu den Alkylketten der Lipide. Die Membranproteine sind

nach dem Herauslösen aus der Membran sowohl in polaren als auch in apolaren Lösungsmitteln unlöslich. Durch den Einsatz von Detergenzien werden die hydrophoben Bereiche des Membranproteins beim Herauslösen aus der Lipiddoppelschicht abgeschirmt, und dem Protein wird eine hydrophile Oberfläche verliehen (Michel, 1982). Der so genannte „CMC-Wert“ spielt bei der Solubilisierung von Membranproteinen eine wichtige Rolle. Die „kritische Mizellare Konzentration“ (CMC) gibt an, ab welcher Konzentration ein Detergenz Mizellen bildet. Unterhalb dieser Konzentration liegen die Detergenzmoleküle als Monomere vor und können Membranproteine nicht in Lösung halten. Je niedriger der CMC-Wert eines Detergenz ist, desto stabiler sind die gebildeten Mizellen und desto langsamer werden Moleküle in die Mizelle inkorporiert bzw. entfernt. Der CMC-Wert gibt aber auch einen Richtwert bezüglich der hydrophoben Bindungsstärke des Detergenz an. Grundsätzlich kann man sagen, dass je höher der CMC-Wert eines Detergenz ist, desto schwächer fällt die hydrophobe Bindung des Detergenz zum solubilisierenden Molekül aus.

Aus einer Vielzahl unterschiedlicher Detergenzien, welche sich in ihrer chemischen Struktur und Eigenschaften z.T. stark voneinander unterscheiden, müssen diejenigen gefunden werden, welche das zu untersuchende Membranprotein optimal in Lösung bringen und dabei die Funktion und Struktur des Proteins erhalten. Man unterteilt Detergenzien allgemein in drei Kategorien:

1. **Ionische Detergenzien** besitzen positive oder negativ geladene Kopfgruppen und werden allgemein als harsche Detergenzien angesehen, die Proteine komplett denaturieren können.
2. **Nicht-ionische Detergenzien** besitzen ungeladene, hydrophile Kopfgruppe und werden als nicht-denaturierend angesehen und solubilisieren Membranproteine in einer milden Art und Weise oft ohne Beeinträchtigung der nativen Struktur, enzymatischen Aktivität oder anderen Proteinfunktionen.
3. **Zwitterionische Detergenzien** kombinieren die Eigenschaften von ionischen- und nicht-ionischen Detergenzien und werden ebenfalls zur Solubilisation von Membranproteinen verwendet.

In Abb. 1.1 sind zehn Detergenzien aufgelistet, die am häufigsten in Kristallisationsexperimenten von Membranproteinen erfolgreich verwendet wurden (Stand der Membran Protein Datenbank (MPDB) 29.01.2011). Mutierte Varianten eines kristallisierten Membranproteins werden in dieser Statistik ebenfalls berücksichtigt.

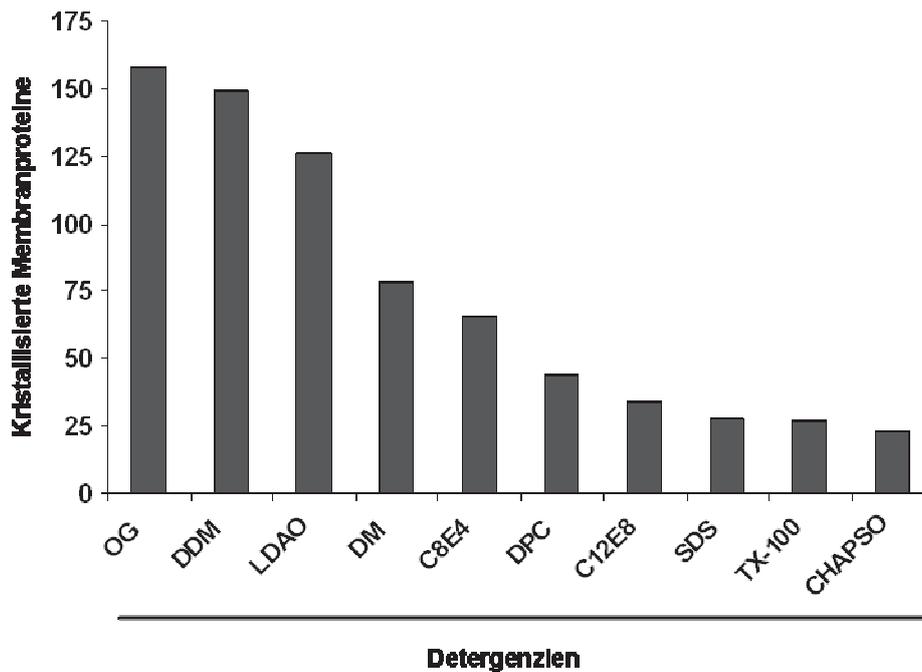


Abb. 1.1 In Kristallisationsexperimenten erfolgreich verwendete Detergenzien

A, Übersicht der zehn Detergenzien, die in Kristallisationsexperimenten am häufigsten verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Membranproteindatenbank MPDB (www.mpdb.tcd.ie). OG, Octyl- β -D-glucopyranosid; DDM, n-Dodecyl- β -D-Maltosid; LDAO, Lauryldimethylamine-oxid; DM, N-Decyl- β -D-Maltopyranosid; C8E4, Octyltetraoxyethylene; DPC, Dodecyl-Phosphocholine; C12E8, Dodecyloctaoxyethylene; SDS, Natriumdodecylsulfat; TX-100, Triton X-100, CHAPSO, 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]- 2-hydroxy-1-propansulfonat

Die nicht-ionischen Detergenzien DDM und OG werden aufgrund ihrer milden Solubilisierungseigenschaften von Kristallographen oft verwendet (Hite et al., 2010b; Tang et al., 2010; Rinaldo-Matthis et al., 2010; Gautier et al., 2010). Am dritthäufigsten wird das zwitterionische Detergenz LDAO verwendet, das ebenfalls die native Struktur bzw. Funktion eines Proteins nur geringfügig beeinträchtigt (Zhang et al., 2006; Locher et al., 2002; Jiang et al., 2002). In der hiesigen Arbeitsgruppe (Abteilung Molekulare Pharmakologie) wird das nicht-ionische Detergenz Digitonin für die Solubilisierung von Membranproteinen und die anschließende BN-PAGE-Analyse verwendet, da es sich in der Vergangenheit als schonendes und mildes Detergenz besonders bewährt hat (Fallah et al., 2011a; Pult et al., 2011a; Becker et al., 2008a; Duckwitz et al., 2006b; Aschrafi et al., 2004a; Nicke et al., 1998a; Schmalzing et al., 1989b).

1.3. Heterologe Expressionssysteme für Membranproteine

Milligramm-Mengen an reinen, homogenen und stabilen Protein werden zur strukturellen Charakterisierung von Membranproteinen benötigt. Das erste Membranprotein, das photosynthetische Reaktionszentrum von *Rhodospseudomonas viridis* (Deisenhofer et al., 1984), wurde 1984 mit einer Auflösung von 2 Å kristallisiert. Erst vierzehn Jahre später

konnte die Struktur eines rekombinanten Ionenkanals, die des Kalium-Kanal aus *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998) aufgeklärt werden. Im Jahr 2000 folgte dann die erste Kristallstruktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors; die des Rhodopsin-Rezeptors (Palczewski et al., 2000). Die Expression und Reinigung von integralen Membranproteinen stellt also offensichtlich eine große Herausforderung dar.

Die Wahl des Expressionssystems ist ein erster entscheidender Schritt für die erfolgreiche Produktion eines rekombinanten Membranproteins. Faktoren, die bei der Wahl des heterologen Expressionssystems in Betracht gezogen werden müssen, sind:

- Notwendigkeit von posttranslationalen Modifikationen, Proteinprozessierungs- und Sekretionsmechanismen
- Kultivierung und Manipulation des Organismus
- Benötigte Ausbeute des Proteins

1.3.1. *Pichia pastoris* als heterologes Expressionssystem

Die methylo-trophe Hefe *Pichia pastoris* kann mit Methanol als einziger C-Quelle überleben. In den Peroxisomen der Hefe katalysiert das Enzym Alkoholoxidase (AOX) die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid. Zwei Gene, AOX1 und AOX2, kodieren für 95% der Alkoholoxidase in der *P. pastoris*. Methanol wirkt dabei als Induktor für die Promotoren der beiden Alkoholoxidase-Gene, wobei das AOX1-Enzym den überwiegenden Teil der Alkoholoxidase-Aktivität in der Hefe ausmacht (Tschopp et al., 1987). Das AOX2-Gen ist weitgehend homolog mit dem AOX1-Gen, wird aber aufgrund eines schwächeren Promotors nur in einer geringen Menge exprimiert. Bei einem Ausfall des AOX1-Enzymes ermöglicht die AOX2 eine, wenn auch verlangsamte, Verstoffwechslung von Methanol (Ellis et al., 1985). Unter Kontrolle des starken AOX1-Promotors kann also nach Methanol-Zugabe ein heterologes Protein in hohen Mengen über ein leicht regulierbares System exprimiert werden. Ein weiterer Vorteil des Expressionssystems ist die Fähigkeit, post-translationale Modifikationen wie N-Glykosylierung (Choi et al., 2003; Duman et al., 1998), die Bildung von Disulfidbrücken (Luo et al., 1995; Cereghino and Cregg, 2000) und die proteolytische Prozessierung durchzuführen (Eckart and Bussineau, 1996a).

Ein neuronaler spannungsabhängiger Kalium-Kanal wurde von Parcej und Eckhardt-Strelau in *P. pastoris* exprimiert, aufgereinigt und mittels zweidimensionaler Kristallisation und Elektronenmikroskopie strukturell charakterisiert. Es konnte ein dreidimensionales Model mit einer Auflösung von 2,1 nm des Kanals erstellt werden (Parcej and Eckhardt-

Strelau, 2003). Die Arbeitsgruppe von R. MacKinnon nutzte 2005 ebenfalls das Expressionssystem *P. pastoris*, um den eukaryotischen Kalium-Kanal Kv1.2 aus der Proteinfamilie der Shaker K⁺-Kanäle zu exprimieren, mittels Affinitätschromatographie zu reinigen, zu kristallisieren und die Kristallstruktur zu bestimmen; dabei wurde eine Auflösung von 2.9 Å erreicht (Long et al., 2005b). Ebenfalls in *P. pastoris* exprimiert wurde die humane N-terminale extrazelluläre Domäne des neuronalen nikotinischen $\alpha 7$ -Acetylcholin-Rezeptors, die in der Lage war, im glykosylierten Zustand zu einem Homopentamer zu assemblieren und mit hoher Affinität Agonisten und Antagonisten zu binden (Avramopoulou et al., 2004). Singh und Kollegen exprimierten eine funktionelle C-terminal trunkierte Version des humanen G-Protein-gekoppelten Adenosin-A2A-Rezeptors in *P. pastoris* und reinigten das Protein für geplante strukturelle Untersuchungen auf (Singh et al., 2010). Ein Nachteil des *P. pastoris*-Expressionssystems könnte die unterschiedliche N-Glykosylierung im Vergleich zu eukaryotischen Zellen darstellen (Cereghino et al., 2002).

1.3.2. Insektenzellen als Expressionssystem

Baculoviren sind nicht-humanpathogene, insektenspezifische Viren, die zu den Kernpolyhedrosis-Viren gehören. Mittels spezifischer Transfervektoren, die ein heterologes Gen enthalten, können über *in vivo*-Rekombination und verschiedene Selektionsschritte infektiöse Baculoviren gewonnen werden, die das Zielprotein unter Kontrolle des nicht-essentiellen, aber starken Polyhedrinpromotors exprimieren. In der Biotechnologie wird häufig zur Expression heterologer Proteine die Zelllinie Sf9 (Ovarialzellen aus *Spodoptera frugiperda*) und der aus dieser Zelllinie isolierte Klon Sf21 eingesetzt. Insektenzellen sind im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen in der Lage, viele der posttranslationalen Modifikationen, Proteinprozessierungs- und Sekretionsmechanismen durchzuführen, welche für die korrekte Faltung eukaryotischer Proteine wichtig sind. Ein weiterer Vorteil des Expressionssystems ist, dass die Biomasse durch Umstellung von adhärenter Kultivierung auf Suspensionskultur erhöht werden kann und so hohe Proteinmengen gewonnen werden können. In einer Vielzahl von Studien wurde das Baculovirus-Expressionssystem genutzt, um Milligramm-Mengen an Membranprotein für strukturelle Untersuchungen zu isolieren und aufzureinigen.

Kawate und Mitarbeiter veröffentlichten 2009 die Kristallstruktur einer C-terminal-verkürzten funktionellen Variante des Zebrafisch-P2X4-Rezeptor mit einer Auflösung von 3,1 Å (Kawate et al., 2009e). Der Rezeptor wurde in Sf9-Zellen exprimiert, mit DDM solubilisiert und mittels Kobalt-Affinitätschromatographie und Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt. Der liganden-gesteuerte ASIC-Ionenkanal (Acid-sensing ion

channel) wurde von der gleichen Arbeitsgruppe ebenfalls in Sf9-Zellen exprimiert, aufgereinigt und mit einer Auflösung von 3 Å kristallisiert (Gonzales et al., 2009a). Rasmussen und Mitarbeiter haben den humanen G-Protein-gekoppelten β 2-Adrenorezeptor in Insektenzellen exprimiert, aufgereinigt und in einer Lipidumgebung mit einer Auflösung von 3,4 Å kristallisiert (Rasmussen et al., 2007). Ein Nachteil der Expression in Insektenzellen kann die unterschiedliche N-Glykosylierung im Vergleich zu Säugerzellen sein (Hollister et al., 2002; Muller et al., 2002). Studienergebnisse weisen darauf hin, dass N-Glykane in Insektenzellen nicht sialysiert werden, was zu einer extrem kurzen Halbwertszeit des exprimierten Proteins *in-vivo* führen kann (Marchal et al., 2001).

1.3.3. HEK293-Zellen als Expressionssystem

Die HEK-293-Zelllinie (human embryonic kidney-cells) ist eine seit Ende der 70er Jahre bestehende humane embryonale Nierenepithelzelllinie, die durch das Einbringen der E1-Region der humanen Ad5-Adenovirus-DNA immortalisiert wurde. In der Zellbiologie werden HEK293-Zellen seit vielen Jahren als vergleichsweise einfach zu handhabende Zelllinie eingesetzt. Aufgrund vieler Vorteile wie hohe Transfektionsausbeuten mit den meisten allgemeinen Gentransfer-Vehikeln, leichte Kultivierung in Suspensionskultur und Anpassung an serumfreie Medien wird die Zelllinie zur Expression von heterologen Proteinen genutzt. Im Gegensatz zu niedrigeren Eukaryoten oder Prokaryoten sind Säugerzellen wie die HEK293-Zelllinie in der Lage, alle relevanten posttranslationalen Modifikationen sowie Proteinprozessierungen für die Produktion eines korrekt gefalteten, funktionellen Proteins durchzuführen. Um allerdings eine ausreichende Proteinmenge für Strukturanalysen zu erhalten, müssen Transfektanten aufwändig gescreent und charakterisiert werden. Ein weiterer Nachteil ist die im Vergleich zu Hefen und Insektenzellen teure und zeitaufwändige Kultivierung.

Über Einzelmolekül-Elektronenmikroskopie konnten Wang und Sigworth ein dreidimensionales Modell eines in HEK293-Zellen exprimierten Kalzium- und Spannungsgesteuerten Potassium-Kanal (BK) in einer Lipidmembran rekonstruieren (Wang and Sigworth, 2009). Die Arbeitsgruppe von Miller konnte funktionelle Liganden-gesteuerte Cys-Loop-Rezeptoren (GABA_A- und Serotoninrezeptor) in einer Tetracyclin-induzierbaren stabilen Säugerzelllinie (HEK293) in Milligramm-Mengen exprimieren und affinitätschromatographisch für funktionelle und strukturelle Studien aufreinigen (Dostalova et al., 2010). Einen Codon-optimierten humanen Serotonin-Transporter konnten Takayama und Kollegen in einer Tetracyclin-induzierbaren HEK293-Zelllinie exprimieren und in einer

Konzentration von 1 mg pro Liter Zellkultur in funktioneller Form affinitätschromatographisch aufreinigen (Takayama and Sugio, 2011).

1.4. Ligandengesteuerte Ionenkanäle

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die den passiven Transport hydrophiler Ionen (Natrium, Calcium, Kalium oder Chlorid) durch die hydrophobe Lipiddoppelschicht entlang des Konzentrationsgradienten ermöglichen. Ionenkanäle sind mit den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Enzym-assoziierten Rezeptoren (metabotrope Rezeptoren) essentiell für die Signaltransduktion, d.h. die Übertragung extrazellulärer Signale ins Zellinnere. Bei ligandengesteuerten Ionenkanälen kommt es zu einer schnellen, kurzwirksamen, synaptischen Transmission, während metabotrope Rezeptoren eine langsame, langandauernde (min) Antwort bewirken.

Generell unterscheidet man drei Arten von Ionenkanälen: Die ligandengesteuerten Ionenkanäle (*ligand-gated ion channels*, LGICs) benötigen zur Aktivierung die Bindung spezifischer Signalmoleküle. Spannungsabhängigen Ionenkanälen (*voltage-gated ion channels*, VGICs) werden hingegen durch Änderungen im Membranpotential reguliert. Mechanosensitive Ionenkanäle (*stretch-activated ion channels*) werden durch mechanische Reize aktiviert, wie z. B. der Dehnung der Plasmamembran durch Volumenänderungen aufgrund osmotischer Vorgänge. Ionotrope Rezeptoren ändern ihre Konformation nach Ligandenbindung, so dass die Permeabilität des Kanals für bestimmte Ionen, wie Natrium, Kalium, Calcium oder Chlorid, geändert wird. Die Neurotransmitter Acetylcholin, Serotonin, GABA, Glyzin, Glutamat oder ATP sind physiologische Liganden für LGICs. Die Bindung des Liganden kann Einfluss auf die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals nehmen und so den Ionenaustausch verstärken oder verringern.

Strukturell unterscheidet man innerhalb den extrazellulär aktivierten ligandengesteuerten Ionenkanälen drei wesentliche Superfamilien, die sich zwischen den Mitgliedern einer Superfamilie über einen identischen Grundaufbau definieren (Barrera et al., 2008;Khakh, 2001;Nicke et al., 1998b;North, 1996). LGICs sind modulare Proteine, die aus einer Ligand-erkennenden extrazellulären Domäne und einer mit intrazellulären Proteinen interagierenden intrazellulären Domäne aufgebaut sind. Diese beiden intra- und extrazellulären Domänen sind durch Transmembrandomänen (TM) verbunden, die in Verbindung mit Transmembranregionen weiterer homologer und heterologer Untereinheiten den Ionenkanal ausbilden. Zu den LGICs gehören:

1. Die **Cys-Loop-Rezeptoren**, bestehend aus exzitatorischen Kationenkanälen (nikotische Acetylcholin- und 5HT₃-Rezeptoren) und inhibitorischen Anionenkanälen (GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren).
2. Die exzitatorischen **Glutamaterezeptoren**, zu denen die NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren gehören, bilden die zweite Klasse der ionotropen Rezeptoren.
3. Die Familie der ATP-gesteuerten Purin-Rezeptoren (**P2X-Rezeptoren**).

Abb. 1.2 A und B zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus der Rezeptoren der drei genannten Superfamilien der LGICs.

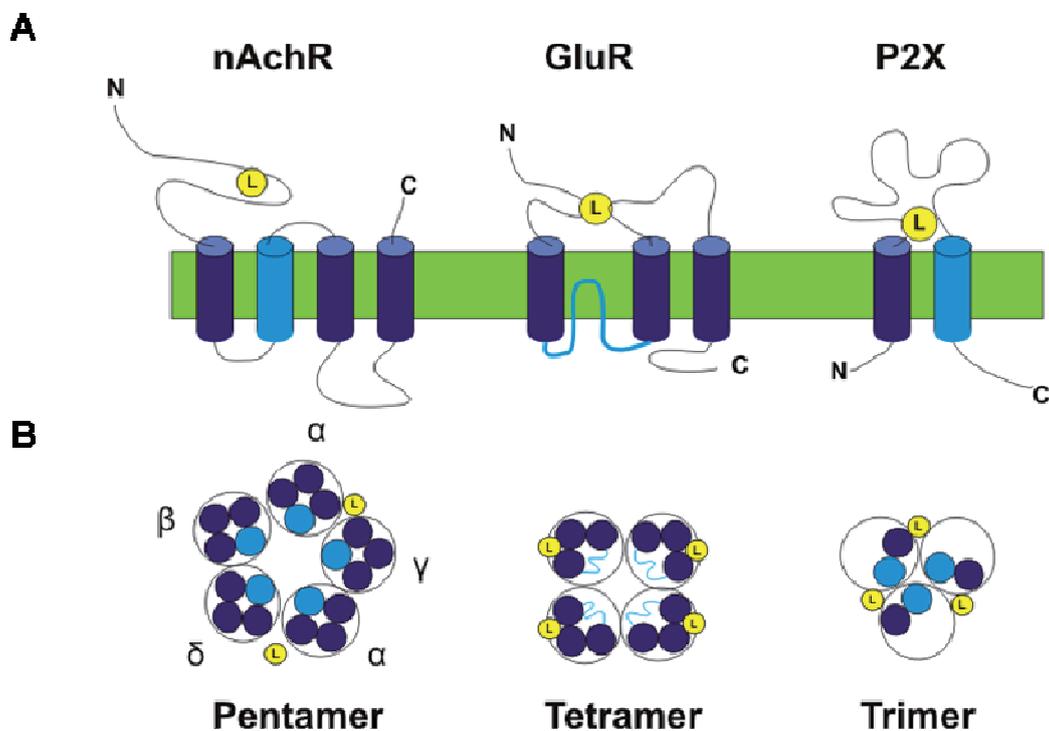


Abb. 1.2 Schematische Darstellung von Topologie und Quartärzustand der drei Hauptklassen der LGICs.

A, Topologie einzelner Untereinheiten von Cys-Loop-Rezeptoren (nAChR), Glutamaterezeptoren (GluR) und P2X-Rezeptoren. Dargestellt sind die Lokalisationen der N- und C-Termini, die Lage der TMs und der Ligandenbindungsdomänen. L, Ligand. **B**, Schema der Anzahl von Untereinheiten in den oligomeren Rezeptoren mit Andeutung der in den einzelnen Untereinheiten enthaltenen TMs. An der Porenbildung beteiligte TMs oder Domänen sind hellblau koloriert. Die griechischen Buchstaben bezeichnen die verschiedenen Untereinheiten im heteropentameren Muskeltyp-nAChR, einem Cys-loop-Rezeptor.

Die funktionellen Cys-Loop-Rezeptoren bestehen aus fünf Untereinheiten und sind meistens Heteropentamere (Cascio, 2004; Karlin et al., 1983; Griffon et al., 1999; Nicke et al., 1999; Nicke et al., 2004). Jede Untereinheit besteht dabei aus extrazellulär lokalisierten amino- und carboxyterminalen Domänen (N- und C-Termini) und vier

Transmembrandomänen. Charakteristisch für diese Klasse sind zwei konservierte Cysteinreste im N-Terminus, die über eine Disulfidbindung eine Schleife aus 15 Aminosäuren in der Ligandenbindungsdomäne erzeugen, wodurch diese Unterklasse ihren Namen erhalten hat. Weitere Informationen zu Cys-Loop-Rezeptoren finden sich in Übersichtsarbeiten (Tsetlin et al., 2011;Thompson et al., 2010).

Die zweite Rezeptorfamilie bilden die ionotropen Glutamatrezeptoren, die meist einen heteromeren Aufbau aus vier Untereinheiten aufweisen. Jede Untereinheit besteht jeweils aus drei Transmembranregionen, einem extrazellulären N-Terminus, einem Reentry loop und einem intrazellulär lokalisierten C-Terminus (Mayer, 2006;Greger et al., 2007). Weitere Informationen zu Glutamat-Rezeptoren finden sich in Übersichtsarbeiten (Nakagawa, 2010;Traynelis et al., 2010).

Die dritte Rezeptorfamilie bilden die P2X-Rezeptoren, die im folgenden ausführlich beschrieben werden.

1.5. Purinerge Rezeptoren

Purinerge Rezeptoren wurden erstmals 1976 von Burnstock beschrieben (Burnstock, 1976). Zwei Jahre darauf erfolgte die Einteilung in P1-Rezeptoren mit Adenosin als Transmitter und P2-Rezeptoren, die durch ATP bzw. ADP aktiviert werden (Burnstock *et al.*, 1978). Aufgrund unterschiedlicher pharmakologischer Eigenschaften wurden die P2-Rezeptoren in zwei weitere Klassen unterteilt (Kennedy and Burnstock, 1985), die sich nach ihrer Klonierung als strukturell grundverschieden herausstellten: Die metabotropen G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren, die hauptsächlich durch ATP und ADP aktiviert werden, und die ionotropen P2X-Rezeptoren, die eine Familie von ATP-aktivierten Ionenkanälen darstellen (Burnstock, 2006).

1.5.1. Topologie und Struktur von P2X-Rezeptoren

Es wurden insgesamt sieben verschiedene Isoformen der P2X-Rezeptorfamilie (P2X1R-P2X7R) identifiziert, die bis zu 40-50% identische Aminosäuren aufweisen. Die Untereinheiten sind zwischen 384 (chicken P2X4) und 595 (rP2X7) Aminosäuren lang (North, 2002b). Jede Untereinheit besteht aus zwei Transmembrandomänen, die durch eine lange extrazelluläre Domäne (~280 Aminosäuren), die so genannte Ektodomäne, getrennt werden (Valera et al., 1994). Alle in der P2X1-Untereinheit vorhandenen Konsensussequenzen der N-Glykosylierung der allgemeinen Form N-X-S/T-Y (wobei X und Y je eine beliebige Aminosäure außer Prolin darstellen) werden in der Ektodomäne