

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion des Immunsystems

Das Immunsystem ist aus solidem lymphatischem Gewebe und freien Immunzellen aufgebaut, die über den ganzen Körper verteilt sind. Seine Hauptfunktion ist es, den Körper vor Schaden durch eindringende Mikroorganismen und Fremdsubstanzen zu bewahren, aber auch geschädigte und entartete Körperzellen wie Tumorzellen zu beseitigen. Dazu haben die Zellen des Immunsystems die Fähigkeit erworben, körpereigene Moleküle von fremden zu unterscheiden und gezielt die Zerstörung oder Inaktivierung von gefährlichen Fremdsubstanzen einzuleiten.

Während der Evolution haben sich zwei unterschiedliche Formen der Immunabwehr entwickelt, die angeborene und die adaptive Immunabwehr. Die **angeborene Immunabwehr** ist bereits voll funktionsfähig, bevor infektiöse Erreger in den Körper eindringen. Sie wird vor allem von Makrophagen, den neutrophilen Granulozyten und den natürlichen Killerzellen (NK Zellen) ausgeführt und ist in einigen Fällen ausreichend, um die Immunabwehr zu sichern. Die **erworbene Immunabwehr** (auch spezifische oder adaptive Immunabwehr genannt) wird insbesondere dann aktiviert, wenn in den Körper eingedrungene Erreger der Zerstörung durch das angeborene Immunsystem entkommen sind. Sie wird überwiegend durch B- und T Lymphozyten vermittelt und zeichnet sich besonders durch ihre hohe Spezifität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Generell wird sie in die zelluläre Immunabwehr und die humorale Immunantwort unterteilt. Bei der **zellulären Immunabwehr** spielen T Zellen eine wichtige Rolle, die mit ihrem T Zellrezeptor auf die Erkennung von Fremdsubstanzen spezialisiert sind, welche im Inneren von Zellen vorkommen (Viren, Tumorproteine); das **humorale Immunsystem** basiert auf den von B Lymphozyten produzierten Antikörpern, die frei zirkulierende fremde Substanzen wie Bakterien oder Toxine markieren und inaktivieren.

Die lymphatischen Organe lassen sich in primäre (zentrale) und sekundäre (periphere) unterteilen. Zu den **primären lymphatischen Geweben** zählen der Thymus und das Knochenmark. In ihnen erfolgt die Differenzierung der Lymphozyten aus Stammzellen ohne Antigeneinfluss. Zu den **sekundären Immunorganen** gehören die Lymphknoten, die Milz,

die Tonsillen sowie lymphatisches Gewebe in den Schleimhäuten des Verdauungs-, Respirations- und Urogenitaltraktes. Zum Zeitpunkt der Geburt sind die sekundären lymphatischen Gewebe noch wenig entwickelt. Erst durch den postnatalen Kontakt mit Antigenen erfahren sie ihre weitere Ausgestaltung. Sie sind für die Antigenabwehr im Blutplasma, in der Lymphe sowie am Schleimhautepithel zuständig.

Das Grundgerüst der lymphatischen Gewebe wird von einem retikulären Bindegewebe aus fibroblastischen Stromazellen und retikulären Fasern gebildet, die mit ihren Fortsätzen ein dreidimensionales Maschenwerk bilden, in welches eine große Zahl von freien hämatopoetischen Zellen, hauptsächlich Lymphozyten, aber auch Makrophagen und dendritische Zellen, eingelagert ist. Dieses Geflecht ist für den Ablauf der Immunreaktion wichtig, da es Antigene und immunkompetente Zellen aus Lymphe bzw. Blut zurückhält und in Kontakt bringt.

1.1.2 Aufbau und Funktion der Milz

Die Milz ist das größte aller lymphatischen Organe. So wie Lymphknoten in die Lymphzirkulation integriert sind, ist die Milz in den Blutkreislauf eingeschaltet. Sie sorgt für die Abwehr von Mikroorganismen, die in die Zirkulation eindringen. Die Milz ist zeitlebens wichtig für die Antigen-stimulierte Proliferation und Reifung von Lymphozyten und ist für die Produktion sogenannter Gedächtniszellen von großer Bedeutung¹⁻². Wahrscheinlich ist sie auch ein wichtiger Ort für die Ausreifung von T Suppressorzellen³⁻⁴. Ferner dient die Milz dem Abbau alter Erythrozyten sowie als Thrombozytenreservoir⁵⁻⁶.

Die Milz wird von einer Kapsel aus straffem Bindegewebe umgeben, von der bindegewebige Septen (Trabekel) in das Parenchym des Organs einstrahlen. Zwischen den Trabekeln spannt sich das Milzgewebe aus, die sogenannte Milzpulpa. Man unterscheidet zwei Haupttypen des Milzgewebes: die rote Pulpa und die weiße Pulpa. Die **weiße Pulpa** besteht aus den Milzfollikeln und den strangförmigen, lymphatischen Mänteln um die Pulpaarterien (periarterielle lymphatische Scheide, PALS). Die Milzfollikel enthalten vorwiegend B Lymphozyten, während in den PALS, welche die kugelförmigen Follikel umfassen, T Lymphozyten überwiegen⁷⁻⁸. In den B- und T-Zell-Regionen kommen neben Lymphozyten auch antigenpräsentierende Makrophagen und dendritische Zellen vor⁹. In den Follikeln nehmen die sogenannten follikulären dendritischen Retikulumzellen (*follicular dendritic*

cells, FDCs), die sich von Stromazellen ableiten, eine Schlüsselstellung in der B Zell Maturation ein ¹⁰⁻¹²; die T-Zell-Regionen sind mit interdigitierenden dendritische Zellen besiedelt, die überwiegend aus Monozyten hervorgehen und als professionelle Antigen präsentierende Zellen fungieren ¹³. Die **rote Pulpa** füllt die verbleibenden Räume zwischen den Trabekeln und der weißen Milzpulpa und macht etwa 80% der Gesamtmasse der Milz aus. Sie besteht aus den Milzsinus (venöse Räume) und dem intersinuösen Maschenwerk mit eingelagerten Zellen. Bei letzteren handelt es sich vor allem um Erythrozyten und Makrophagen ¹⁴. An der Oberfläche der PALS bilden Makrophagen und dendritische Zellen eine Randschicht, die auch die Lymphfollikel überzieht. Diese Randschicht der weißen Pulpa grenzt an die rote Pulpa und wird auch als perifollikuläre Zone oder äußere Marginalzone bezeichnet ¹⁵⁻¹⁶.

Zahlreiche sezernierte Proteine wie Zytokine und Wachstumsfaktoren definieren in ihrer spezifischen Zusammensetzung sowie der Ausbildung morphogener Gradienten das für die einzelnen Kompartimente der Milz typische *microenvironment* (die 'Mikroumgebung'), in der z.B. die B Zellreifung erfolgen kann. Dieses *microenvironment* wird maßgeblich durch die Mitglieder der TGF β Superfamilie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren mitbestimmt.

1.2 Die TGF β Superfamilie

Sezernierte Proteine spielen eine Schlüsselrolle in Wachstums- und Entwicklungsprozessen, bei der Regeneration von Organen sowie in ihrer Homöostase, denn sie erlauben den Zellen miteinander zu kommunizieren. Die Superfamilie der **TGF β Wachstumsfaktoren** umfasst eine große Gruppe sezernierter Proteine, die sich aufgrund ihrer strukturellen und biologischen Ähnlichkeiten in mehrere Unterfamilien gliedern lassen: die GDFs (*growth and differentiation factors*), die BMPs (*bone morphogenetic proteins*), die TGF β s (*transforming growth factors β*), die Activine und Inhibine sowie eine Reihe weiterer Faktoren (s.Abb.1).

BMP-2	GDF-1			
BMP-3	GDF-3			
BMP-4	GDF-5	Activin β A		
BMP-5	GDF-6	Activin β B	TGF β -1	MIS
BMP-6	GDF-7	Activin β C	TGF β -2	nodal
BMP-7	GDF-8	Activin β D	TGF β -3	lefty-1
BMP-8	GDF-9			lefty-2
BMP-11	GDF-10	Inhibin α		
BMP-15	GDF-11			
	GDF-15			

Abb.1: Murine und humane Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der TGF β Superfamilie. BMP: *bone morphogenetic protein*, GDF: *growth and differentiation factor*, TGF: *transforming growth factor*, MIS: *Müllerian inhibiting substance*.

TGF β Wachstumsfaktoren sind sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten bekannt. Das Protein Decapentaplegic (Dpp) beispielsweise bildet das *Drosophila* Homolog zu BMP-2 bzw. BMP-4. Beide sind sogar funktionell austauschbar¹⁷.

Die ersten Mitglieder der BMP Familie wurden aufgrund ihrer Fähigkeit entdeckt, in der Ratte ektopisches Knochenwachstum zu erzeugen¹⁸⁻²⁰. Sie wurden von ihrem Entdecker entsprechend *bone morphogenetic proteins* (BMPs) genannt. Diese Nomenklatur ist aus heutiger Sicht irreführend, wie die Forschungsergebnisse der vergangenen zwei Dekaden zeigten. Die Analyse der Expressionsmuster sowie zahlreicher spontaner oder gezielter Genmutationen von mehr als 30 weiteren TGF β Wachstumsfaktoren ergab, dass die Aktivität von BMPs und ihren nächsten Verwandten keineswegs auf die Knochenentwicklung beschränkt ist²¹⁻²⁴. Vielmehr erfüllen TGF β Moleküle in verschiedensten Geweben eine Vielzahl biologischer Funktionen. Sie kontrollieren so unterschiedliche Prozesse wie Zellwachstum und Wachstumsinhibition, Zelldifferenzierung, Apoptose, Organogenese, die Festlegung der dorso-ventralen Körperachse im Embryo oder auch die Sekretion extrazellulärer Matrixkomponenten²⁵⁻³⁰. Weiterhin zeigte sich, dass nicht alle BMPs (in der uneinheitlichen Nomenklatur oft auch als OPs, *osteogenic proteins* oder GDFs bezeichnet) in der Lage sind, Knochenwachstum zu induzieren. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die funktionelle Heterogenität dieser Proteinfamilie. Sie erklärt sich aus der zeitlich streng regulierten, gewebespezifischen Expression der einzelnen Mitglieder. Die Fehlregulation der Expression kann schwere Folgen haben, wie am Beispiel des BMP-4 Gens eindrucksvoll zu

erkennen ist. Die durch eine Mutation in einem genregulatorischen Bereich hervorgerufene erhöhte Expression des Gens durch infiltrierende Lymphozyten führt beim Menschen zu einer fortschreitenden Verknöcherung des Muskelapparates infolge ektopischer Knochenbildung. Die sogenannte *Fibrodysplasia ossificans progressiva* (FOP) hat in der Regel den Tod des Patienten durch Entzündung der in ihrer Funktion ohnehin stark eingeschränkten Lunge zur Folge³¹.

Strukturell sind alle Mitglieder der Familie mit dem prototypischen Gründungsmitglied TGFβ-1 verwandt. Sie teilen als strukturelles Motiv einen Cysteiniknoten, der eine feste Struktur an der Basis des Proteins bildet, wie die Analyse der Kristallstrukturen von TGFβ-2 und BMP-7 zeigte³²⁻³⁴. In die Bildung dieses Cysteiniknotens sind sechs konservierte Cysteine involviert, die aufgrund ihres immer gleichen Abstandes maßgeblich die Gesamtstruktur des Proteins prägen. In der Regel besitzen TGFβ Wachstumsfaktoren ein weiteres konserviertes Cystein, welches an der Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken beteiligt ist. Dieses siebente konservierte Cystein fehlt jedoch bei einigen Familienmitgliedern, wie z.B. GDF-3 und GDF-9, was auf die fehlende Notwendigkeit einer kovalenten Bindung zur Dimerisierung hindeutet³⁵.

Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der TGFβ Superfamilie werden auf vielfältige Weise reguliert (Abb.2). Sie werden zunächst als große Vorläuferproteine mit einer sogenannten Proregion im N-Terminus synthetisiert. In der Zelle dimerisieren sie und werden vermutlich durch die Konvertasen Furin bzw. PC6 prozessiert³⁶⁻³⁷. Die proteolytische Spaltung erfolgt an der Konsensussequenz (Arg-X-X-Arg) und resultiert in der Freisetzung des C-terminalen Dimers, welches als reifes Protein in den extrazellulären Raum sezerniert wird. Die 3' neben der Schnittstelle liegende Sequenz beeinflusst die Effizienz der Spaltung, während die N-terminale Proregion die Stabilität des prozessierten, reifen Proteins kontrolliert³⁷. Im extrazellulären Raum unterliegen die Proteine weiteren Regulationsmechanismen: Der Antagonist Follistatin z.B. bindet Activin, BMP-15 und TGFβ-3 und verhindert so die Signalinduktion über den Rezeptor³⁸⁻⁴⁰; Chordin und Twisted gastrulation binden und inaktivieren BMPs auf die gleiche Weise⁴¹⁻⁴². Erst die Abspaltung des Repressors durch die Protease BMP-1/PCP setzt den Wachstumsfaktor wieder frei⁴³ (Abb.2). Die Komplexität der Regulation wird durch insgesamt sechs gewebespezifische Spleiss-Varianten der Protease erhöht⁴⁴.

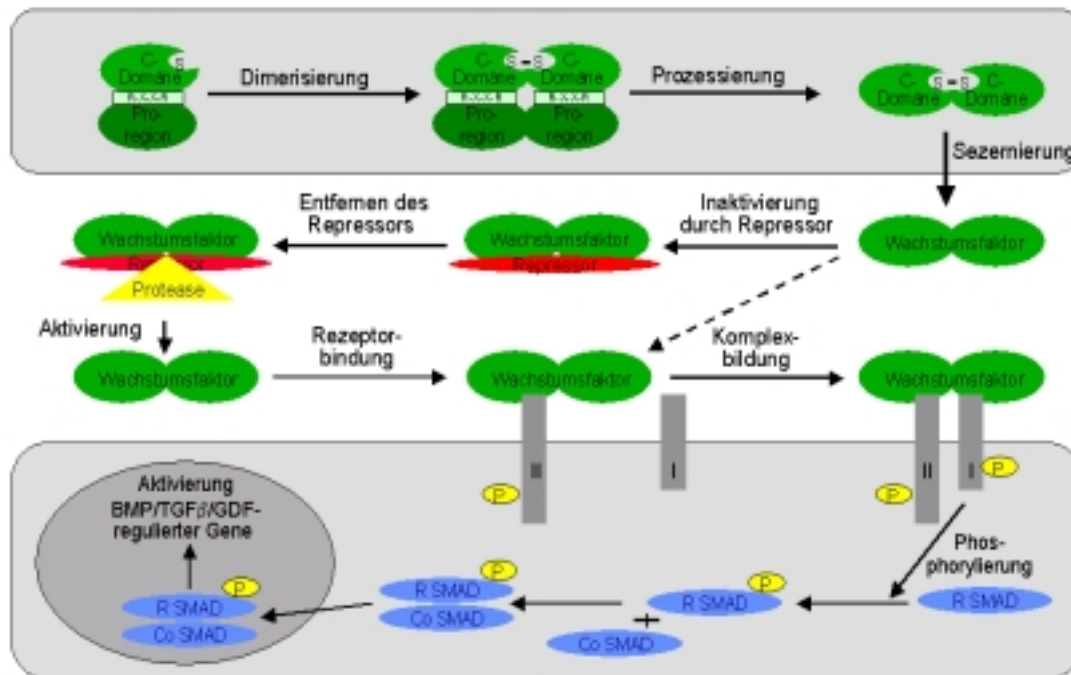


Abb.2: Wirkmechanismus der TGFβ Wachstumsfaktoren. Erklärungen im Text.

Aktivierte TGFβ Wachstumsfaktoren wirken über heterodimere Komplexe von zwei Typ I und Typ II **Transmembranrezeptoren** mit Serin/Threonin Kinase Aktivität⁴⁵. Acht Typ I und vier Typ II Rezeptoren sind zur Zeit bei Mensch und Maus bekannt. Verschiedene Kombinationen zwischen den Rezeptoren sind möglich, und oft können mehrere Liganden den gleichen Rezeptorkomplex binden. Nach Bindung des Liganden transphosphoryliert der Typ II den Typ I Rezeptor und aktiviert damit die Typ I Kinase⁴⁶⁻⁴⁷. Letztere aktiviert wiederum die intrazellulären Signaltransduktoren für TGFβ Wachstumsfaktoren, die Transkriptionsfaktoren der **SMAD** Familie (*similar to Mad*)⁴⁸⁻⁴⁹. Drei Klassen von SMADs konnten bisher identifiziert werden: die Rezeptor-regulierten R-SMADs, die *common-mediator* SMADs (co-SMADs) sowie die inhibitorisch wirkenden I-SMADs. Nach seiner Phosphorylierung dissoziiert das R-SMAD (Smad1-3,5+8) vom Rezeptor und bildet einen heteromeren Komplex mit dem co-SMAD (Smad4). Anschließend translozieren die SMADs in den Nukleus, wo sie mit Hilfe weiterer Transkriptionsfaktoren oder Koaktivatoren die Expression von Zielgenen steuern⁵⁰⁻⁵² (Abb.2).

1.3 Der Wachstums- und Differenzierungsfaktor GDF-3

Der Wachstums- und Differenzierungsfaktor GDF-3 (*growth and differentiation factor 3*) wurde ursprünglich mit einer Sonde, die für den C-terminalen TGF β -konservierten Bereich des *Xenopus* Proteins Vg-1 kodiert, aus einer Mausembryo cDNA Bank isoliert⁵³. Entsprechend wurde das Protein zunächst Vgr-2 getauft (*Vg-related*; Vgr-1 war bereits vergeben). McPherron und Lee beschrieben kurz darauf ebenfalls ein neues Mitglied der TGF β Superfamilie, welches sie durch ein PCR Screening Verfahren mit Hilfe degenerierter Oligonucleotide identifizieren konnten³⁵. Sie nannten es in Anlehnung an die zuvor auf gleiche Weise isolierten Sequenzen (GDF-1 und GDF-2) GDF-3. Sequenzvergleiche zeigen, dass es sich bei Vgr-2 und GDF-3 um dasselbe Gen handelt.

GDF-3 wird von zwei Exons kodiert. Der kodierende Bereich umfasst inklusive Start- und Stop-Codon 1101bp; das Protein hat entsprechend eine Größe von 366aa, wobei das reife Protein 114aa umfasst (Abb.3). Das Gen liegt bei der Maus auf Chromosom 6.

```

1  tgaggggctg agaagagagc aattcacact tgattagctc ccaggctcct gaattgagca
61  gaggaggcta gaccgctgag ctgcgacacc cagaggctgc tctaccctgg ctcagacgac
121 c*ATGCAGCCT TATCAACGGC TTCTGGCGCT TGGCTTCCTT CTGTAAACCC TGCCCTGGGG
181 CCAGACATCC GAGTTTCAAG ACTCTGACCT TTTGCAGTTT CTGGGATTAG AGAAAGCGCC
241 TTCACCTCAC AGGTTCCAAC CTGTGCCTCG CGTCTTAAGG AAAATCATCC GGGCTCGAGA
301 AGCCGCTGCA GCCAGTGGGG CCTCGCAGGA CTTATGCTAC GTGAAGGAGC TGGGTGTTTC
361 TGGGAACCTG CTTCAGCTTC TCCCAGACCA GGGTTTTTTC CTTAATACAC AGAAACCTTT
421 CCAAGATGGC TCCTGTCTCC AGAAGGTCCT CTATTTTAAC TTGTCTGCCA TCAAAGAAAA
481 GGCAAAGTTG ACCATGGCCC AGCTGACTCT AGACTTGGGG CCCAGGTCCT ACTATAACCT
541 GCGACCAGAG CTGGTGTTG CTCTGTCTGT GGTTCAGGAC CGGGGCGTGT GGGGGCGATC
601 CCACCCTAAG GTGGGCAGAT TGCTTTTTCT GCGGTCTGTC CCTGGGCCTC AAGGTCAGCT
661 CCAGTTCAAC CTGCAGGGTG CGCTTAAGGA TTGGAGCAGC AACCGACTGA AGAATTTGGA
721 CTTACTACTTA GAGATTTTGG TCAAAGAGGA CAGATACTCC AGGGTAACTG TCCAGCCCGA
781 GAACCCCTGT GACCCGCTGC TCCGCTCTCT ACATGCCTCG CTGCTGGTGG TAACCCCAA
841 TCCTAAACAC TGTCATCCTT CTTCCAGAAA AAGGAGGGCG GCCATCTCTG TCCCAAGGG
901 TTTCTGTAGG AACTTCTGCC ACCGTCATCA GCTGTTTATC AACTTCCAGG ACCTGGGTTG
961 GCACAAGTGG GTCATCGCCC CTAAGGGGTT CATGGCAAAT TACTGTTCATG GAGAGTGCCC
1021 CTTCTCAATG ACCACGTATT TAAATAGTTC CAATTATGCT TTCATGCAGG CTCTGATGCA
1081 TATGGCTGAC CCAAGGTCC CCAAGGCTGT CTGTGTCCCC ACCAAGCTCT CGCCCATCTC
1141 CATGCTCTAT CAGGATAGTG ATAAGAACGT CATTCTCCGA CATTATGAAG ACATGGTAGT
1201 CGATGAGTGT GGGTGTGGG* AGtctcggga ctaggctagg agtgtgctta gggtaaatcc
1261 ttttaataaaa ctaccacccc

```

Abb.3: Nukleotidsequenz von murinem GDF-3. 5' und 3' untranslatierte Bereiche sind als Kleinbuchstaben dargestellt. Die C-terminale TGF β konservierte Region ist unterstrichen. Die Position des Introns ist durch einen Pfeil markiert. Die Sterne zeigen die Lage des Start- bzw. Stop-Codons.

Im Northern Blot ist GDF-3 Transkript während der Embryonalentwicklung der Maus erstmalig 10,5 Tage nach der Paarung (10,5 dpc, *days post coitum*) detektierbar. Die Expression erreicht nach der Hälfte der Schwangerschaft (14,5 dpc) ihren Höhepunkt und ist bis 17,5 dpc nachweisbar. Diese Daten decken sich mit dem Ergebnis der *in situ* Hybridisierung: In Gewebeschnitten von Mausembryonen (6,5 dpc bis zur Geburt) konnte Transkript lediglich um 14,5 dpc sichtbar gemacht werden. Es ist in sich entwickelnden Knochen lokalisiert, welche zum angegebenen Zeitpunkt beginnen zu kalzifizieren⁵³.

Im adulten Tier stellt sich ein anderes Bild dar. GDF-3 ist hier vor allem in Geweben des Immunsystems zu finden. Mc Pherron und Lee untersuchten zahlreiche Organe der Maus im Northern Blot (Abb.4); GDF-3 Transkript konnte dabei lediglich in Milz, Thymus, Knochenmark und Fettgewebe detektiert werden⁵⁵. Die Autoren mutmaßten, dass das Signal im Fettgewebe durch kontaminierende Lymphknoten verursacht wurde. Eine spätere Studie, welche die Zytokinexpression in fettleibigen FABP4/aP2 defizienten Mäusen untersuchte, bestätigte jedoch die GDF-3 Expression in Adipozyten⁵⁴.

Lunge	-	Milz	+
Niere	-	Thymus	+
Darm	-	Knochenmark	+
Hirn	-	Samenblase	-
Leber	-	Hoden	-
Herz	-	Muskel	-
Bauchspeicheldrüse	-	Fettgewebe	+

Abb.4: GDF-3 Expression in Geweben von adulten Mäusen. Gewebe, in denen im Northern Blot GDF-3 spezifisches Transkript nachgewiesen werden konnte, sind mit einem Plus (+) gekennzeichnet.

Bisher veröffentlichte Daten zur GDF-3 Expression in menschlichen Geweben stehen im Einklang mit den Erkenntnissen über murine Gewebe. Caricasole et al. isolierten humane GDF-3 cDNA aus einer embryonalen Karzinomzelllinie und konnten GDF-3 Transkript darüber hinaus in primären Hoden-Keimzelltumoren feststellen. Die Northern Blot Analyse von mRNA aus Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Muskel, Niere und Bauchspeicheldrüse verlief jedoch negativ⁵⁵. Humane lymphatische Organe wurden nicht auf GDF-3 Expression getestet.

Das humane GDF-3 ist mit 313aa signifikant kleiner als sein murines Gegenstück. Die 'fehlenden' Aminosäuren in der Proregion des Proteins könnten auf alternatives Spleissen zurückzuführen sein. Der reife Teil des Proteins ist dagegen in seiner Größe vergleichbar und weist sowohl in der Nukleotid- als auch in der Aminosäuresequenz einen hohen Grad an Homologie zur Mausequenz auf. GDF-3 ist beim Menschen auf Chromosom 12 lokalisiert⁵⁵.

Lymphozyten und professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen interagieren beständig miteinander und mit anderen Komponenten des Organismus, um die hochwirksame Immunabwehr zu garantieren. Neben der Antigen-präsentation erfolgt die Kommunikation über Zytokine und andere sezernierte Proteine. Auch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der TGF β Superfamilie dienen als Mediatoren im Immunsystem: GDF-15 Expression beispielsweise ist mit der Aktivierung von Makrophagen assoziiert⁵⁶⁻⁵⁷; TGF β -1 spielt sowohl bei der Aktivierung und Differenzierung als auch bei der Inhibition der Proliferation von Lymphozyten eine Rolle⁵⁸⁻⁶²; Activin A wurde u.a. als Regulator in der frühen Erythrozytendifferenzierung beschrieben⁶³.

Die Tatsache, dass GDF-3 in adulten Mammalia nahezu ausschließlich in lymphatischen Geweben exprimiert wird, macht diesen Faktor einzigartig in der TGF β Superfamilie und legt die Hypothese nahe, dass GDF-3 eine Rolle im Immunsystem spielt.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Rolle von GDF-3 in lymphatischen Geweben zu charakterisieren. Folgende Fragen sollten geklärt werden:

1. Welche Zellen exprimieren GDF-3?
2. Auf welche Zellen wirkt GDF-3?
3. Wird die GDF-3 Expression reguliert? Wenn ja, wie?
4. Spielt GDF-3 eine Rolle bei der Immunabwehr?

Zunächst sollten die GDF-3 exprimierenden Zellen in den lymphatischen Organen identifiziert werden. Denn das Wissen um die 'Quelle' des Proteins würde auch die Suche nach dem 'Target', den Zielzellen, vereinfachen und trüge damit entscheidend zur Beantwortung der Frage nach der Funktion des Proteins bei.