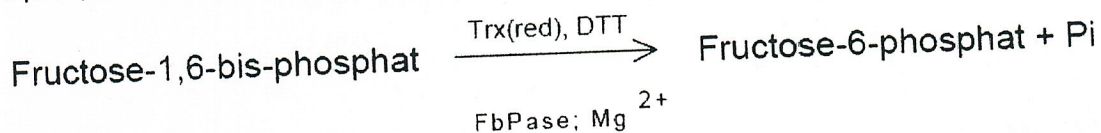


Klausur zum Biochemischen Methodenkurs WS 2006/2007

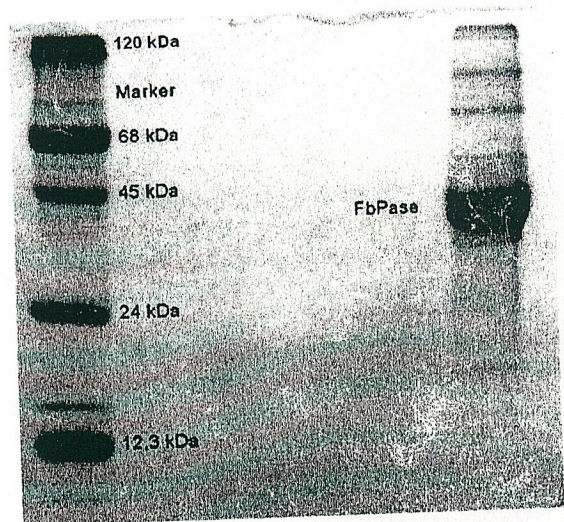
Aufgabe 1 (25 Punkte)

Im Rahmen Ihrer Diplomarbeit arbeiten Sie mit Thioredoxinen. Thioredoxine sind Proteine, die selbst keine enzymatische Aktivität haben, die jedoch in der Lage sind das Reduktionspotential von DTT auf die chloroplastidäre alkalische Fructose-1,6-bis-phosphatase (FbPase) zu übertragen und diese zu aktivieren. Das Enzym bewirkt die Abspaltung eines Phosphatmoleküls von dem Substrat Fructose-1,6-bis-phosphat und es findet folgende Reaktion statt:



Das abgespaltene Phosphat kann photometrisch bestimmt werden.

Sie haben beschlossen diese Phosphatase zu isolieren um in Ihren Proben die Thioredoxine nachweisen zu können. Das von Ihnen isolierte Enzym zeigt auf der denaturierenden SDS-PAGE folgendes Bild:



- Sie sind über die dicke FbPase-Bande im Bereich 40 kDa erfreut, glauben jedoch, dass Sie das Enzym zusätzlich über eine Gelfiltrationssäule aufreinigen müssen. Sie kalibrieren eine Superdex-75 Säule mit den gleichen Markerproteinen wie auf dem SDS-Gel. Die Retentionsvolumina der Markerproteine (V_r) sind 85, 77, 68, 62 und 57 ml. Wo erwarten Sie die FbPase-Aktivität? Schätzen Sie ohne zu rechnen zwischen welchen der angegebenen Retentionsvolumina die FbPase eluiert.
- Sie sammeln alle Fraktionen und testen die zuerst, in der Sie die FbPase Aktivität erwartet haben. Sie geben das Substrat, die Thioredoxinprobe und DTT dazu, finden jedoch keine Aktivität. Wie können Sie so etwas erklären?
- Sie geben nicht auf und suchen weiter. In welchem Elutionsbereich würden Sie nach FbPase-Aktivität weiter suchen? Was trifft eher zu: V_r , V_p , V_o , oder V_t ?
- Nachdem Sie die Fraktionen mit FbPase-Aktivität gefunden haben, testen Sie endlich Ihre Thioredoxinproben. Das abgespaltene Phosphat muss man nachweisen. Wie führen Sie die Phosphatbestimmung durch? Beschreiben Sie den Test. Sie brauchen keine genauen Volumina anzugeben, nur Substanzen, die Reihenfolge in der Sie diese zugeben und die Wellenlänge bei der Sie messen. Welche Farbe hat das entstehende Produkt?

Aufgabe 4 (15 Punkte)

Da das cytosolische HSP90A und das plastidäre HSP90C von der Aminosäuresequenz einander recht ähnlich sind und beide ähnlich groß sind, wollen Sie sichergehen, dass Ihr Antikörper gegen HSP90C nicht auch mit HSP90A kreuzreagiert. Um eine Methode zu finden, beide Proteine voneinander zu trennen, vergleichen Sie zunächst deren Aminosäurezusammensetzung:

Aminosäure	pK _{Rest}	HSP90A	HSP90C
Phenylalanin		25	27
Leucin		69	57
Isoleucin		39	38
Methionin		20	23
Valin		44	53
Serin		47	52
Prolin		20	27
Threonin		29	32
Alanin		44	86
Tyrosin	10.46 +	23	+ 24
Histidin	6.1 -	11	- 5
Glutamin		20	21
Asparagin		31	20
Lysin	10.53 +	72	+ 62
Aspartat	3.86 -	52	- 50
Glutamat	4.07 -	83	- 75
Cystein	8.33 +	6	+ 2
Tryptophan		7	8
Arginin	12.48 -	29	- 39
Glycin		34	38

- 2
- 2
2
2
2
- 2
2

→ (2)

- a) Schätzen Sie die Nettoladungen von HSP90A und HSP90C im physiologischen pH-Bereich (pH 7-8) ab. Sind die Proteine eher sauer oder eher basisch?
 b) Welche Methode(n) schlagen Sie vor, um HSP90A und HSP90C voneinander zu trennen? Begründung!

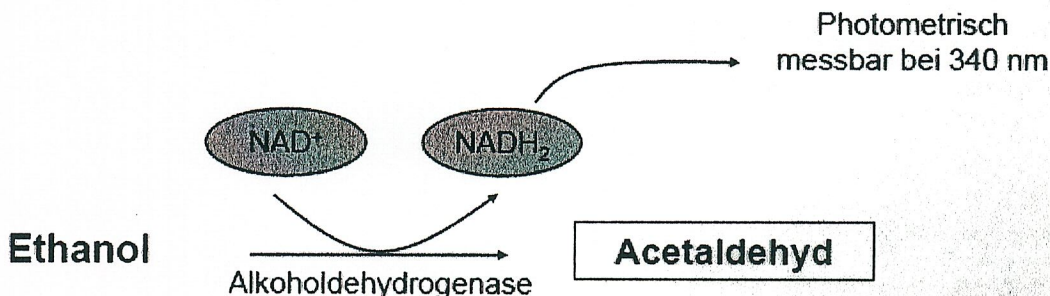
101+, 155- 88+ 169-
 Ionenaustauschchromatographie
 IEP - Fokussierung

e) Berechnen Sie den Verteilungskoeffizient (K_D) eines Proteins das bei einem Retentionsvolumen von 51 ml von einer Gelfiltrationssäule eluiert. Die Parameter der Säule sind folgende:

$V_0 = 41$ ml
 $V_t = 107$ ml

Aufgabe 2 (30 Punkte)

Nach dem Genuss einiger Biere interessieren Sie sich plötzlich für den ersten Schritt des Alkoholabbaus um endlich mal genau zu erfahren, was da in ihrer Leber so passiert. Dieser erste Schritt des Alkoholabbaus wird durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) katalysiert, die Ethanol unter Reduktion von NAD^+ zu $NADH+H^+$ zu Acetaldehyd oxidiert:



Dadurch dass $NADH+H^+$ im Gegensatz zu NAD^+ UV-Licht bei 340 nm absorbiert, kann dessen Entstehung während der Reaktion und damit die Umsetzung von Ethanol zu Acetaldehyd leicht photometrisch verfolgt werden. ADH wird spezifisch durch den Inhibitor 4-Methylpyrazol gehemmt. Um später ADH aus Ihrer Leber genauer charakterisieren zu können, besorgen Sie sich zunächst eine kommerziell erhältliche Enzympräparation und führen 2 Messreihen durch, eine ohne und eine mit 4-Methylpyrazol, das Sie in einer Endkonzentration von 60 μ M zugeben. Sie erhalten folgende Messwerte:

[EtOH] in mM	ohne Inhibitor $\Delta A_{340nm}/min$	mit Inhibitor $\Delta A_{340nm}/min$
0,5	0,428	0,239
1,0	0,712	0,428
1,5	0,918	0,586
3,0	1,285	0,918
12,0	1,833	1,606

- Gehorcht die ADH der Michaelis-Menten Kinetik? (Begründung!) Gibt es Enzyme, die nicht der Michaelis-Menten Kinetik gehorchen? Geben Sie ein Beispiel, wie eine solche Kinetik aussehen kann und wie dies zustande kommt.
- Bestimmen Sie die Werte für K_m und v_{max} ihrer ADH-Präparation (Absorptionskoeffizient von $NADH_{340nm}$: $6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Schichtdicke der Küvette: 1 cm).
- Um welchen Inhibitortyp handelt es sich bei 4-Methylpyrazol? (Begründung!) Bestimmen Sie den K_i -Wert für 4-Methylpyrazol.
- Warum ist die Auftragung nach Lineweaver-Burk fehleranfällig?

Aufgabe 3 (25 Punkte)

Beim Ausheben des Kellers für den Bau des Zentrums für Systembiologie haben die Bauarbeiter ein Gewölbe und darin einen vermoderten Holzsarg gefunden. Auf dem Sarg war noch das Wappen der Zähringer zu erkennen. Der Bauleiter war gleich ganz entzückt und behauptete, darin müsse einer der Herzöge von Zähringen begraben worden sein, die Freiburg um 1120 gegründet haben. Obwohl der Bauleiter weiß, dass Sie sich eigentlich mit so interessanten Sachen wie plastidären Chaperonen beschäftigen, fragt er Sie um Rat, wie man am besten eine Altersbestimmung durchführen könnte. Sie

überzeugen ihn sogleich, die Radiocarbon-Methode anzuwenden, um das tatsächliche Alter des Sarges zu bestimmen. Der Bauleiter stellt Ihnen ein abgesplittertes Holzstück zur Verfügung, immerhin 2,23 g.

a) Erläutern Sie kurz das Prinzip der Methode; wie entsteht ^{14}C eigentlich? Welche Strahlung emittiert es? Welche Strahlungsarten gibt es noch und wie schützen Sie sich am besten gegen diese?

In einem aufwändigen Verfahren wird der Kohlenstoff in der Probe (Holz besteht zu 49% aus Kohlenstoff) durch vollständige Verbrennung zunächst komplett in CO_2 umgewandelt. Dieses wird dann über geschmolzenes Lithium geleitet und zu LiC_2 (Lithiumcarbid) umgewandelt. Letzteres wird dann zu Acetylen-Gas hydrolysiert und schließlich zu Benzol trimerisiert. Benzol eignet sich hervorragend zur Messung im Szintillationszähler.

Sie erhalten im Szintillationszähler einen Messwert von 0.2217 Bq.

b) Stammt der Sarg tatsächlich aus der Zeit der Stadtgründung Freiburgs, oder wie alt ist er wirklich? ($t_{1/2} \text{ } ^{14}\text{C} = 5730 \text{ a}$; dpm = Zerfälle pro Minute; Die Strahlung von ^{14}C (^{14}C macht $10^{-10}\%$ des Kohlenstoffs in der Atmosphäre aus) beträgt 13,56 dpm pro g Kohlenstoff)

c) Könnte die Radiocarbonmethode auch zur Altersbestimmung von Dinosaurierknochen (vor ca. 65 Mio. Jahren ausgestorben) verwendet werden? (Rechnerische) Begründung!

d) Zu Ehren von Marie Curie ist Polonium nach dem Namen Ihres Heimatlandes Polen benannt worden. ^{210}Po ist in den letzten Monaten im Zusammenhang mit der Vergiftung des Ex-KGB-Agenten Alexander Litvinenko oft in den Medien genannt worden. Es hat eine Halbwertszeit von 101 Jahren und zerfällt direkt zu ^{206}Pb . Warum ist ^{210}Po für Menschen giftig? Begründen Sie ihre Aussage!

Aufgabe 4 (10 Punkte)

Schätzen Sie die Nettoladung des folgenden Peptids bei pH 3, pH 7 und pH 10.3 ab. Was geschieht bei pH 7?

Gly-Val-Cys-Tyr-Ala-Arg-Lys-Asn-His-Pro-Asp-Glu-Gly

	pK α -COOH	pK α -NH ₂	pK Seitenkette
Alanin	2,3	9,8	
Cystein	1,9	10,7	8,3
Glycin	2,3	9,7	
Histidin	1,8	9,3	6,0
Asparagin	2,1	8,7	
Prolin	1,9	10,6	
Arginin	1,8	9	12,5
Valin	2,2	9,7	
Lysin	2,2	9	10,53
Glutamat	2,2	9,7	4,25
Aspartat	2	10	3,68
Tyrosin	2,2	9,2	10,1

Handwritten: Klausur zum Biochemischen Methodenkurs
 1: 28 P
 2: 24.5

69.5

4: 7

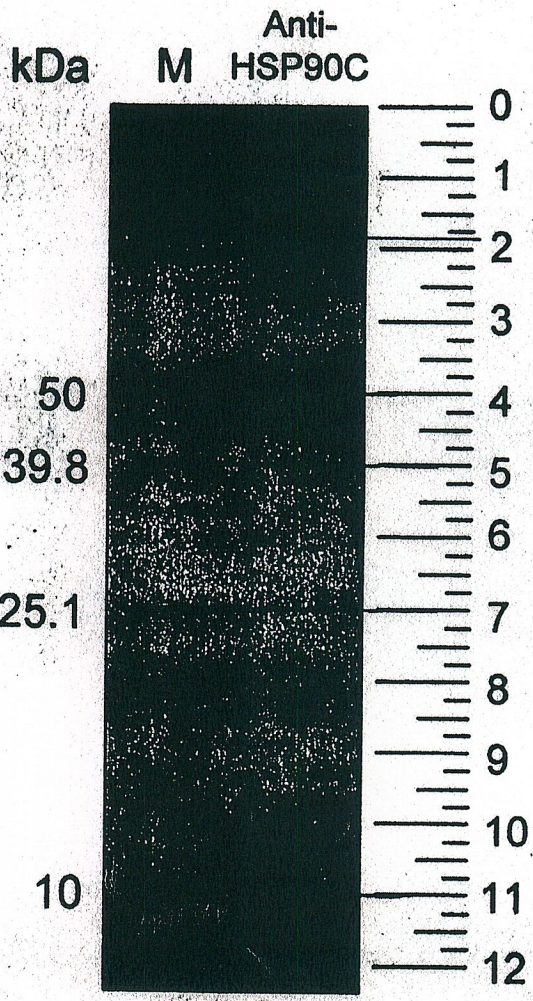
Klausur zum Biochemischen Methodenkurs WS 2005/2006

3: 10

Proteine der HSP90-Klasse sind hochkonservierte Chaperone, die die Energie aus der Hydrolyse von ATP nutzen können, um andere Proteine in einem nativen Faltungszustand zu halten. Das Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* enthält 3 Gene, die potenziell für HSP90-Chaperone kodieren und HSP90A-C genannt werden. Anhand spezifischer Signaturmotive lässt sich ableiten, dass HSP90A im Cytosol, HSP90B im ER und HSP90C im Chloroplasten lokalisiert sind. Da Sie sich für plastidäre Chaperone interessieren, führen Sie eine umfassende biochemische Charakterisierung von HSP90C durch. Dank des Methodenkurses ist dies für Sie ein Kinderspiel.

Aufgabe 1 (30 Punkte)

Zunächst stellen Sie einen Peptidantikörper gegen HSP90C her. Anschließend trennen Sie *Chlamydomonas*-Gesamtprotein in einer SDS-PAGE neben einem Marker-Proteingemisch auf, transferieren die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran und inkubieren die Membran mit dem spezifischen Antikörper gegen HSP90C. Sie erhalten folgendes Bild:



- Bestimmen Sie das Molekulargewicht von HSP90C
- Wie nennt man den Transfer von Proteinen auf eine Membran? Was ist ein Peptidantikörper? Welche Methoden gibt es, einen Primärantikörper zu detektieren?

Um herauszufinden, welches Molekulargewicht das native HSP90C *in vivo* hat, extrahieren Sie gesamt-lösliche Proteine aus *Chlamydomonas* und führen mit diesen eine Gelfiltration auf einer Superdex 200-Säule durch (Flussrate: 1 ml/min; Papiervorschub auf dem Schreiber: 10 mm/min). Sie sammeln 40 Fraktionen à 0.5 ml, tragen diese auf ein SDS-Gel auf, transferieren die Proteine auf Nitrocellulose und detektieren anschließend HSP90C mit Ihrem spezifischen Antikörper. Sie erhalten ein sehr starkes Signal für HSP90C in Fraktion 24 und ein deutlich schwächeres in Fraktion 27.

Um die Säule zu eichen haben Sie zuvor ein Gemisch aus Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht aufgetragen und ein Chromatogramm mit Hilfe der Absorption bei 280

nm erstellt. Der Schreiber hat Peaks mit folgenden Entfernungen vom Startpunkt aufgezeichnet:

Flavin-Mononukleotid	FMN	478 Da	190 mm
Cytochrom c (Pferd)	Cyt c	12,4 kDa	169 mm
Carboanhydrase (Rind)	Carb	29 kDa	154 mm
Rinderserum Albumin	BSA	67 kDa	137 mm
Dextranblau	Dex	2000 kDa	73 mm

- Welche Molekulargewichte haben die Proteine in den 2 Fraktionen, in denen Sie HSP90C detektiert haben?
- Welche Aussagen können Sie also über *in vivo* HSP90C machen? Warum erhalten Sie nur eine Bande im SDS-Gel, können HSP90C aber in 2 Fraktionen nach der Gelfiltration nachweisen?

Aufgabe 2 (30 Punkte)

Von HSP90-Homologen im Cytosol und im ER ist bekannt, dass sie eine schwache ATP-Hydrolyse-Aktivität besitzen ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$). Sie wollen feststellen, ob dies auch für das plastidäre HSP90C zutrifft. Also klonieren Sie die HSP90C-cDNA, überexprimieren rekombinantes HSP90C in *E. coli* und reinigen es bis zur Homogenität.

Nun mischen Sie 1 μM HSP90C in einem geeigneten Reaktionspuffer mit 0,4 μCi [α - ^{32}P]ATP (Stichtag 1.12.2005; 3000 Ci/mmol; Versuchstag: 24.12.2005; $T_{1/2}$ ^{32}P : 14,5 d) und 500 μM , 250 μM , 100 μM , 50 μM und 25 μM ATP (Endvolumen: 20 μl) und inkubieren die Reaktion bei 30°C. Anschließend entnehmen Sie 1 μl -Proben nach 0, 30 und 60 min, pipettieren diese direkt auf Polyethylenimin-Cellulose, führen eine Dünnschichtchromatographie durch und detektieren die radioaktiven Signale mit einem Phosphorimager.

Sie erhalten sehr prominente Flecken ca. in der Mitte der Platte und weitere im oberen Teil der Platte; letztere nehmen vor allem bei niedrigen ATP-Konzentrationen mit zunehmender Inkubationszeit an Intensität zu.

- Auf welchem Prinzip basiert diese Dünnschichtchromatographie (kurze Begründung)? Welche Moleküle trennen Sie in diesem Versuch damit und warum ist dies möglich?
- Wie hoch ist die Konzentration von [α - ^{32}P]ATP in Ihren Reaktionsansätzen am Versuchstag und in welchem Verhältnis steht es zum nicht-markierten ATP? Warum ist der Ausdruck „tracer“ für das markierte ATP wohl angemessen?

Schließlich Quantifizieren Sie die mit dem Phosphorimager detektierten Signale der Dünnschichtchromatographie und berechnen, wie viel % ATP nach 30 und 60 min in den 5 Ansätzen durch HSP90C hydrolysiert wurden:

min	500 μM ATP	250 μM ATP	100 μM ATP	50 μM ATP	25 μM ATP
0	0	0	0	0	0
30	4 \approx 20 μM	7,3 \approx 18,25	14,6 \approx 41 μM	20,5 \approx 102,5 μM	26 \approx 61,5 μM
60	8,1 \approx 40,5 μM	14,6 \approx 36,5	28,3 \approx 28,3 μM	40 \approx 20 μM	50 \approx 12,5 μM

- Bestimmen Sie die Werte für K_m und V_{max} für die Hydrolyse von ATP durch HSP90C (da die Hydrolyse-Aktivität sehr schwach ist, können Sie die Werte nach 30 und 60 min für die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten verwenden).

Aufgabe 3 (15 Punkte)

Von cytosolischen HSP90-Homologen in Hefe ist bekannt, dass sie bis zu 3% des Gesamtzellproteins ausmachen, also stark exprimiert werden. Sie möchten wissen, ob dies auch für das plastidäre HSP90C gilt und wollen also bestimmen, welchen Anteil HSP90C am Gesamtzellprotein von *Chlamydomonas* hat. Zu diesem Zweck tragen Sie 1, 2,5, 5 und 10 ng des rekombinanten HSP90C neben 2,5, 5, 7,5 und 15 μg Gesamtzellprotein von *Chlamydomonas* auf ein SDS-Gel auf, transferieren die Proteine auf Nitrocellulose und inkubieren die Membran mit dem spezifischen Antikörper gegen HSP90C. Anschließend quantifizieren Sie die Menge an gebundenem HSP90C-Antikörper und erhalten folgende Werte:

ng rekombinantes HSP90C	Menge an gebundenem HSP90C-Antikörper (relative Einheiten)	μg Gesamtzellprotein ng	Menge an gebundenem HSP90C-Antikörper (relative Einheiten)
1	0,1	$2,5 \cdot 10^3$	0,2
2,5	2,3	$5 \cdot 10^3$	4,5
5	14,8	$7,5 \cdot 10^3$	13,0
10	30,9	$15 \cdot 10^3$	25,3

- Bestimmen Sie den prozentualen Gewichtsanteil, den HSP90C am Gesamtzellprotein in *Chlamydomonas* hat.
- b) Mit welcher Methode hätte man diese Bestimmung auch machen können? Wie wären Sie da vorgegangen?

Die Antworten sind gut, aber nicht 100%-ig!

Klausur zum Biochemischen Methodenkurs WS 2003/2004

Aufgabe 1 (30 Punkte)

Sie haben eine cDNA aus einer cDNA-Bank isoliert, die aus *Chlamydomonas* mRNA hergestellt worden war. Ihre cDNA ist so in Bluescript kloniert, dass das 5'-Ende in die EcoRI- und das 3' Ende in die XhoI-Schnittstelle der Bluescript multiple cloning site ligiert ist (Abb. 1).

Die Sequenz des Gens, von dem Ihre cDNA stammt, ist Ihnen aus der Genom-Sequenz von *Chlamydomonas* bekannt. Nun wollen sie schauen, ob das Programm, das Ihnen die Exon-Intron-Grenzen vorhersagt, dies auch richtig gemacht hat. Dazu verdauen Sie ihre cDNA in Bluescript mit einigen Restriktionsenzymen und erstellen eine Restriktionskarte, um diese später mit der theoretischen des Vorhersageprogramms zu vergleichen. Die Verdau trennen Sie in einem Agarosegel auf und photographieren es neben einem Lineal (Abb. 2).

- Erstellen Sie eine Restriktionskarte ihres cDNA-Fragments (Bitte alle Schritte kurz erläutern; unbedingt die gesamte Fläche des Kästchenpapiers nutzen; Werte bitte runden!).
- Im Gel der Abbildung 2 sind alle Fragmente gleich dick gemalt. Ist dies realistisch? Warum?
- Die cDNA, die Sie suchen soll für ein 110 kDa-Protein kodieren. Diskutieren Sie, ob Sie annehmen dürfen, eine cDNA voller Länge isoliert zu haben (kurz und knapp!).

Aufgabe 2 (15 Punkte)

Ihre Eltern haben schon seit Jahren Streit mit den Nachbarn. Seitdem ihre Eltern sich (und Ihnen) ein Schwimmbad im Garten gebaut haben (Maße: 20m x 6m x 1,5m (im Schnitt)), sind die Nachbarn vor Neid außer sich, verdienen sie als Biologen doch nur ein Bruchteil von dem, was ihre Eltern so an der Börse kassieren. Einen Monat nach der Schwimmbad-Einweihung sind sie bei Freunden, die bei diesem Ereignis eingeladen waren und Bilder zeigen. Im Hintergrund erkennen Sie schockiert auf einem Bild die verhassten Nachbarn, wie sie etwas aus gelben Gefäßen ins Schwimmbad leeren. Sofort schöpfen Sie Verdacht und nehmen eine Probe von 1 ml aus dem Schwimmbad Ihrer Eltern mit ins Labor und messen diese im Szintillationszähler. Woran können Sie erkennen, dass es sich um ^{32}P handelt?

Der Szintillationszähler kommt auf 12,34 dpm. b) Wie viel $\mu\text{Ci } ^{32}\text{P}$ befindet sich im Schwimmbad? c) Wie viel war es bei der Einweihungsparty und wie viele Gefäße haben die Nachbarn wohl statt für sinnvolle Experimente für den Nachbarschaftskonflikt verwendet? (Halbwertszeit ^{32}P : 14,5 d; $1\mu\text{Ci} = 37.000 \text{ Bq}$; 1 Gefäß enthält 250 μCi) Was die Gesundheit der Schwimmer angeht, spielt es eine Rolle, ob die Nachbarn $^{32}\text{P-dATP}$ oder $^{32}\text{PO}_4^{2-}$ ins Schwimmbad geschüttet haben? d) Wenn es $^{32}\text{P-dATP}$ war, welche dATP-Konzentration (in M) war dann beim Einweihungsfest im Schwimmbad, wenn dessen spezifische Aktivität 250 Ci/mmol betrug? e) Was meinen Sie, war dieser Anschlag auf die Schwimmer gut durchdacht?

Aufgabe 3 (20 Punkte)

Sie möchten aus der pflanzlichen Plasmamembran eine Fe-Reduktase isolieren. Nach der Isolierung der Plasmamembran tragen Sie Ihre Proteinfraktion auf ein natives Gel auf, führen eine Elektrophorese durch und weisen die Fe-Reduktase mittels einer Aktivitätsfärbung im Gel nach. Als nächstes führen Sie eine isoelektrische Fokussierung durch. Ihr gesuchtes Protein fokussiert in der Nähe der Anode.

- Welches Chromatographieverfahren können Sie zur Reinigung des Proteins anwenden?
- Nach erfolgter Reinigung möchten Sie das Protein weiter charakterisieren. Dabei interessiert Sie, ob das Protein aus mehreren Untereinheiten besteht. Mit welchen Verfahren können Sie dies nachweisen?

Wie eingangs beschrieben zeigt Ihr Protein eine Enzymaktivität. Mit welcher Methode können Sie die prostetischen Gruppen des Proteins identifizieren? Wie gehen Sie vor?

Bitte alle Fragen **kurz** beantworten.

Abb.1
Restriktionskarte
des Bluescript SK-
Plasmids

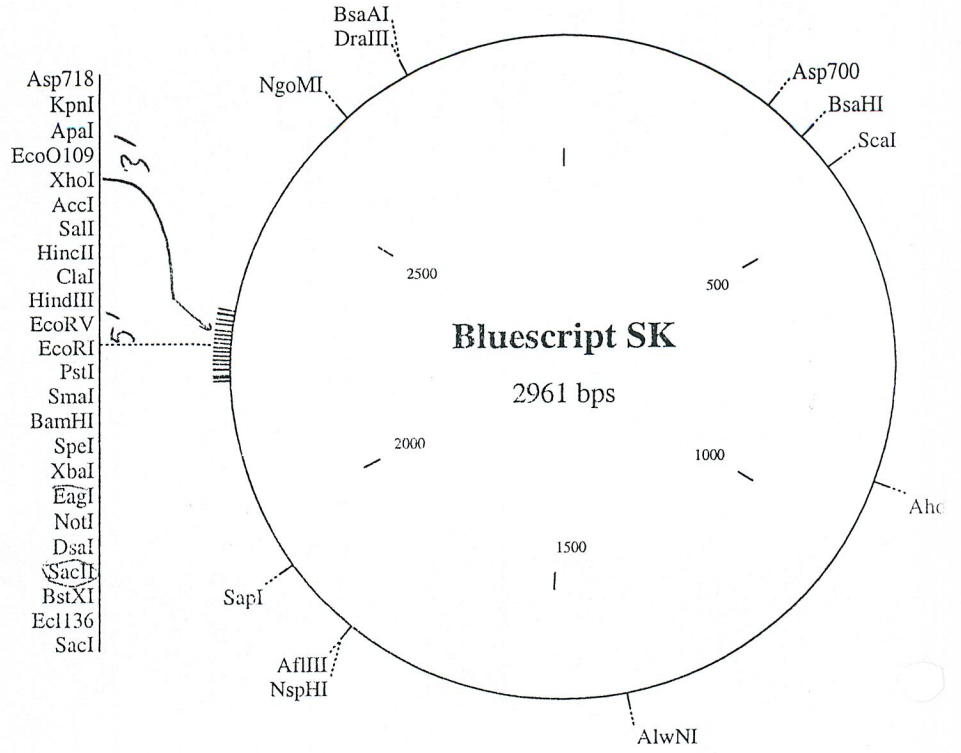
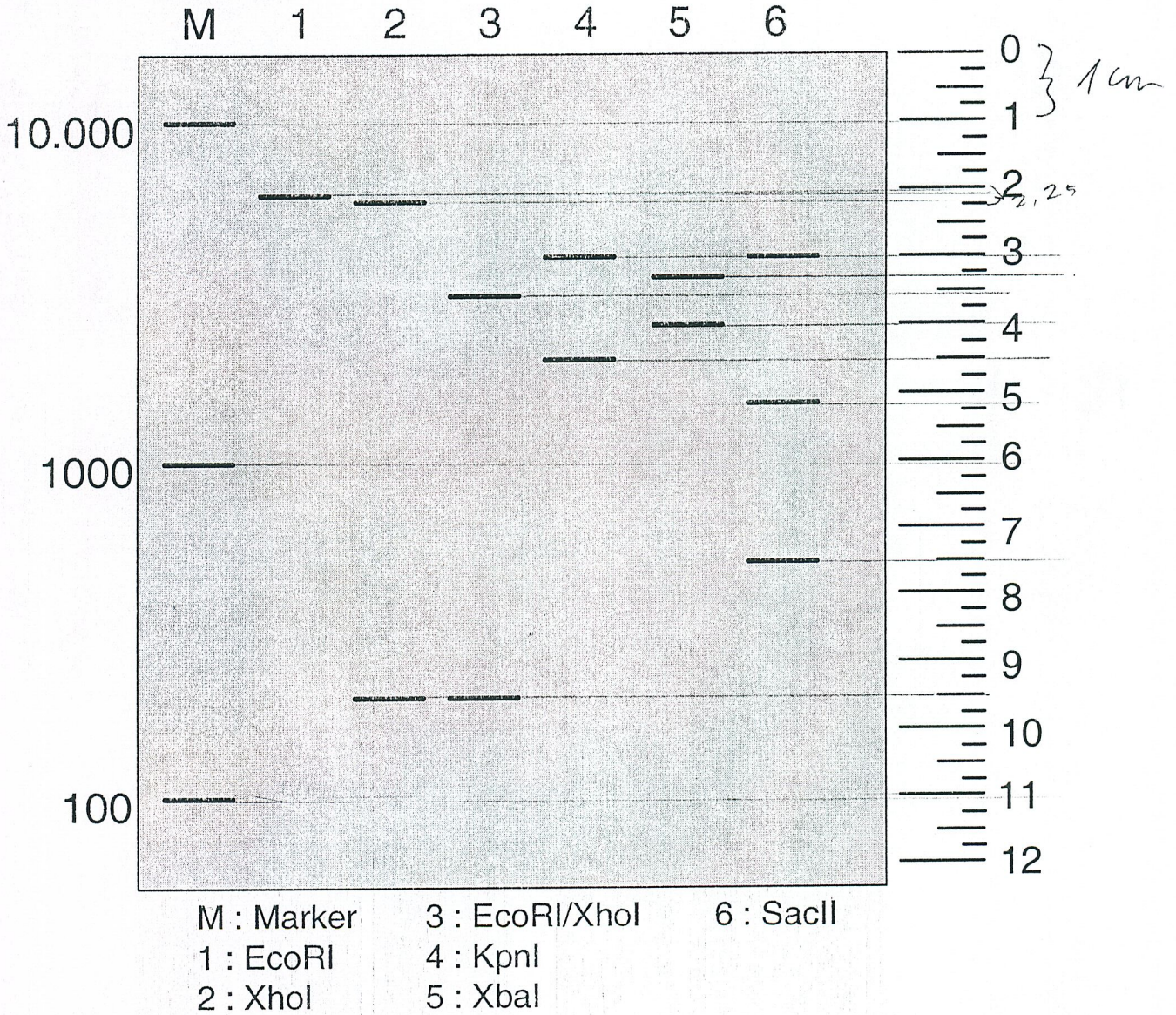


Abb.2
Agarosegel-Elektrophorese
einiger Restriktionsverdaus
ihrer cDNA in Bluescript



Aufgabe 4 (20 Punkte)

Prostaglandine gehören zur Klasse der Eicanoide, das sind Fettsäurederivate, die in vielfältiger Weise auf Gewebe einwirken können. Prostaglandine sind verantwortlich für die Entstehung von Fieber und den Entzündungen und den damit verbundenen Schmerzen. Sie entstehen aus der 20 C-Atome langen Fettsäure Arachidonsäure, in einer Reaktion, die von dem Enzym Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase katalysiert wird. Dieses Enzym, eine Cyclooxygenase, nutzt Sauerstoff um Arachidonsäure in PGG₂ zu verwandeln, den unmittelbaren Vorläufer vieler verschiedener Prostaglandine. →

- Die in der Tabelle angegebenen kinetischen Daten stammen aus der durch Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase katalysierten Reaktion. Bestimmen Sie aus den Daten K_m und V_{max} des Enzyms.
- Ibuprofen ist ein Inhibitor der Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase. Durch Hemmung der Prostaglandin-Synthase vermindert Ibuprofen Entzündungen und Schmerzen. Bestimmen Sie aus den in der Tabelle angegebenen kinetischen Daten, die in Gegenwart des Inhibitors Ibuprofen erhalten wurden, die Art der Hemmung, die Ibuprofen auf die Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase ausübt.
- Berechnen Sie unter Berücksichtigung des ermittelten Hemmtyp K_i aus den apparenten kinetischen Konstanten und den in Abwesenheit des Inhibitors bestimmten Werten.

Arachidonsäure (S) [mM]	Bildungsgeschwindigkeit von PGG ₂ mM/min = V	Bildungsgeschwindigkeit mit 10 mg/ml Ibuprofen mM/min 0(V)
0.5	23.5	16.7
1.0	32.2	25.3
1.5	36.9	30.5
2.0	41.8	37.0
2.5	44.0	38.9

Tabelle 1

Aufgabe 5 (15 Punkte)

- Definieren Sie folgende Begriffe:

- pH
- pK
- pl

- Schätzen Sie die Nettoladung folgendes Peptids bei pH 3, pH 6 und pH 10.5 ab:

G-V-C-P-A-Y-N-R-H-A

	pK α -COOH	pK α -NH ₂	pK Seitenkette
A	2.3	9.8	
C	1.9	10.7	8.3
G	2.3	9.7	
H	1.8	9.3	6.0
N	2.1	8.7	
P	1.9	10.6	
R	1.8	8.9	12.4
V	2.2	9.7	
Y	2.2	9.2	10.4

Tabelle 2