

ENZYME II

Beispiele für Stoffinhalte aus der Chemie als Grundlage für das Verständnis dieses Teiles: Säurestärke (pK_s Wert), Begriff der Katalyse, Massenwirkungsgesetz und Gleichgewichtsverschiebung, Übergangsmetalle, funktionelle Gruppen und deren Reaktivität (z. B. Mechanismus der nukleophilen Substitution)

Schlüsselwörter:

Enzymkinetik: Aktivitätsdiagramm; Herleitung der Michaelis-Menten Gleichung; experimentelle Bestimmung und Bedeutung von K_M , V_{max} , Wechselzahl und K_{kat} .

Mechanismen der Enzymkatalyse: kovalente und allgemeine Säure-Base-Katalyse (Identifizierung relevanter Aminosäuren durch Betrachtung der funktionellen Gruppen; z. B. Aldolase mit kovalentem Addukt, katalytische Triade des Chymotrypsins); Katalyse durch Annäherung (z. B. NMP-Kinase); Katalyse mit Metallionen (z. B. Carboanhydrase); redox-gekoppelte Umsetzung (z. B. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase oder Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus Glykolyse/Pentosephosphatweg); Gleichgewichtsverschiebung durch Kopplung von Reaktionen (Bildung von Pyrophosphat bei Synthesen, z. B. DNA/RNA-Polymerasen und Aminosäureaktivierung in der Proteinbiosynthese, und seine umgehende Spaltung); Definition des Ribozyms mit Beispiel.

Regulation der Enzymaktivität: Allosterie und Beispiele für entsprechende Regulation (Phosphofruktokinase und Pyruvatdehydrogenase inkl. Phosphorylierung, Anwendung des Prinzips allosterischer Regulation beim *lac*-Repressor); regulatorische Untereinheiten (z. B. Proteinkinasen und cAMP, Aspartat-Carbamoyl-Transferase); Strategie und Wahl des Ansatzpunktes der Rückkopplungshemmung (z. B. Hämbiosynthese); ausgewählte posttranslationale Modifikationen: Phosphorylierung (Ser/Thr, Tyr; Glykogenphosphorylase/bei Allosterie genannte Enzyme und Wachstumsfaktorrezeptoren), γ -Carboxyglutamatbildung (Mangel an Vitamin K); proteolytische Spaltung (Blutgerinnung, Signalpeptid in der Proteinsekretion, Zymogene; Laboranwendung zur Herstellung von Spaltpeptiden für Sequenzierung); Proteine mit mehreren katalytischen Zentren (z. B. die ersten drei Schritte der Pyrimidinbiosynthese); Multienzymkomplexe (z. B. Pyruvatdehydrogenasekomplex, Fettsäuresynthase).

Hemmung enzymatischer Reaktionen: reversible Hemmung (kompetitiv, nicht-kompetitiv und unkompetitiv; graphische Darstellung nach Lineweaver-Burk); Bildung von Chelatkomplexen; irreversible Hemmung (z. B. Wirkungsweise von Aspirin und Penicillin sowie von Hemmstoffen der Serinproteasen).

Literatur:

relevante Abschnitte der empfohlenen Lehrbücher in der jeweils aktuellsten Auflage: LEHNINGER/NELSON/COX „Biochemie“; STRYER „Biochemie“.

Für die Auswertung des Versuchs wird Millimeterpapier benötigt. Bitte bringen Sie dieses am Kurstag mit!

Vorbemerkung:

Enzymkinetik

Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit V_0 enzymatisch katalysierter Reaktionen wird als Konzentrationsänderung des Substrates oder des Produktes pro Zeiteinheit ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) definiert. Sie ist abhängig von einer Reihe von Faktoren, die die katalytischen Eigenschaften des Enzyms beeinflussen. Dazu gehören vor allem Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke des Reaktionsmilieus. Daneben ist die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion auch von der aktuellen Konzentration des Substrates abhängig. Die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion strebt mit steigender Substratkonzentration einem Maximalwert (Maximalgeschwindigkeit V_{max}) zu. Die Maximalgeschwindigkeit ist ein wesentliches Charakteristikum enzymatisch katalysierter Reaktionen. Im einfachsten Fall, bei einer Reaktion, in der nur ein Substrat umgesetzt wird, lässt sich die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration mit Hilfe der von MICHAELIS und MENTEN angegebenen Gleichung beschreiben:

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} \cdot [\text{S}]}{K_{\text{M}} + [\text{S}]} \quad (\text{Gleich. 1})$$

[S] = Substratkonzentration zu Beginn einer Reaktion

V_0 = Anfangsgeschwindigkeit einer Reaktion bei der entsprechenden Substratkonzentration [S]

V_{\max} = Maximalgeschwindigkeit einer Reaktion, die bei Substratsättigung erreicht wird

K_M = MICHAELIS-Konstante

Numerisch entspricht die MICHAELIS-Konstante genau derjenigen Substratkonzentration, bei der die enzymatische Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Die Ermittlung der MICHAELIS-Konstante hat eine große praktische Bedeutung bei der Beurteilung der Aktivität eines Enzyms und der Wirkungsweise von Enzyminhibitoren.

Die MICHAELIS-Konstante lässt sich graphisch ermitteln, wenn man die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei verschiedenen Substratkonzentrationen unter sonst identischen Bedingungen misst und die gefundenen Werte V_0 gegen [S] aufträgt. Dabei ergibt sich eine hyperbolische Kurve, die bei hohen Substratkonzentrationen der Maximalgeschwindigkeit V_{\max} zustrebt. Aus der Kurve lässt sich die halbmaximale Geschwindigkeit und die zugehörige Substratkonzentration, die der MICHAELIS-Konstante des Enzyms entspricht, abschätzen (vgl. Abb. 2, 3 und 4). Diese Bestimmungsmethode der MICHAELIS-Konstante ist jedoch verhältnismäßig ungenau, da sich V_{\max} in den wenigsten Fällen eindeutig festlegen lässt. Die graphische Bestimmung wird wesentlich vereinfacht durch eine Auftragung nach LINEWEAVER und BURK, der eine einfache Umformung der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung (s. Glch. 1) zugrunde liegt.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{Glch. 2})$$

Bei einer Auftragung von $1/V_0$ gegen $1/[S]$ erhält man eine gerade Linie, die die $1/V_0$ -Achse (Ordinate) im Punkt $1/V_{\max}$ und die $1/[S]$ -Achse (Abszisse) im Punkt $-1/K_M$ schneidet (vgl. Abb. 2, 3 und 4). Aus diesen Schnittpunkten lassen sich sowohl die Maximalgeschwindigkeit als auch die MICHAELIS-Konstante bestimmen. Diese Auftragung erlaubt auch dann die Bestimmung von K_M und V_{\max} eines Enzyms, wenn keine Messungen im Substratsättigungsbereich vorliegen. Der Nachteil der Auftragung nach LINEWEAVER und BURK besteht in der erschwerten Wichtung der experimentellen Werte, da die mit einem großen Fehler behafteten Ergebnisse bei niedrigen Substratkonzentrationen überbewertet werden.

Fast alle Enzyme können durch spezifische Inhibitoren gehemmt oder inaktiviert werden. Im normalen Stoffwechsel spielt die Hemmung von Enzymaktivitäten - ebenso wie die Aktivierung - eine bedeutende Rolle bei der Regulation von metabolischen Prozessen. Daneben lassen sich in vielen Fällen Vergiftungserscheinungen oder auch die Wirkung bestimmter Pharmaka auf eine Hemmung spezifischer enzymatischer Reaktionen zurückführen. Grundsätzlich unterscheidet man bei der Hemmung von Enzymaktivitäten zwischen irreversibler und reversibler Hemmung. Bei einer irreversiblen Hemmung werden funktionelle Gruppen, die für die Enzymaktivität benötigt werden, blockiert. Dadurch wird die katalytische Eigenschaft des Enzyms irreversibel zerstört. Irreversible Hemmung von Enzymen findet man häufig bei Vergiftungen.

Eine große Rolle in der Stoffwechselregulation spielen die reversiblen Hemmungstypen. Zu ihnen gehören u. a. die kompetitive Hemmung, die nichtkompetitive Hemmung und die unkompetitive Hemmung.

Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms (vgl. Abb. 1). Durch erhöhte Substratkonzentrationen kann der Inhibitor verdrängt werden, so dass bei sehr hohen Substratkonzentrationen die Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion erreicht wird. Die MICHAELIS-Konstante des Enzyms nimmt in Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors zu (vgl. Abb. 2). Die Auftragung nach LINEWEAVER und BURK ergibt eine Gerade, die die Gerade der ungehemmten Reaktion auf der $1/V_0$ -Achse (Ordinate) im Punkt $1/V_{\max}$ schneidet (vgl. Abb. 2). Aus dem Schnittpunkt

der Geraden mit der $1/[S]$ -Achse (Abzisse) lässt sich die MICHAELIS-Konstante (K_{Mi}) der gehemmten Reaktion errechnen, die mit der Inhibitor-Konstante K_i über folgende Formel verknüpft ist:

$$K_{Mi} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_M \quad (\text{umgeformt: } K_i = K_M \cdot [I] / K_{Mi} - K_M) \quad (\text{Gleich. 3})$$

[I]: molare Konzentration des Inhibitors (Konzentration in den Reagenzgläsern/ Verdünnung!). Mit steigender Inhibitorkonzentration erhöht sich der Wert von K_{Mi} . Die Inhibitorkonstante K_i ist ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor. Als klinisch relevantes Beispiel gelten die Statine in der Hemmung der Cholesterolsynthese. Bitte erklären Sie die relative Lage von K_M/K_i (Medikament)! Bei der nichtkompetitiven Hemmung wird der Inhibitor nicht am aktiven Zentrum, sondern an einer anderen Stelle des Enzyms gebunden (vgl. Abb. 1). Dadurch wird die Aktivität des Enzyms herabgesetzt. Da in diesem Fall der Inhibitor nicht durch das Substrat vom Enzym verdrängt werden kann, wird auch bei sehr hohen Substratkonzentrationen die Maximalgeschwindigkeit des Enzyms nicht erreicht. Die MICHAELIS-Konstante der gehemmten im Vergleich zur ungehemmten Reaktion verändert sich nicht (vgl. Abb. 3), weil die Affinität des Substrates zum Enzym erhalten bleibt. Bei der Auftragung nach LINEWEAVER und BURK ergibt sich für die nichtkompetitive Hemmung daher eine Gerade, die die $1/[S]$ -Achse (Abszisse) im gleichen Punkt schneidet, wie die Gerade der ungehemmten Reaktion (vgl. Abb. 3). Die Maximalgeschwindigkeit der gehemmten Reaktion lässt sich aus dem Schnittpunkt mit der $1/V_0$ -Achse (Ordinate) bestimmen. Die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes (K_i) lässt sich mit Hilfe der folgenden Formel berechnen:

$$V_i = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (\text{Gleich. 4})$$

Hierbei ist V_i die in Anwesenheit des Inhibitors erhaltene Maximalgeschwindigkeit, $[I]$ die molare Konzentration des Inhibitors und V_{\max} die Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion.

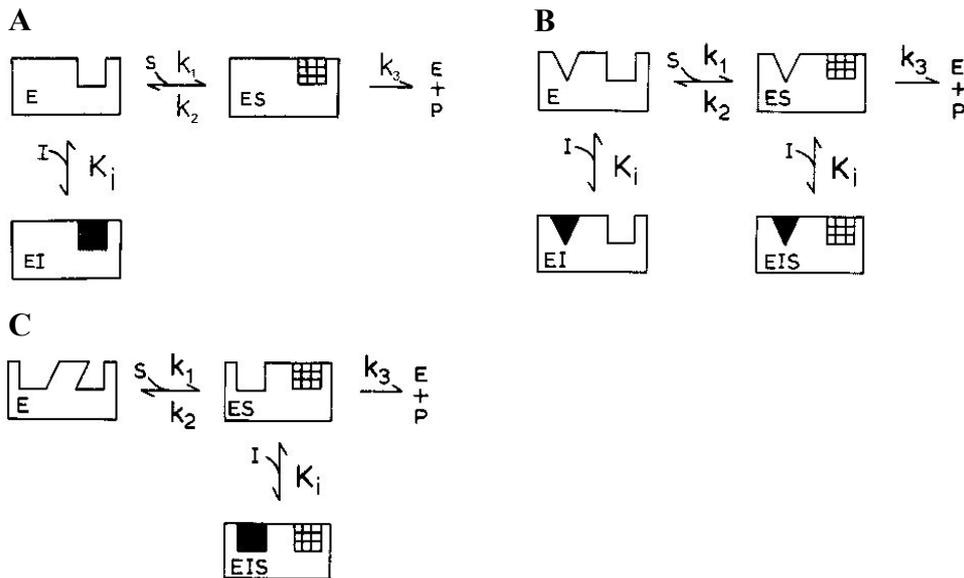


Abbildung 1: Reaktionsschemata einer A) kompetitiven Hemmung, B) nichtkompetitiven Hemmung sowie einer C) unkompetitiven Hemmung (P.C. Engel, Enzyme kinetics, Chapman & Hall 1977).

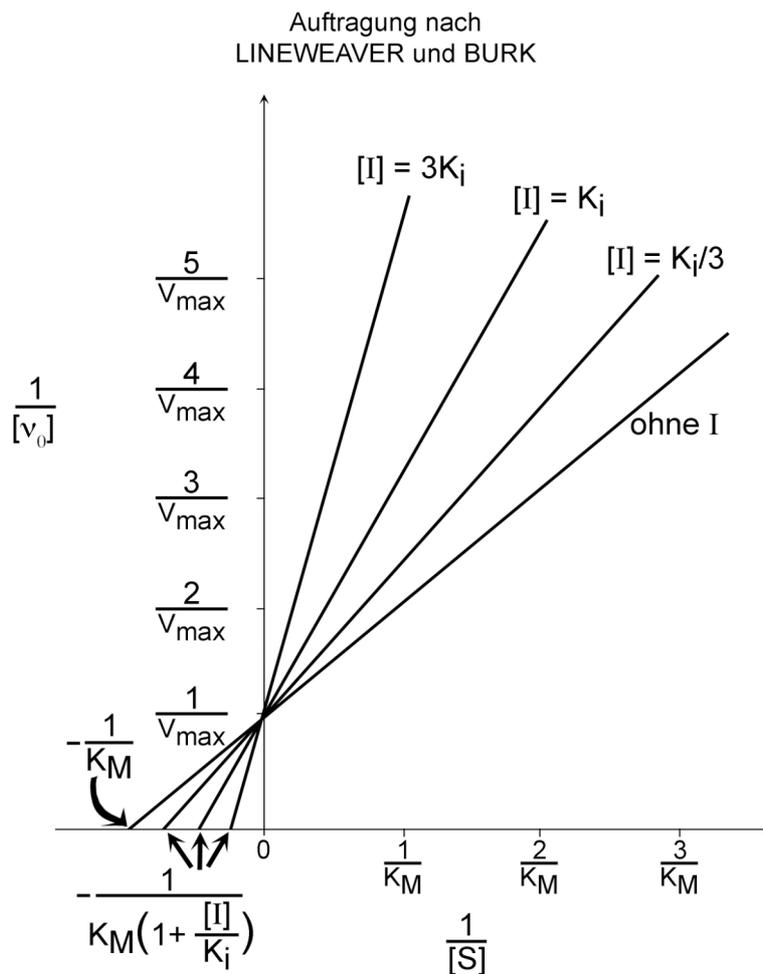
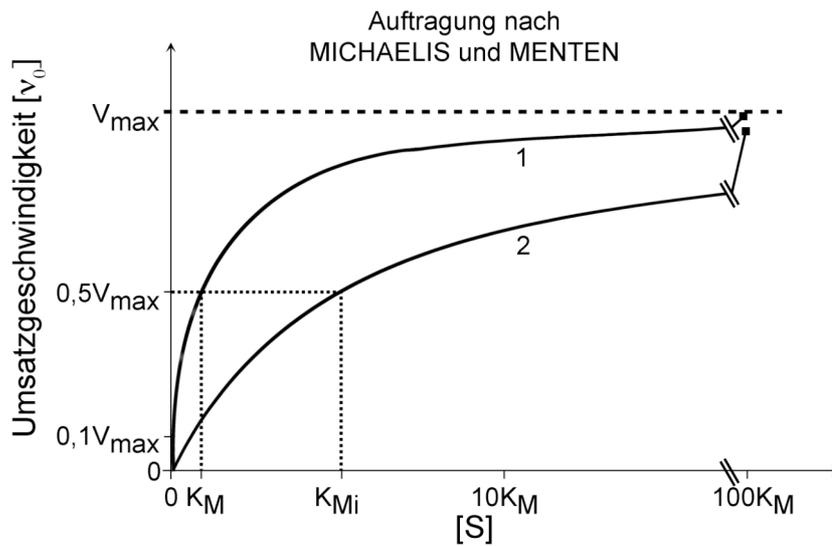


Abbildung 2: Graphische Darstellung einer kompetitiven Hemmung nach MICHAELIS-MENTEN sowie LINEWEAVER-BURK, Abb. nach und zusätzlich modifiziert: A. Schellenberger, Enzymkatalyse, Springer-Verlag 1989.

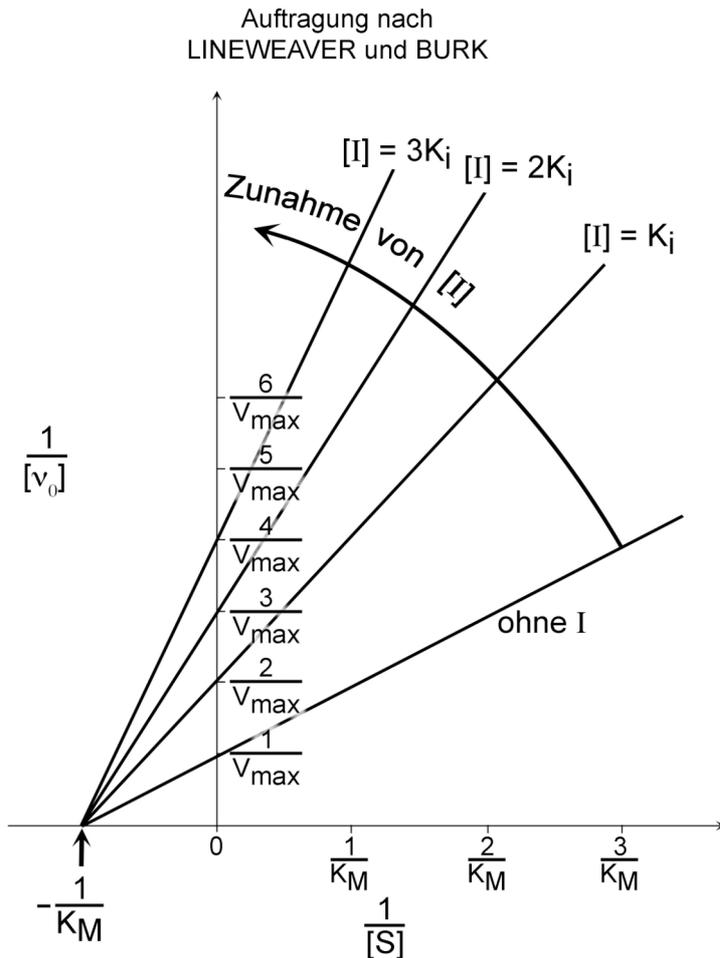
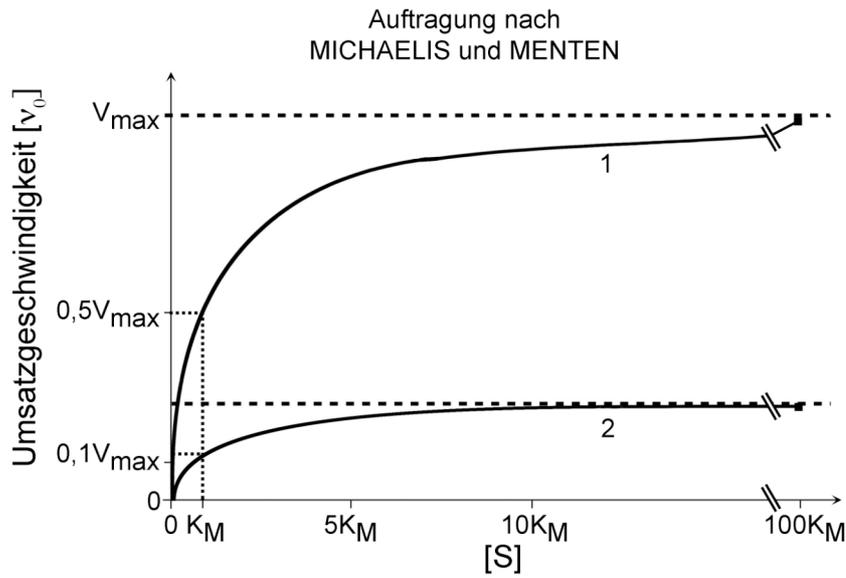


Abbildung 3: Graphische Darstellung einer nichtkompetitiven Hemmung nach MICHAELIS-MENTEN sowie LINEWEAVER-BURK, Abb. nach und zusätzlich modifiziert: A. Schellenberger, Enzymkatalyse, Springer-Verlag 1989.

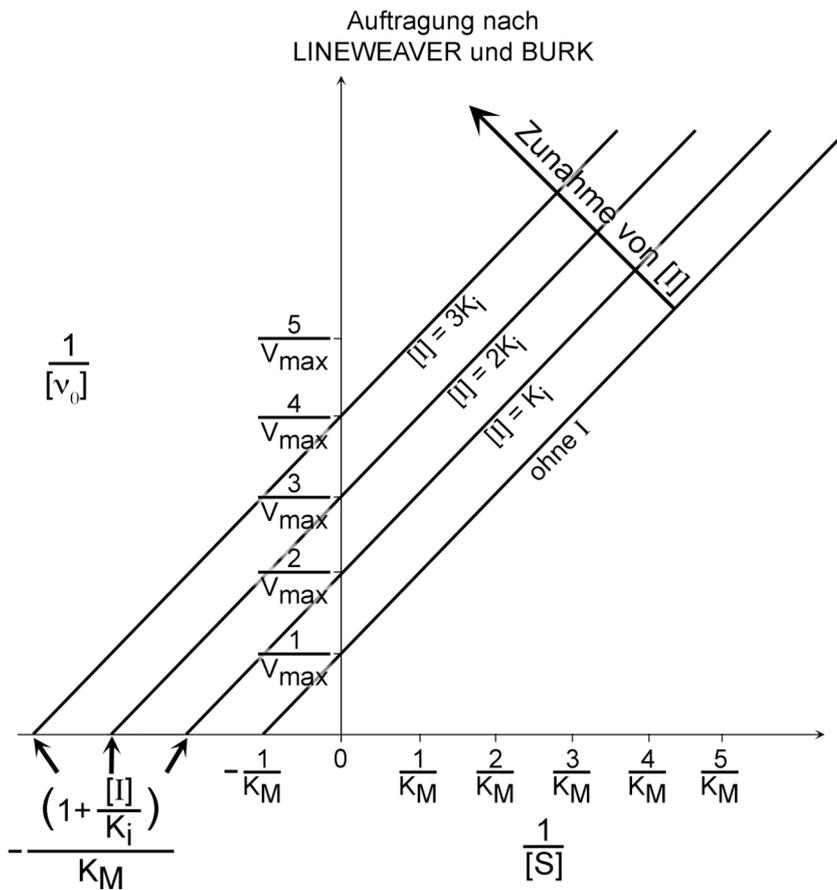
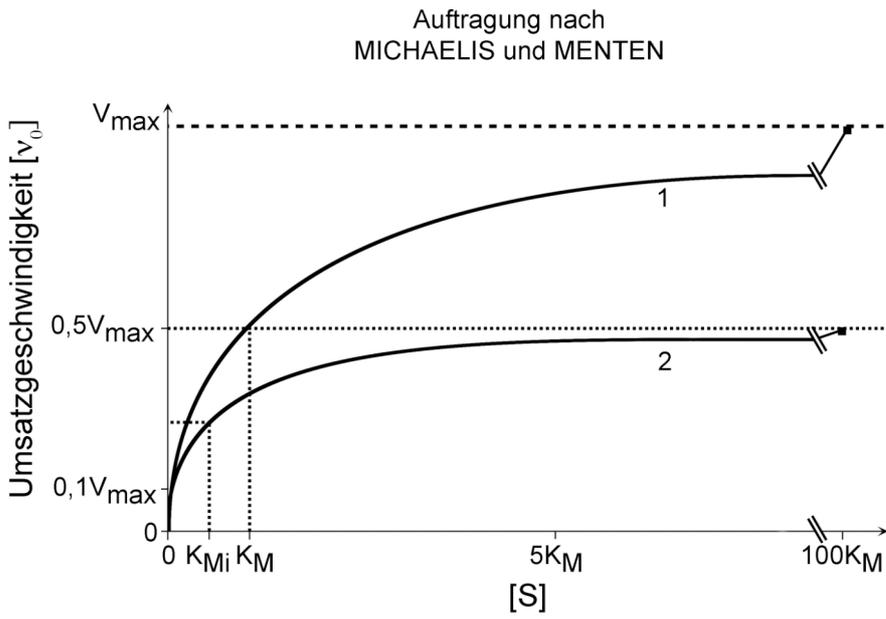


Abbildung 4: Graphische Darstellung einer unkompetitiven Hemmung nach MICHAELIS-MENTEN sowie LINEWEAVER-BURK, Abb. nach und zusätzlich modifiziert: A. Schellenberger, Enzymkatalyse, Springer-Verlag 1989.

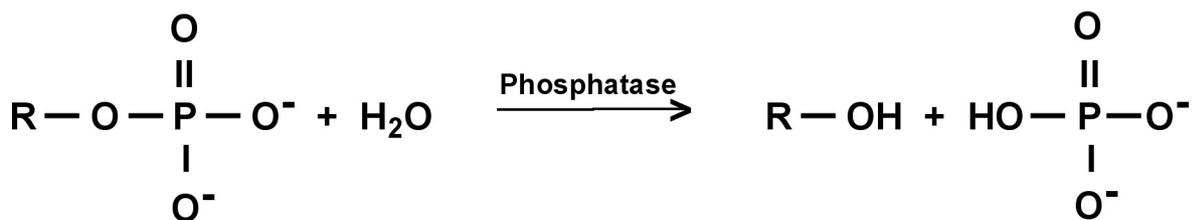
Wird der Inhibitor nur von dem Enzym-Substrat-Komplex und nicht von dem freien Enzym gebunden, handelt es sich um eine unkompetitive Hemmung. Der Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex wird nicht zum Enzym-Produkt-Komplex umgesetzt. In der Auftragung nach LINEWEAVER und BURK ergibt sich für eine enzymatische Reaktion in Gegenwart eines unkompetitiven Inhibitors eine Gerade, die parallel zur Geraden für die ungehemmte Reaktion verläuft (vgl. Abb. 4). Die Inhibitor-Konstante lässt sich ebenfalls nach Formel 4 ermitteln.

Aufgabe:

Die MICHAELIS-Konstante sowie die Maximalgeschwindigkeit einer sauren Phosphatase sollen für das Substrat p-Nitrophenylphosphat ermittelt und der Hemmungstyp durch Phosphat-Ionen, die die enzymatische Aktivität dieser sauren Phosphatase beeinflussen, bestimmt werden. Die entsprechende Inhibitor-Konstante (K_i) soll errechnet werden.

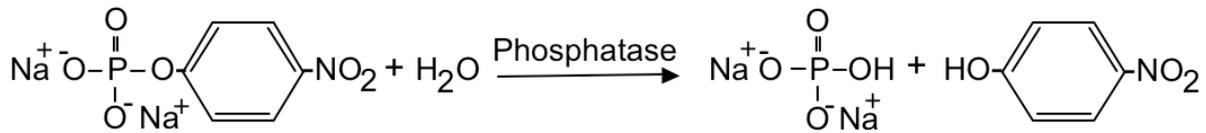
Prinzip:

Phosphatasen sind ubiquitär in der Natur vorkommende Enzyme, die die Hydrolyse der Esterbindung in Phosphateestern katalysieren. Dabei entstehen freies Phosphat und ein der Natur des Substrates entsprechender Alkohol.

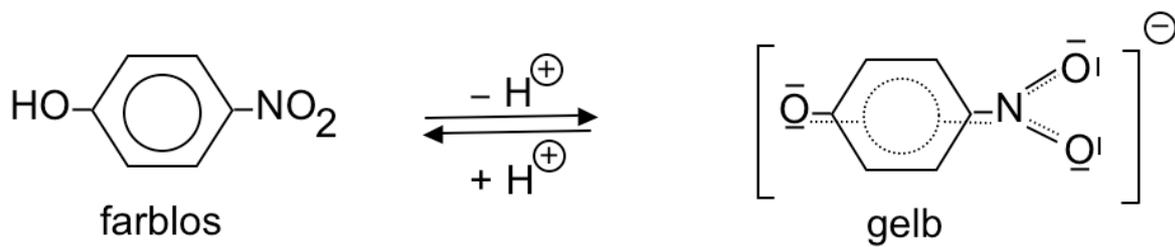


Phosphatasen besitzen ein breites Substratspektrum, d. h. sie sind in der Lage die Hydrolyse sehr unterschiedlicher Phosphatester zu katalysieren. Phosphatasen werden nach dem pH-Optimum der von ihnen katalysierten Reaktion in die sauren Phosphatasen (Optimum von pH 4,5 - 6,5) und die alkalischen Phosphatasen (Optimum von pH 8,5 - 10) eingeteilt. Die Aktivität der Phosphatasen kann aufgrund des breiten Substratspektrums mit verschiedenartigen Phosphateestern gemessen werden. Ein geeignetes Substrat ist das p-Nitrophenylphosphat, das durch die

katalytische Aktivität der Phosphatasen in freies Phosphat und p-Nitrophenol gespalten wird.



p-Nitrophenol lässt sich spektrophotometrisch bei 405 nm nachweisen. Der Grund liegt in der Gelbfärbung des im alkalischen Milieu in dissoziierter Form vorliegenden p-Nitrophenols als Nitrophenolat-Ion.



Die verwendete saure Phosphatase lässt sich durch Phosphat-Ionen und durch Fluorid-Ionen hemmen. Beide Inhibitoren hemmen die saure Phosphatase in unterschiedlicher Weise.

Durchführung:

Ansatz ohne Inhibitor

In 11 Reagenzgläser werden Substrat und Puffer dem Pipettierplan entsprechend pipettiert (Doppelbestimmungen)!

Die Reagenzgläser werden mit Stopfen verschlossen und ihr Inhalt wird gründlich gemischt. Dann werden die Gläser mindestens 10 min im Wasserbad bei 37 °C vorinkubiert. Die Enzymlösung steht bereits zur Temperierung im Wasserbad. Dann wird in Abständen von einer halben Minute (Stoppuhr) zu jedem Reagenzglas 1,0 ml Enzymlösung zugesetzt, gut gemischt und weiter bei 37 °C inkubiert. Nach genau 10 min (!) wird aus jedem Ansatz 0,2 ml Reaktionsgemisch entnommen und in vorbereitete Küvetten gegeben, die je 0,8 ml NaOH (0,1 mol/l) enthalten (gut mischen!). Es bildet sich das gelb gefärbte Nitrophenolat-Ion. Die Extinktion der verschiedenen Proben wird im Photometer bei 405 nm gegen den Leerwert gemessen.

Pipettierplan 1:

Reagenzglas Nr.	0	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	
p-Nitrophenylphosphat 20 mmol/l	-	0,2	0,3	0,4	1,0	2,0	ml
Na-Citrat-Puffer 50 mmol/l pH 4,9	9,0	8,8	8,7	8,6	8,0	7,0	ml
10 min bei 37 °C vorinkubieren							
Enzym 15 mg/100 ml in 0,1 M NaCl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	ml

Ansatz mit Inhibitor

Für die Bestimmung des Hemmtyps durch Phosphat-Ionen auf die katalytische Aktivität der sauren Phosphatase werden in 11 Reagenzgläser, dem folgenden Pipettierplan entsprechend, Substrat, Puffer und Inhibitor pipettiert. Die Reagenzgläser werden mit Stopfen verschlossen, nach dem Durchmischen mindestens 10 min im Wasserbad vorinkubiert und die Reaktion durch Zusatz von 1,0 ml temperierter Enzymlösung gestartet (Halbminuten-Abstand, Stoppuhr). Auch hier wird jedem Röhrchen nach genau 10 min (!) 0,2 ml Reaktionsgemisch entnommen und in eine vorbereitete Küvette mit 0,8 ml NaOH (0,1 mol/l) pipettiert. Die Messung der Extinktion bei 405 nm wird genauso durchgeführt wie bei dem Reaktionsansatz ohne Inhibitor.

Pipettierplan 2:

Reagenzglas Nr.	0	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	
p-Nitrophenylphosphat 20 mmol/l	-	0,2	0,3	0,4	1,0	2,0	ml
Na-Citrat-Puffer 50 mmol/l pH 4,9	8,0	7,8	7,7	7,6	7,0	6,0	ml
Na H ₂ PO ₄ 10 mmol/l	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	ml
10 min bei 37 °C vorinkubieren							
Enzym 15 mg/100 ml in 0,1 M NaCl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	ml

Aus den gemessenen Extinktionen lässt sich mit Hilfe des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes die gebildete Menge an p-Nitrophenol errechnen. Der molare Extinktionskoeffizient des Nitrophenolat-Ions beträgt bei 405 nm:

$$\varepsilon_{405} = 18,5 \cdot 10^3 \left[\frac{l}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$$

Da im Versuch die Reaktionsgeschwindigkeit während der ersten 10 min konstant ist, kann diese in μmol gebildetes p-Nitrophenol pro Sekunde bestimmt werden. Tragen Sie die erhaltenen Werte in die beigefügte Tabelle ein. Mit Hilfe der Auftragung nach LINEWEAVER und BURK lassen sich die Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion und die MICHAELIS-Konstante des Enzyms für das Substrat p-Nitrophenylphosphat bestimmen. Tragen Sie die mit dem Inhibitor erhaltenen Werte ebenso auf und bestimmen Sie den Hemmungstyp des verwendeten Inhibitors (kompetitiv, nichtkompetitiv, unkompetitiv). Berechnen Sie mit Hilfe der oben für den jeweiligen Hemmungstyp angegebenen Formel die Inhibitor-Konstante K_i . Zur Auswertung des Versuchs werden ein Taschenrechner und Millimeterpapier benötigt.

Beispielrechnung:

Bei einer Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase wurde bei einer aktuellen Substratkonzentration von 0,4 mmol/l und einer Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$ ein

Extinktionswert von $E = 0,208$ gemessen. Das bedeutet, die Konzentration an Produkt in der Küvette beträgt nach LAMBERT-BEER: $E = \varepsilon \cdot c \cdot d \rightarrow c = E/(\varepsilon \cdot d)$

$$\varepsilon_{405} = 18,5 \cdot 10^3 \left[\frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$$

$$c = E/(18,5 \cdot 10^3) \text{ mol} \cdot \text{cm}/(\text{l} \cdot \text{cm}) \quad | \cdot 5 \quad (1:5 \text{ verdünnter Reaktionsansatz in Küvette})$$

$$\text{Beispiel } E = 0,208 \rightarrow c = 0,208/(18,5 \cdot 10^3) \text{ mol/l} = 0,0112 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} \quad | \cdot 5$$

Konzentration im Reaktionsansatz ist: $0,056 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$

$$(0,056 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} = 0,056 \text{ mmol/l} = 0,056 \cdot 10^3 \text{ } \mu\text{mol/l})$$

Für die Geschwindigkeit der Umsetzung ergibt sich dann:

$$V_0 = c/600 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{l} \cdot \text{s})$$

$$V_0 = 0,056 \cdot 10^3/600 \text{ } [\mu\text{mol/l} \cdot \text{s}]$$

oder

$$= 0,093 \text{ } [\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$$

Diese Werte können direkt für die graphische Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit nach MICHAELIS und MENTEN verwendet werden. Für die Darstellung nach LINEWEAVER und BURK müssen die Reziprokwerte der erhaltenen Meßwerte gebildet werden:

$$\frac{1}{[S]} = \frac{1}{0,4} \cdot \frac{1}{\text{mmol/l}} = 2,5 \text{ } [\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1}]$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{0,093} \cdot \left[\frac{1}{\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}} \right] = 10,75 \text{ } [\text{l} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{mol}^{-1}]$$

Diese Werte können nun in ein Koordinatensystem eingetragen werden, bei dem die Ordinate die $1/V_0$ -Achse und die Abszisse die $1/[S]$ -Achse ist.

Ansatz ohne Inhibitor:

Glas Nr.	[S] $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$	$\frac{1}{[S]}$	ΔE_{405}	c Nitrophenol $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$	V_0 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{s}}$	$\frac{1}{V_0}$
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

[S] mmol/l: Substratkonzentration in dem jeweiligen Reagenzglas (Verdünnung!)

Ansatz mit Inhibitor

Glas Nr.	[S] $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$	$\frac{1}{[S]}$	ΔE_{405}	c Nitrophenol $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$	V_0 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{s}}$	$\frac{1}{V_0}$
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

[S] mmol/l: Substratkonzentration in dem jeweiligen Reagenzglas (Verdünnung)