

Michaelis-Menten kinetics and inhibitors

Exercise 1:

Deoxyadenosine kinase catalyzes the transfer of a phosphoryl group from ATP to deoxyadenosine. This reaction is inhibited by d-ATP. The rate of the transfer reaction was measured at different concentrations of deoxyadenosine, in the absence of d-ATP (experiment A) and in the presence of d-ATP (experiment B). The reaction rates, given in the following table, are expressed in nanomoles of deoxyadenosine converted to d-ATP during the first 5 minutes of the reaction.

<i>desoxyadenosine</i> (<i>mM</i>)	experiment A	experiment B
0,15	2,65	1,3
0,25	3,90	1,9
0,35	4,80	2,4
0,50	5,90	3,0
1,00	8,00	4,0

1/ Determine the K_M of deoxyadenosine.

2/ Determine the **type of inhibition** by d-ATP and the corresponding **Ki**.

Exercise 2:

We want to characterize an enzyme that has just been purified. To do this, two series of experiments are carried out in which the initial velocities (v_i) are measured: the first in the presence of an inhibitor **X**, and the second in the presence of an inhibitor **Y** (X and Y are used at a concentration of 10^{-4} M). In the following table, the v_i values are given, expressed in μM of substrate converted per minute.

$1/S \text{ M}^{-1} \cdot 10^5$	$1/v$ in the presence of X	$1/v$ in the presence of Y
0,02	0,092	0,08
0,05	0,14	0,14
0,10	0,22	0,24
0,14	0,28	0,32
0,20	0,38	0,44

Knowing that one inhibitor is **competitive** and the other is **non-competitive**:

- 1/ Plot the **kinetic curve** in the absence and in the presence of the inhibitor.
- 2/ Calculate the **kinetic parameters** of the enzyme.
- 3/ Calculate the **K_i** for each inhibitor.

Solutions

- 1) $K_M = 0,55 \text{ mM}$
- 2) Inhibition non compétitive ; $K_I = 0,13 \text{ }\mu\text{M}$.

Exercice 2 :

- 1) Après le tracé des courbes (en présence de X et en présence de Y), on peut tirer les conclusions suivantes.
 - L'un des inhibiteur est compétitif, donc l'enzyme en présence de cet inh. possède le même V_m qu'en absence de tout inhibiteur. Dans ce cas K_m change, $1/K_m$ plus petit que $1/K_m$.
 - Le 2^e inhibiteur est non compétitif, le K_m ne change pas, le V_m change (il diminue).

En conclusion, l'inhibiteur ayant la V_m la plus grande est **Y**, c'est **l'inhibiteur compétitif**.
Celui qui a le $1/K_m$ le plus grand est **X**, c'est donc **l'inhibiteur non compétitif**.

- 2) K_{mX} et V_{mY} représentent les paramètres de l'enzyme en absence de tout inhibiteur.
La courbe correspondante passe par les points $-1/K_m(X)$ et $1/V_m(Y)$.

- 3) Les paramètres cinétiques :

- Inhibiteur Y : $V_m(Y) = 25 \text{ }\mu\text{ M.mn}^{-1}$, $K_m(Y) = 50.10^{-5} \text{ M}$
- Inhibiteur X : $V_m(X) = 16,7 \text{ }\mu\text{M.mn}^{-1}$, $K_m(X) = 25.10^{-5} \text{ M}$
- en absence d'inhibiteur : **K_{mX} et V_{mY}** .

- 4) Calcul des K_I

$$K_{IX} = 2.10^{-4} \text{ M}, \quad K_{IY} = 10^4 \text{ M}.$$