

- 1) Un enzima che segue la cinetica Michaelis-Menten catalizza una reazione con le seguenti velocità iniziali (V_0) a diverse concentrazioni di substrato ($[S]$):

V_0 ($\mu\text{M s}^{-1}$)	$[S]$ (μM)
120	0.2
180	0.4
240	0.8
280	1.4
300	2

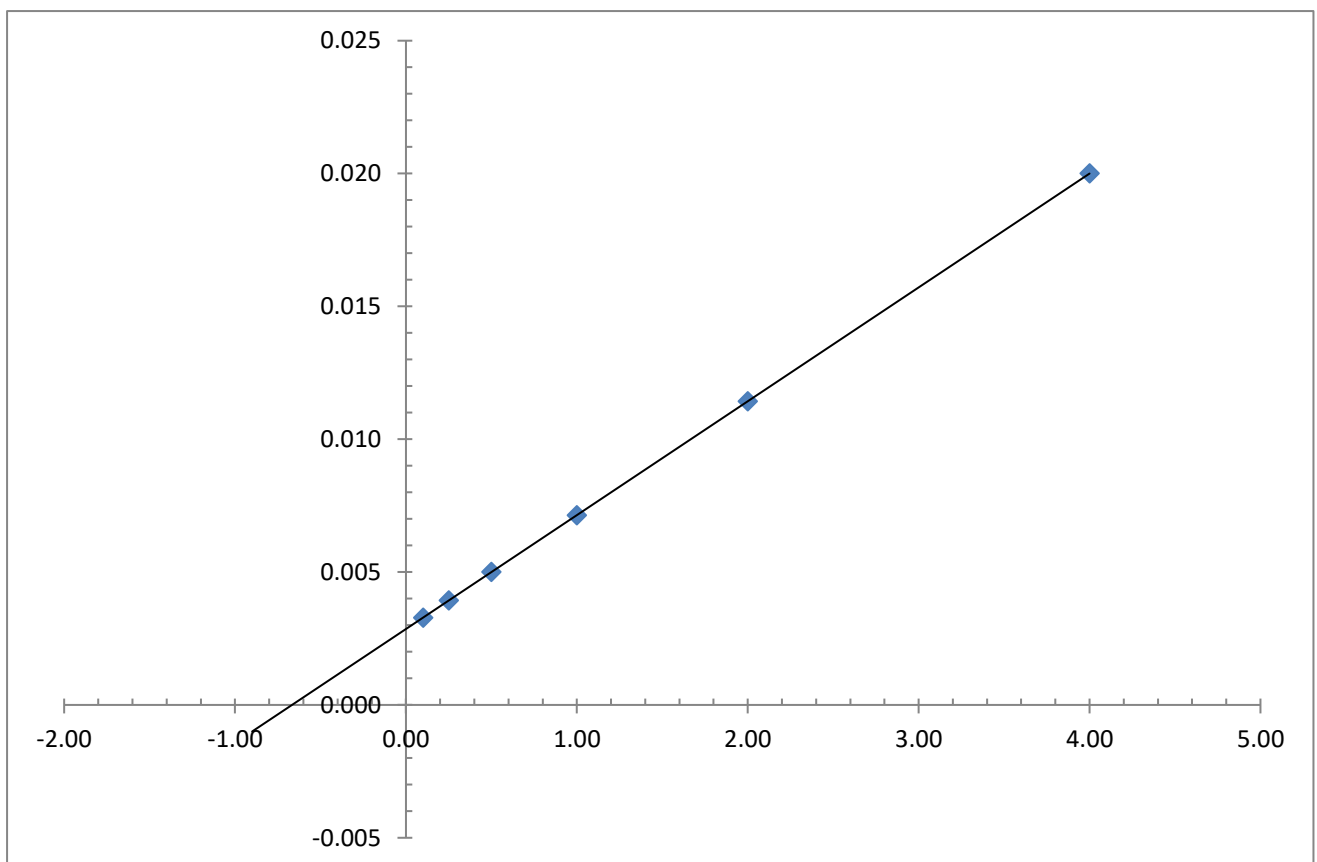
Disegna la curva di Michaelis Menten e la retta di Lineweaver Burk
Trova il valore di K_M e $V_{\max}$.

V_0	S	$1/S$	$1/v_0$
50	0.25	4.00	0.0200
88	0.5	2.00	0.0114
140	1	1.00	0.0071
200	2	0.50	0.0050
255	4	0.25	0.0039
304	10	0.10	0.0033

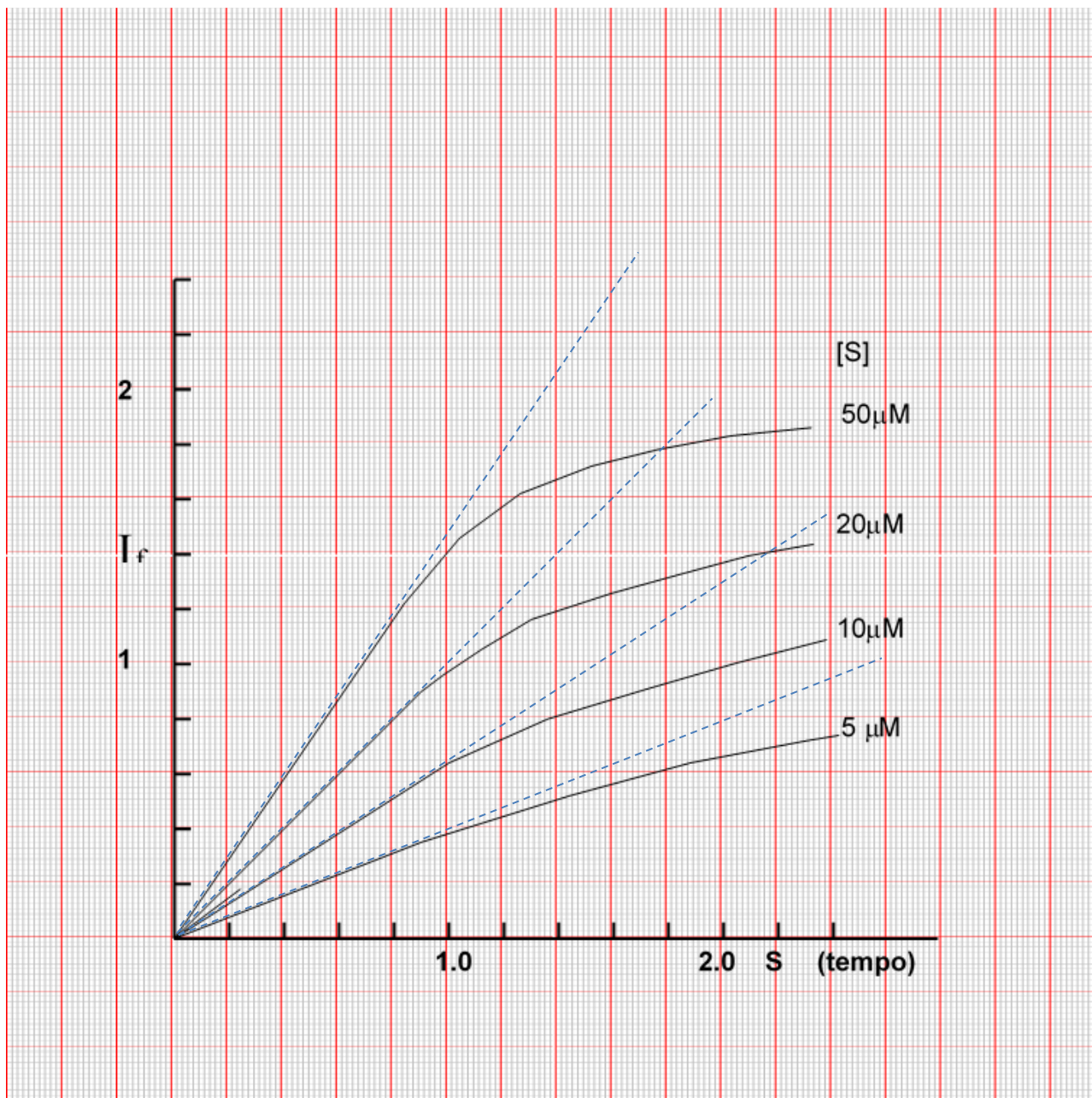
$$V = V_{\max}S/(K_M + S)$$

$$V_{\max} = 350$$

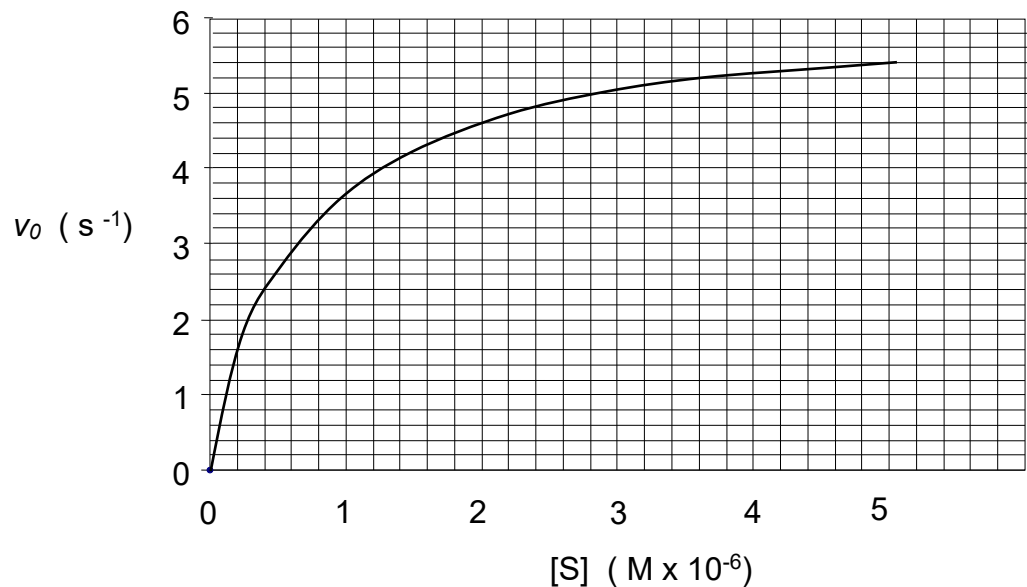
$$K_M = 1.5$$



- 2) Il grafico allegato mostra le curve di idrolisi enzimatica per un substrato fluorogenico, alle concentrazioni $[S]$ indicate.
- a) dalle curve, derivate le velocità iniziali (V_0) a ciascuna concentrazione di substrato disegnatte la curva di MM e la retta di LB
- b) determinate il V_{MAX} ed il K_M .



- 3) Dal seguente diagramma di Michaelis-Menten derivate il diagramma di Lineweaver-Burk, e da questo calcolate la velocità massima di reazione ($V_{\max}$) ed il K_M .



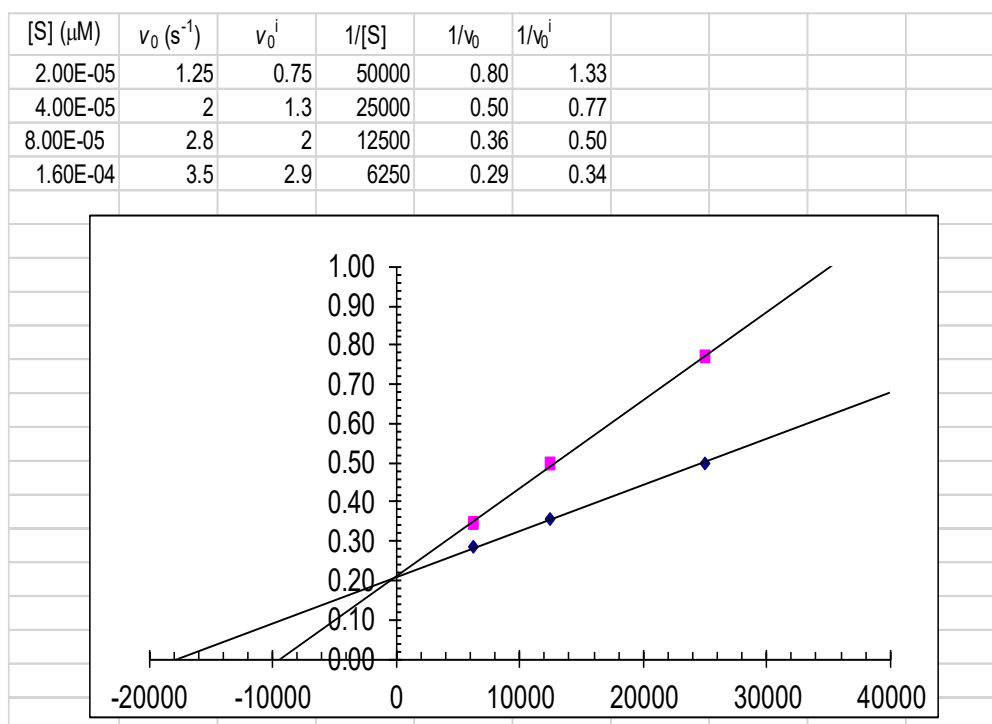
- 4) Un enzima catalizza una reazione con $V_{\max} = 500 \text{ M s}^{-1}$ e $K_M = 5 \text{ }\mu\text{M}$.
- Trova la v_0 a $10 \text{ }\mu\text{M}$ di substrato
 - Un inibitore competitivo aumenta K_M di 2.5 volte, quale sarà la v_0 a $10 \text{ }\mu\text{M}$ di substrato?
 - L'inibitore è a una concentrazione minore o maggiore del IC_{50} ?
- 5) Una preparazione di enzima ha una attività di 8.5 IU . La titolazione dell'enzima con un inibitore competitivo forte ($K_i = 10 \text{ nM}$) rivela un $IC_{50} = 50$ in presenza di $1 \text{ }\mu\text{M}$ substrato per il quale l'enzima ha un $K_M = 0.5 \text{ }\mu\text{M}$. Calcola la concentrazione dell'enzima.

IC50	=	100	nM	[S] /KM	=	2
Ki	=	10	nM			
[S]	=	1000	μM			
KM	=	500	μM			
IC50	=	1/2 [E] + Ki (1+[S] /KM)				
E	=	2 (IC50-Ki (1+[S] /KM))				
	=	140	nM			

- 6) A diverse concentrazioni di substrato [S], un enzima catalizza una reazione enzimatica con le seguenti velocità V_0 , nell'assenza e presenza di un inibitore:

[S]	senza inibitore	con inibitore
	V_0	V_0
20 μM	2,5 s^{-1}	1,5 s^{-1}
40	4	2,6
80	5,6	4,1
160	7,4	5,8

- di che tipo di inibitore si tratta?
- quali sono le velocità massime (V_{MAX}) ed i K_M in presenza ed assenza dell'inibitore?
- se la concentrazione di inibitore è di 10 μM , è superiore o inferiore all' IC_{50} ?

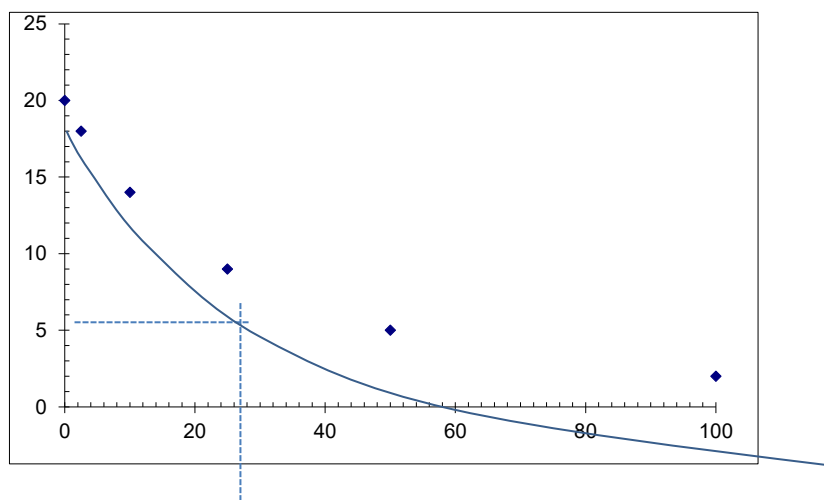


- 7) In un saggio enzimatico in presenza di diverse concentrazioni di un potente inibitore competitivo con $K_i = 1 \text{ nM}$, si ottengono le seguenti velocità di reazione per un substrato con concentrazione 100 nM :

velocità iniziale (V_0)(nM/s)	[I] (nM)
20	0
18	2.5
14	10
9	25
5	50
2	100

Sapendo che il $K_m = 130 \text{ nM}$, determina l' IC_{50} e quindi, usando la formula che associa K_i all' IC_{50} , ottieni la concentrazione dell'enzima.

0	20
2.5	18
10	14
25	9
50	5
100	2



IC_{50}	=	22 nM	$[S]/K_M$	=	0.769231
K_i	=	1 nM			
$[S]$	=	100 nM			
K_M	=	130 nM			
IC_{50}	=	$1/2 [E] + K_i (1 + [S]/K_M)$			
E	=	$2 (IC_{50} - K_i (1 + [S]/K_M))$			
	=	40.5 nM			

- 8) Un enzima che segue la cinetica Michaelis-Menten, e che ha una K_M di $0.4 \mu\text{M}$ ed una velocità massima (V_{max}) di $42 \mu\text{M/s}$, catalizza una reazione con velocità iniziale (v_0) di $14 \mu\text{M/s}$ in presenza di $0.2 \mu\text{M}$ substrato $[S]$.

Con questi dati, tracciate il grafico di Lineweaver-Burk e quindi stimate la velocità iniziale in presenza di $1 \mu\text{M}$ e $5 \mu\text{M}$ di substrato.

$K_M =$	$0.4 \mu\text{M}$	$1/[S]$	5	0.071429	$1/v_0$
$V_{\text{max}} =$	$42 \mu\text{M/s}$	$1/v_{\text{max}}$	0	0.02381	
$v_0 =$	$14 \mu\text{M/s}$	$1/K_M$	-2.5	0	
$[S] =$	$0.2 \mu\text{M}$				
	$1 \mu\text{M}$	$1/v_0 =$	0.034	$v_0 =$	29.4
	$2 \mu\text{M}$	$1/v_0 =$	0.026	$v_0 =$	38.5

