



*Analizată și aprobată la ședința catedrei
din 24.08.18, proces verbal nr. 1
Șeful catedrei de biochimie și biochimie clinică,
conf. universitar, dr. hab. în șt. med.
Olga Tagadiuc*

Indicația metodică nr. 7
Tema: Structura și funcțiile ADN.
Biosinteza ADN – replicarea. Reparația ADN și mutațiile

Experiența 1. Determinarea cantitativă a ADN

Principiul metodei: Dezoxiriboza din componența ADN interacționează cu reactivul difenilaminic formând un compus de culoare albastră. Intensitatea culorii – extincția (E) este direct proporțională cu cantitatea de ADN (C).

Modul de lucru: În eprubeta experimentală se introduce 1 ml de hidrolizat din drojdie și 2 ml de reactiv difenilaminic. În eprubeta martor se iau 1 ml de apă distilată și 2 ml de reactiv difenilaminic. Probele se introduc pe 10 min într-o baie de apă la 100°C. După răcire se colorimetrează soluția experimentală la FEC față de soluția martor (filtrul de lumină roșie, λ – 680 nm, cuvele de 5 mm grosime). Cantitatea (concentrația C) de ADN se determină după curba etalon.

Rezultat: E: _____ C: _____

Concluzii: _____

Nivel inițial de cunoștințe

1. Tipurile de acizi nucleici, funcțiile și repartizarea lor în celulă.
2. Constituenții acizilor nucleici: bazele azotate, pentozele, acidul fosforic.
3. Nucleotidele: structura, rolul. Lanțurile polinucleotidice. Legătura fosfodiestică.
4. Dogma centrală a biologiei (geneticii) moleculare.
5. Structura genelor la procariote și eucariote.

Întrebări pentru autopregătire

1. Acidul DezoxiriboNucleic (ADN): structura și funcțiile. Dublul helix și conformațiile lui de tip B, A, Z.
2. Nivelurile de compactizare a moleculei de ADN la procariote (nucleoidul) și eucariote (nucleozomii, cromatina și cromozomii).
3. Proprietățile fizico-chimice ale ADN. Denaturarea și renaturarea. Hibridizarea.
4. Replicarea ADN la procariote – matricea, substraturile, enzimele și factorii proteici. Mecanismul biochimic și etapele biosintezei ADN. Inhibitorii replicării – mecanismul de acțiune și rolul biomedical (aciclovir, foscarnet, doxorubicina).
5. Particularitățile replicării la eucariote. Telomerele și telomeraza. Structura telomerazei. Rolul biomedical al telomerazei.
6. Mecanismele biochimice ale reparației ADN. Enzimele implicate.
7. Mecanismele biochimice ale genezei mutațiilor punctiforme. Rolul biomedical al mutațiilor. Patologii determinate de mutații (anemia falciformă, fenilcetonuria).



Probleme de situație

1. Care sunt asemănările și deosebirile dintre secvența dinucleotidică 5'-UA-3' și NAD⁺?
2. Scrieți structura chimică a secvenței polinucleotidice dT-dC-dG-dA. Căruia acid nucleic aparține secvența dată? Care este sarcina electrică a acidului nucleic dat la pH fiziologic? Care este rolul sarcinii electrice date în formarea nucleozomului?
3. Care sunt mecanismele ce asigură fidelitatea replicării moleculei de ADN? Care este importanța biologică și medicală a asigurării fidelității replicării ADN?
4. În procesul de replicare, o catenă a moleculei de ADN este sintetizată cu întârziere din cauză că orientarea catenei date nu coincide cu direcția mișcării furcii replicative. ADN polimeraza sintetizează ambele catene doar în direcția 5'→3', pe când, în cazul catenei întârziată care are orientare opusă mișcării furcii direcția sintezei ar trebui să fie 3'→5'. Explicați și ilustrați cum are loc soluționarea acestui impediment?
5. Care este mecanismul molecular al dezvoltării fenilketonuriei și manifestările biochimice?

Teste pentru autoevaluare

1. Componentele structurale ale DNA-ului sunt:

- | | | |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| a) dihidrouracilul | c) acidul fosforic | e) ribozilrimina. |
| b) dezoxiriboza | d) timina | |

2. În ADN există următoarele tipuri de legături chimice:

- | | | |
|--------------------------|------------------|-----------------|
| a) ionice | c) N-glicozidice | e) de hidrogen. |
| b) 3',5'-fosfodiesterice | d) peptidice | |

3. Structura ADN-ului:

- a) este un lanț poliribonucleotidic
- b) conține AMP, CMP, UMP, GMP
- c) la capatul 5' se află resturi de fosfat
- d) monomerii se leagă prin legături 3',5'-fosfodiesterice
- e) monomerii se leagă prin legături N-glicozidice

4. Hidroliza acidă completă a ADN sunt corecte afirmațiile:

- | | |
|--|---------------------------|
| a) sunt hidrolizate legăturile fosfodiesterice | d) generează riboză |
| b) generează ribonucleotide | e) generează dezoxiriboză |
| c) sunt hidrolizate legăturile de hidrogen | |

5. Referitor la DNA sunt corecte afirmațiile:

- a) forma B conține 10 perechi de dezoxiribonucleotide la o spirală
- b) forma A conține 11 perechi de dezoxiribonucleotide la o spirală
- c) forma Z conține 12 resturi și e îndreptată spre dreapta
- d) în toate DNA raportul G+C/A+T=1
- e) catenele paralele sunt complementare

6. Referitor la proprietățile DNA-ului:

- a) dublul helix e o structură cu un grad mare de cooperativitate
- b) în soluții acide și bazice la T⁰C înalte DNA e supus denaturării
- c) T⁰C de topire nu depinde de componența nucleotidică
- d) T⁰C de topire este mai mare când predomină perechile A-T
- e) T⁰C de topire este mai mare când predomină perechile G-C



7. Nucleozomii reprezintă:

- a) unitatea structurală repetabilă a cromatinei
- b) o formă de supraorganizare a DNA
- c) DNA asociat cu proteinele bazice - histone
- d) legătura DNA-proteine este hidrofobă
- e) legătura DNA-proteine este covalentă

8. Referitor la replicare sunt corecte afirmațiile:

- a) la eucariote sediul este nucleul
- b) direcția creșterii catenei este $3' \rightarrow 5'$
- c) replicarea merge numai într-o singură direcție
- d) replicarea decurge în ambele direcții cu aceeași viteză
- e) angajează simultan întregul cromozom

9. Complexul DNA-replicaza cuprinde:

- a) RNA-polimerazele I, II, III
- b) decarboxilaza
- c) topoizomerazele
- d) DNA-polimerazele
- e) DNA-ligazele

10. Fragmentele Okazaki:

- a) necesită praimer pentru sinteză
- b) sunt reunite de DNA-ligaze
- c) se formează de RNA-polimeraze II
- d) iau naștere la acțiunea revers-transcriptazelor
- e) reunirea fragmentelor necesită consum de ATP

11. DNA-polimeraza (III):

- a) prezintă un complex multienzimatic
- b) sinteza catenei e procesivă
- c) posedă câteva situsuri - pentru DNA, dRTP și catalitic
- d) sintetizează catena în direcția $3' \rightarrow 5'$
- e) polimerizarea e asigurată de hidroliza ATP

12. DNA-polimeraza (I):

- a) îndepărtează primerii prin activitatea sa $5' \rightarrow 3'$ exonucleazică
- b) adaugă dezoxiribonucleotide prin activitatea sa polimerazică
- c) posedă acțiune de sudare cu consum de ATP
- d) nu posedă funcție de autocontrol
- e) catalizează o copiere a ADN identică cu cea matriceală

Indicația metodică nr. 8

Tema: Structura și funcțiile ARN. Mecanismele biochimice ce stau la baza expresiei genelor – transcripția

Experiența 1. Determinarea cantitativă a ARN

Principiul: Riboza din componența ARN interacționând cu reactivul orcinic se colorează în verde. Intensitatea colorației este direct proporțională cu concentrația ribozei în soluția cercetată și se determină fotocolorimetric.

Modul de lucru: În 2 eprubete se introduc câte 1 ml de reactiv orcinic. Ulterior, în prima eprubetă se adaugă 1 ml de hidrolizat de drojdie (soluția experimentală), iar în a doua – 1 ml de apă distilată (soluția martor). Soluțiile sunt încălzite 20 min pe o baie de apă la 100°C . După răcire se determină extincția soluției experimentale la FEC față de soluția martor, folosindu-se cuvele de 5 mm și filtrul de lumină roșie. Cantitatea de ARN se determină după curba etalon.



Rezultat: E: _____ C: _____

Concluzii: _____

Întrebări pentru autopregătire

1. Structura primară, secundară și terțiară a acizilor ribonucleici (ARNt, ARNm, ARNr). Complexele ribonucleoproteice.
2. Particularitățile structurii genelor la procariote. Genele structurale și reglatoare.
3. Transcripția la procariote: matrița, substraturile, enzimele, mecanismul biochimic. Inhibitorii transcripției (rifampicina, α -amanitina).
4. Particularitățile transcripției la eucariote. Modificările post-transcripție ale ARNm.
5. Mecanisme biochimice care asigură reglarea expresiei genelor la procariote și eucariote.
6. Transcripția inversă. Mecanismul biochimic și rolul biomedical.

Probleme de situație

1. Scrieți structura chimică a unei secvențe poliribonucleotidice. Indicați legăturile chimice. Poate fi posibil ca într-un lanț monocatenar de ARN să apară legături de hidrogen? Ilustrați cum ar putea avea loc formarea acestor legături și în ce caz.
2. Numiți asemănările și deosebirile dintre transcripție și replicare. Indicați în tabelul de mai jos prezența sau lipsa anumitor componente sau mecanisme necesare desfășurării acestor două procese:

	Transcripție	Replicare
Matrița		
Substraturile		
Enzimele		
Primeri		
Direcția sintezei		
Etapele		
Fidelitatea		
Erori		
Rol biologic		

3. Căror organisme le este specifică transcripția inversă? Care ar fi explicația biochimică a faptului că aceste organisme folosesc doar transcripția inversă?



4. Cum se explică faptul că mecanismele biochimice ce stau la baza reglării expresiei genelor la procariote și eucariote sunt diferite?
5. În secția de terapie intensivă a fost internat un pacient cu grețuri, vomă (10-12 ori timp de 24 ore), diaree (6-8 episoade în 24 ore), crampe și dureri abdominale. Investigațiile biochimice au stabilit creșterea activității enzimelor hepatice (AlAT și AsAT). Din anamneză s-a stabilit că bolnavul a consumat ciuperci culese din pădure. Investigația a stabilit că printre ele au fost și amanitele (mai numite și pălăria șarpelui sau muscărița). Care este mecanismul toxicității acestor ciuperci?

Teste pentru autoevaluare

1. Afirmațiile corecte referitoare la ARN:

- a) molecula este preponderent bicatenară
- b) compoziția nucleotidică se supune legii complementarității
- c) cantitatea de RNA în celulă este constantă
- d) este un poliribonucleotid monocatenar
- e) nucleotidele constitutive sunt AMP, GMP, TMP, CMP

2. Referitor la RNAm sunt corecte afirmațiile:

- a) prezintă molecule foarte eterogene
- b) fiecărei gene îi corespunde molecula sa de RNAm
- c) se sintetizează și degradează foarte rapid
- d) conține baze minore
- e) e asociat permanent cu ribozomii

3. Afirmațiile corecte privind RNAt sunt:

- a) la capătul 5' conține secvența CCA
- b) conține resturi de baze metilate
- c) la capătul 3'-OH se fixează aminoacidul activat
- d) sunt constituite din 75-90 resturi de aminoacizi
- e) la capătul 3' se află porțiunea anticodon

4. Afirmațiile corecte referitoare la RNAr sunt:

- a) sunt macromolecule omogene după formă și mărime
- b) sunt macromolecule flexibile și deformabile
- c) se găsește liber în celulă
- d) sunt componente structurale a ribozomilor
- e) prezintă numai zone dublu catenare

5. Transcrierea - afirmațiile corecte:

- a) angajează simultan întregul cromozom
- b) vizează numai anumite porțiuni din DNA
- c) informația se citește de pe o singură catenă
- d) necesită prezența RNA polimerazei
- e) informația se citește de pe ambele catene simultan

6. Biosinteza RNA - afirmațiile corecte:

- a) ca substrat servesc ribonucleozidtrifosfați
- b) este un proces procesiv
- c) forța motrică a transcrierii e hidroliza pirofosfatului



- d) mecanismul elongației diferă de cel al replicării
e) RNA-transcris conține cantități echimoleculare de A și T

7. RNA polimeraza la procariote:

- a) prezintă o holoenzimă
b) posedă proprietăți nucleazice
c) pentru sinteză necesită praimer
d) posedă capacitate de autocontrol
e) cu sigma subunitatea recunoaște promotorul

8. Afirmatiile corecte referitoare la RNAP la procariote sunt:

- a) prezintă un pentamer compus din $\sigma\alpha_2\beta\beta'$
b) inițierea sintezei necesită prezența holoenzimei
c) posedă centre catalitice (2), de fixate a DNA și a substraturilor
d) tetramerul $\alpha_2\beta\beta'$ al cor-enzimei determină inițierea procesului
e) coenzima determină elongarea transcrierii

9. RNAPolimeraza (RNAP) eucariotelor - afirmații corecte:

- a) RNAPI sintetizează RNA ribozomal (28S și 18S)
b) RNAPII sintetizează RNAm
c) RNAPIII sintetizează RNAt, RNAr 5S și molecule mai mici
d) copiază catena DNA-antisens în direcția $3' \rightarrow 5'$
e) copiază ambele catene de DNA în direcția $3' \rightarrow 5'$

10. Factorul proteic rho (ρ):

- a) se fixează rigid în secvența promotor
b) participă la inițierea corectă a transcrierii
c) utilizează pentru exercitarea funcției sale ATP
d) întrerupe acțiunea enzimei - RNAP
e) se mișcă în direcția $3' \rightarrow 5'$ împreună cu RNAP

11. Maturarea RNAm la eucariote presupune:

- a) atașarea fermentativă la capătul 3' a unei secvențe - poly A
b) excizia intronilor
c) excizia intronilor are loc prin intermediul unui RNA nuclear cu masa moleculară mică
d) excizia exonilor
e) atașarea fermentativă la capătul 3' al 7-metil-guanozinei

12. DNA-polimeraza-RNA-dependentă – afirmațiile corecte:

- a) este numită și reverstranscriptază
b) necesită o catenă templată de DNA
c) sintetizează DNA pe matriță de RNA
d) se utilizează în ingineria genetică pentru sinteza DNAC
e) permite includerea informației virale în genomul uman

13. Care din afirmații în reglarea expresiei genetice sunt corecte?

- a) lactoza scade afinitatea represorului pentru operator
b) metabolizarea lactozei este reglată numai de complexul CAP - AMPc
c) metabolizarea lactozei este reglată numai de complexul represor - inductor
d) corepresorul mărește afinitatea represorului față de operator;
e) metabolizarea lactozei este dublu reglată (CAP - AMPc, represor - inductor).



Indicația metodică nr. 9 Tema: Bazele biochimice ale translației

Experiența 1. Determinarea proteinelor totale din serul sangvin (metoda biuretică)

Principiul metodei: Proteinele interacționează în mediul alcalin cu sulfatul de cupru cu formarea unor compuși de culoare violetă. Intensitatea colorației (extincția E) este direct proporțională cu concentrația (C) proteinelor în ser.

Mod de lucru: La 0,1 ml ser sanguin adăugăm 4,9 ml de reactiv biuret, evitându-se agitarea intensă și formarea de emulsii. După 30 de minute, cel târziu peste o oră, se determină extincția probei la FEC, folosindu-se cuva de 1 cm și lungimea de undă 540-560nm (filtru verde). Calculul se realizează după curba-etalon.

Valoarea diagnostică: În serul sangvin, cantitatea de proteine totale variază între 6,5 și 8,5 gr/100 ml sau 65-85 g/l. Proteinele din serul sangvin scad până la 4-5 g/l (hipoproteinemie) în nefroze, inaniție, ciroze, la pierderea proteinei în urma hemoragiilor și formării exsudatelor. Hiperproteinemia se poate întâlni la pacienți cu mielom, diabet insipid, vomități frecvente, diaree, în cazurile de deshidratare a organismului.

Rezultat: E: _____ C: _____

Concluzii: _____

Întrebări pentru autopregătire

1. Compoziția și structura ribozomilor la pro- și eucariote.
2. Bazele biochimice ale codului genetic. Proprietățile lui.
3. Biosinteza proteinelor la procariote. Etapele:
 - a) activarea aminoacizilor;
 - b) translația – inițierea; elongarea; terminarea;
4. Particularitățile biosintezei proteinelor la eucariote – factorii translației și modificările post-translaționale ale proteinelor sintetizate. Folding-ul proteinelor sintetizate.
5. Reglarea biosintezei proteinelor la procariote și eucariote. Inhibitorii translației (tetraciclina, cloramfenicolul, eritromicina, streptomycină, toxina difterică). Rolul medical.

Probleme de situație

1. Care ar fi utilizarea biomedicală și mecanismele de acțiune a compușilor ce intervin în procesele de replicare, transcriere și translație la procariote și eucariote? Aduceți exemple de așa compuși care au fost aprobați în calitate de medicamente.
2. Completați tabelul de mai jos cu componentele necesare biosintezei proteinelor la **pro-** și **eucariote**.

	Activarea aminoacizilor		Inițierea translației		Elongarea		Terminarea	
	Pro	Eu	Pro	Eu	Pro	Eu	Pro	Eu
Enzimele								



**CATEDRA BIOCHIMIE ȘI BIOCHIMIE CLINICĂ
INDICAȚII METODICE
FACULTATEA FARMACIE, ANUL III**

Pag. 8 / 10

Factorii proteici								
Ionii								
Energie (Sursă și cantitate)								

Teste pentru autoevaluare

1. Referitor la aminoacil-tRNA-sintetaze sunt corecte afirmațiile:

- a) recunosc atât aminoacidul, cât și RNAt corespunzător
- b) posedă capacitate de autocontrol
- c) activează pe suprafața ribozomilor
- d) nu necesită ATP
- e) leagă aminoacidul de gr. OH din poziția 2' sau 3' al cap CCA din RNAt.

2. În legătură cu activarea aminoacizilor:

- a) are loc în citozolul celulei
- b) pentru toți AA există un singur tip de RNAt
- c) la activarea unui aminoacid se consumă energia a 2 leg. macroergice
- d) complexul AA - RNAt se formează la nivelul ribozomilor
- e) reprezintă fixarea aminoacidului de porțiunile anticodon

3. Formarea complexului AA-tRNA:

- a) legătura AA - RNAt este macroergică
- b) acțiunea pirofosfatazei cauzează ireversibilitatea reacției
- c) AA e unit cu RNAt printr-o legătură amidică
- d) activarea tuturor AA e catalizată de o singură AA - RNAt – sintetază
- e) aminoacizii sunt fixați pe bucla pseudouridinică

4. Aminoacil-ARNt-sintetază:

- a) catalizează translocarea
- b) posedă situs de fixare pentru RNAm
- c) posedă situs de fixare pentru RNAt
- d) este implicată în activarea AA
- e) necesită ATP

5. Inițierea sintezei proteinelor necesită:

- a) subunitatea mică și mare a ribozomului
- b) RNAm
- c) peptidiltransferaza
- d) factorii Tu, Ts, G
- e) GTP



6. Referitor la procesul de translație sunt corecte afirmațiile:

- a) sinteza lanțului polipeptidic începe cu cap. C - terminal
- b) aminoacid inițiator la procariote este metionina
- c) donor de formil pentru metionină este N10 formil - FH4
- d) formilMet – RNAt^{fmet} se plasează în situsul A
- e) includerea Met și a fMet necesită o singură RNAt

7. Elongarea în biosinteza proteinelor necesită:

- a) complexul de inițiere
- b) aminoacil - RNAt - sintetaza
- c) peptidiltransferaza
- d) factorii Tu, Ts, G
- e) Ca²⁺

8. Etapa de elongare în biosinteza proteinelor se caracterizează prin:

- a) formarea legăturilor peptidice
- b) legarea fmet-tRNA^{fmet} în locusul P
- c) consumul a 2 moli GTP
- d) formarea leg. peptidice între NH₂ a AA din situsul P și COOH din situsul A
- e) deplasarea cu un codon a ribozomului pe RNAm.

9. Modificările posttraducere includ:

- a) formarea hidroxiprolinei din prolină
- b) excizia intronilor
- c) acetilarea capătului N - terminal
- d) metilarea lizinei, argininei
- e) formarea punților disulfidice

10. Prelucrările posttranslaționale cuprind:

- a) excizia unor secvențe polipeptidice
- b) înlăturarea unor componente neproteice (hemul)
- c) substituția unor baze purinice cu cele pirimidinice
- d) formarea zimogenilor din enzime active
- e) carboxilarea glutamatului

11. Alegeți inhibitorii sintezei proteice la nivelul transcripției:

- a) Amanitina
- b) Rifamicina
- c) Eritromicina
- d) Rifampicina
- e) Tunicamicina

12. Alegeți inhibitorii sintezei proteice la nivelul translației:

- a) Tetracicilina
- b) Puromicina
- c) Streptomicina
- d) Cordicepina
- e) Neomicina



Indicația metodică nr. 10 Totalizare la capitolul „Acizii nucleici”

1. Acidul DeoxiriboNucleic (ADN): structură și funcții. Dublul helix și conformațiile lui de tip B, A, Z.
2. Nivelurile de compactizare a moleculei de ADN la procariote (nucleoidul) și eucariote (nucleozomii, cromatina și cromozomii).
3. Proprietățile fizico-chimice ale ADN. Denaturarea și renaturarea. Hibridizarea.
4. Replicarea ADN la procariote (*E.coli*) – matrița, substraturile, enzimele și factori proteici. Mecanismul biochimic și etapele biosintezei ADN.
5. Particularitățile replicării la eucariote. Telomerele și telomeraza. Rolul și structura telomerazei.
6. Reparația ADN. Mecanismul. Geneza mutațiilor. Rolul biomedical.
7. Structura primară, secundară și terțiară a acizilor ribonucleici (tRNA, mRNA, rRNA).
8. Transcripția la procariote (*E.coli*): matrița, substraturile, enzimele, mecanismul. Inhibitorii transcripției.
9. Particularitățile transcripției la eucariote. Modificările post-transcripționale ale ARNm.
10. Ribozomii – compoziția chimică și structura la procariote și eucariote.
11. Biosinteza proteinelor la procariote. Etapele.
12. Particularitățile biosintezei proteinelor la eucariote. Modificările post-translaționale ale proteinelor. Folding-ul proteinelor.
13. Reglarea biosintezei proteinelor la procariote și eucariote.
14. Inhibitorii medicinali al transcripției și translației la procariote și eucariote. Mecanismele de acțiune și rolul medical.