



*Analizată și aprobată la ședința catedrei
din 28.01.22, proces verbal nr. 1
Șeful catedrei de biochimie și biochimie clinică,
conf. universitar, dr. în șt. med.
Silvia Stratulat _____*

Indicația metodică nr. 6

Tema: Structura și funcțiile ADN.

Biosinteza ADN – replicarea. Reparația ADN și mutațiile. Transcripția.

Experiența 1. Determinarea cantitativă a ADN

Principiul metodei: Dezoxiroboza 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: _____

Experiența 2. 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: _____

Nivel inițial de cunoștințe

1. Tipurile de acizi nucleici, funcțiile și repartizarea lor în celulă.
2. Conținutul 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 – matrița, substraturile, enzimele și factorii proteici. Mecanismul biochimic și etapele biosintezei ADN. Inhibitorii replicării – mecanismul de acțiune și rolul biomedical (aciclovir, fosfocarnet, doxorubicina și alt.).
5. Particularitățile replicării la eucariote. Telomerele și telomeraza. Structura telomerazei. Rolul biomedical al telomerazei.
6. Mecanismele biochimice ale reparației ADN.
7. Mutațiile punctiforme. Rolul biomedical al mutațiilor. Patologii determinate de mutații (anemia falciformă, fenilcetonuria).
8. Structura primară, secundară și terțiară a acizilor ribonucleici (ARNt, ARNm, ARNr). Complexele ribonucleoproteice.
9. Transcripția la procariote: matrița, substraturile, enzimele, mecanismul biochimic. Inhibitorii transcripției (rifampicina, α -amanitina).
10. Particularitățile transcripției la eucariote. Modificările post-transcripție ale ARNm.
11. Mecanismele biochimice care asigură reglarea expresiei genelor la procariote și eucariote.
12. Transcripția inversă. Mecanismul biochimic și rolul biomedical.

Probleme de situație

1. Scrieți structura chimică a secvenței polinucleotidice dT-dC-dG-dA. Cărui 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?
2. Care sunt mecanismele ce asigură fidelitatea replicării moleculei de ADN? Care este importanța biologică și medicală a asigurării fidelității replicării ADN?
3. 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.
4. 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		

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. Componentele structurale ale DNA-ului sunt:

- a) dihidrouracilul c) acidul fosforic e) riboziltimina.
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 $T^{\circ}C$ înalte DNA e supus denaturării
c) $T^{\circ}C$ de topire nu depinde de componența nucleotidică
d) $T^{\circ}C$ de topire este mai mare când predomină perechile A-T
e) $T^{\circ}C$ 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 copie a ADN identică cu cea matriceală

13. 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

14. 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

15. 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

16. 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

17. 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

18. 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

19. 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. 7

Tema: Bazele biochimice ale translației

Experiența 1. Determinarea proteinelor totale din serul sanguin (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.



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 – RNAtfmet 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



*Analizată și aprobată la ședința catedrei
Din 24.08.21, proces verbal nr. 1
Șeful catedrei de biochimie și biochimie clinică,
conf. universitar, dr. în șt. med.
Silvia Stratulat _____*

Indicația metodică nr. 8

**Tema: Noțiuni generale despre metabolism.
Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic. Ciclul Krebs**

Experiența 1. Determinarea piruvatului în urină

Principiul metodei: Piruvatul reacționând cu 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) în mediul alcalin formează 2,4-dinitrofenilhidrazona acidului piruvic de culoare galben-oranj. Intensitatea colorației este direct proporțională cu cantitatea de piruvat și se determină fotocolorimetric.

Modul de lucru:

Reactivi	Eprubeta:	
	Experimentală (1)	Control (2)
Urină	1 mL	-
H ₂ O dist.	-	1 mL
KOH 2,5% (sol. alcoolică)	1 mL	1 mL
Se agită intens timp de 1 min		
0,1% sol. 2,4-DNPH	0,5 mL	0,5 mL
Se agită bine și se lasă 15 min la temperatura camerei		
Determinăm extincția probei de cercetat la FEC contra proba de control (cuva - 5 mm, filtrul albastru - 450-465 nm).		
Concentrația piruvatului în urină (C) se determină după curba de calibrare.		
Cantitatea piruvatului excretată timp de 24 ore se calculează după formula: $X (\mu\text{M}/24 \text{ ore}) = C \cdot 1500$, unde: C - concentrația piruvatului în urină (determinată după curba de calibrare, $\mu\text{M}/\text{mL}$), 1500 - diureza nictemerală (mL).		

Valori normale: 10-25mg/24ore sau 114-284 $\mu\text{M}/24\text{ore}$.

Valoarea diagnostică: Conținutul acidului piruvic în sânge și în urină crește în insuficiența tiaminei, în diabetul zaharat, în hiperfuncția sistemului hipofizaro-adrenal, la administrarea unor medicamente (adrenalina, stricnina, camforul).

Rezultat: E: _____ C: _____ $\mu\text{M}/\text{mL}$

X (cantitatea piruvatului excretată timp de 24 ore) = _____ $\mu\text{M}/24\text{ore}$

Concluzii: _____



Întrebări pentru autopregătire

1. Noțiuni de metabolism. Anabolismul și catabolismul. Căile metabolice. Etapa amfibolică a metabolismului, rolul ei.
2. Metodele de studiere a metabolismului.
3. Legile termodinamicii. Noțiuni de entalpie, entropie și energie liberă. Energia liberă standard, semnificația ei. Reacțiile endergonice și exergonice.
4. Compușii macroergici: rolul, principalii reprezentanți, particularitățile structurale. Compușii supermacroergici. Structura chimică și rolul ATP-ului. Ciclul ATP-ului. Variantele de hidroliză a ATP. Mecanismele de sinteză a ATP.
5. Reglarea energetică a metabolismului celular. Indicii stării energetice a celulei.
6. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului: complexul polienzimatic, coenzimele, reacția sumară, etapele, reglarea procesului, legătura cu ciclul Krebs și cu lanțul respirator. Rolul biomedical.
7. Ciclul acizilor tricarboxilici (Krebs): funcțiile, reacțiile parțiale, enzimele, reacția sumară, legătura cu lanțul respirator, randamentul energetic, reglarea procesului.
8. Reacțiile anaplerotice. Semnificația lor.

Probleme de situație

1. Ce cantitate de energie se eliberează la descompunerea unui mol de ATP în condiții standard? Care este "durata vieții" moleculei de ATP în celulele organismelor superioare?
2. Cu toate că în organismul omului matur în fiecare zi se formează o cantitate mare de ATP, structura, compoziția și masa corpului nu se modifică evident în acest timp. Cum se poate explica aceasta?
3. Enumerați componentele complexului piruvatdehidrogenaza, scrieți formulele vitaminelor care intră în componența acestui complex.
4. Numiți toate enzimele ciclului Krebs și determinați la ce clasă de enzime se referă ele (completați tabelul):

Enzimele ciclului Krebs	La ce clasă se referă enzimele date?

5. Explicați de ce ciclul Krebs este un proces aerob.
6. Care enzime ale ciclului Krebs sunt enzime reglatoare? Care sunt activatorii și inhibitorii acestor enzime? Completați tabelul.

Enzimele reglatoare ale ciclului Krebs	Activatorii	Inhibitorii



7. Oxaloacetatul se formează în ultima reacție a ciclului Krebs. E posibilă oare sinteza oxaloacetatului din acil-CoA sub acțiunea doar a enzimelor și coenzimelor ciclului Krebs fără irosirea produselor intermediare ale ciclului? Dați răspuns detaliat.
8. Scrieți reacția de fosforilare la nivel de substrat din ciclul Krebs.

Teste pentru autoevaluare

1. Referitor la căile catabolice și anabolice sunt corecte afirmațiile:

- a) coincid ca direcție
- b) posedă reacții și enzime comune
- c) sunt identice
- d) ca regulă, sunt localizate în diferite compartimente celulare
- e) ciclul Krebs este faza amfibolică a metabolismului

2. Selectați afirmația corectă referitoare la bioenergetică:

- a) organismele vii sunt sisteme termodinamice închise
- b) energia liberă (ΔG) este energia care nu poate fi utilizată pentru efectuarea lucrului
- c) entropia (ΔS) este gradul de dezordine a unui sistem termodinamic
- d) energia legată ($T\Delta S$) este energia care poate fi utilizată pentru efectuarea lucrului
- e) $\Delta G > 0$ indică că reacția chimică este exergonică

3. Referitor la reglarea metabolismului celular este corectă afirmația:

- a) căile catabolice și anabolice au reacții comune
- b) viteza proceselor metabolice este reglată de enzimele ce catalizează reacții comune ale anabolismului și catabolismului
- c) procesele metabolice se reglează la nivelul reacțiilor reversibile
- d) ca regulă, inhibitorii proceselor catabolice sunt activatori ai proceselor anabolice
- e) hormonii nu participă la reglarea proceselor metabolice

4. Ce factori determină formarea energiei în reacția de hidroliză a ATP-lui?

- a) repulsia electrostatică
- b) gradul mic de stabilitate a ATP-lui
- c) prezența ionilor de Mg^{2+}
- d) prezența apei
- e) scindarea legăturilor glicozidice din ATP

5. Selectați afirmațiile corecte referitoare la rolul complexului enzimatic piruvat dehidrogenaza:

- a) decarboxilarea oxidativă a CH_3COOH
- b) decarboxilarea oxidativă a CH_3COCH_2COOH
- c) dehidrogenarea și decarboxilarea $CH_3COCOOH$
- d) formarea NADPH pentru sintezele reductive
- e) formarea NADH pentru lanțul respirator

6. Referitor la reglarea activității complexului enzimatic piruvat dehidrogenaza (PDH) sunt corecte afirmațiile:

- a) GTP, ATP sunt inhibitori ai complexului PDH
- b) sarcina energetică mică activează enzimele complexului PDH
- c) toate enzimele complexului PDH se reglează doar alosteric
- d) toate enzimele complexului PDH se supun doar reglării prin sarcină energetică
- e) toate enzimele complexului PDH se reglează prin fosforilare-defosforilare.



7. Selectați afirmațiile corecte referitoare la ciclul Krebs:

- a) este etapa finală comună a oxidării compușilor organici
- b) furnizează substanțe intermediare pentru anabolism
- c) în ciclul Krebs oxaloacetatul se oxidează până la 2 molecule de CO₂
- d) funcționează în condiții anaerobe
- e) în reacțiile ciclului Krebs participă nemijlocit O₂

8. Referitor la reacția: Succinil-CoA + GDP + H₃PO₄ ↔ succinat + GTP + HS-CoA sunt corecte afirmațiile:

- a) este o reacție reglatoare a ciclului Krebs
- b) este o reacție de fosforilare la nivel de substrat
- c) reprezintă o reacție de fosforilare oxidativă
- d) este catalizată de enzima succinil-CoA sintetaza
- e) enzima ce catalizează această reacție este din clasa liazelor

9. Selectați afirmațiile corecte referitoare la reglarea ciclului Krebs:

- a) viteza ciclului este diminuată de concentrația înaltă a ADP-lui
- b) complexul alfa-cetoglutarat dehidrogenaza este inhibat de succinil-CoA
- c) sarcina energetică mică inhibă activitatea ciclului
- d) ADP-ul inhibă izocitrat dehidrogenaza
- e) NADH inhibă izocitrat dehidrogenaza și complexul alfa-cetoglutarat dehidrogenaza

10. Selectați reacțiile anaplerotice:

- a) acetyl-CoA + oxaloacetat + H₂O → citrat + HSCoA
- b) glutamat + H₂O + NAD⁺ ↔ alfa-cetoglutarat + NADH+H⁺ + NH₃
- c) succinil-CoA + glicina → delta-aminolevulinat + HS-CoA + CO₂
- d) fosfoenolpiruvat + CO₂ + GDP → oxaloacetat + GTP
- e) piruvat + CO₂ + ATP → oxaloacetat + ADP + H₃PO₄

Indicația metodică nr. 9

Tema: Oxidarea biologică.

Lanțul respirator și fosforilarea oxidativă

Experiența 1: Reacția calitativă de determinare a activității catalazei

Principiul metodei: Catalaza din sânge este o oxidoreductază foarte activă care descompune apa oxigenată în apă și oxigen molecular: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

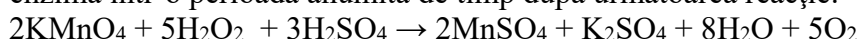
Modul de lucru: În două eprubete se iau câte 1 mL H₂O, se adaugă 2 picături de sânge și o probă se fierbe pentru inactivarea enzimei. După răcire în ambele eprubete se adaugă 5-10 picături de H₂O₂ 3% și conținutul eprubetelor se agită. În eprubeta de experiență se observă degajarea bulelor de oxigen.

Rezultat: _____

Concluzii: _____

Experiența 2: Determinarea cantitativă a activității catalazei

Principiul metodei: Activitatea catalazei se determină prin dozarea apei oxigenate descompusă de enzimă într-o perioadă anumită de timp după următoarea reacție:





Cantitatea apei oxigenate descompuse se apreciază după diferența cantității permanganatului de potasiu consumat la titrarea apei oxigenate până și după acțiunea catalazei.

Activitatea catalazei se exprimă prin numărul catalazic și indicele catalazic. Numărul catalazic (NC) este cantitatea de peroxid de hidrogen (în mg) descompus sub acțiunea 1 μL de sânge. Indicele catalazic este raportul dintre numărul catalazic și numărul eritrocitelor (în milioane) într-un μL de sânge.

Modul de lucru:

<i>Reactivi, mL</i>	<i>Balonul de titrare cu:</i>	
	<i>proba martor</i>	<i>proba de cercetat</i>
Sânge (1:1000)	1	1
Apă distilată	7	7
H ₂ O ₂ 1%	-	2
H ₂ SO ₄ 10%	5	-
Incubare 30 min la temperatura camerei		
H ₂ O ₂ 1%	2	-
H ₂ SO ₄ 10%	-	5
Titrare cu KMnO₄ până la roz slab stabil	A= _____ mL	B= _____ mL

Calcul: Numărul catalazic (NC) se calculează după formula:

$$NC = (A - B) \cdot 1,7,$$

unde: A – cantitatea soluției de KMnO₄ 0,1N consumat la titrarea probei martor (mL),
B - cantitatea soluției de KMnO₄ 0,1N consumat la titrarea probei de cercetat (mL).
1,7 – coeficientul care arată câte mg de H₂O₂ se conține într-un mL soluție de H₂O₂ 0,1N.

Valorile normale ale numărului catalazic sunt cuprinse între 10-15 unități la adulți și 7,5-9,9 unități la copii.

Importanța clinico-diagnostică. În cazul cancerului, anemiei, tuberculozei activitatea catalazei în sânge este redusă. Acatalazemia este o deficiență înăscută a catalazei din eritrocite și alte țesuturi, având ca simptom principal gangrena cavității bucale. Activitate înaltă a catalazei se observă în anemiile pernicioasă și macrocitară, de asemenea și la ingerarea alcoolului și cofeinei.

Rezultat: _____

Concluzii: _____

Întrebări pentru autopregătire

- Oxidarea biologică. Dehidrogenarea substraturilor – sursa energetică principală pentru sinteza ATP-ului. Reacțiile, enzimele și coenzimele dehidrogenării.
- Lanțul respirator – localizarea, semnificația biologică:
 - Structura și proprietățile oxido-reducătoare ale principalilor acceptori de protoni și electroni (NAD⁺, FAD, FMN, CoQ). Noțiuni despre structura citocromilor și a proteinelor Fe-S.
 - Potențialul de oxido-reducere al componentelor lanțului respirator.
 - Schema lanțului respirator. Complexele enzimatică. Inhibitorii lanțului respirator.



3. Fosforilarea oxidativă. Punctele de fosforilare. Reglarea intensității funcționării lanțului respirator. Coeficientul P/O.
4. Mecanismul cuplării oxidării cu fosforilarea (ipoteza Mitchell). ATP-sintaza. Inhibitorii ATP-sintazei. Rolul membranei mitocondriale interne în biosinteza ATP-ului. Transportul nucleotidelor adenilice și al fosfatului prin membrana internă mitocondrială.
5. Decuplarea proceselor de oxidare și fosforilare. Agenții decuplanți, mecanismul lor de acțiune. Exemple de decuplare fiziologică și patologică.
6. Oxidarea microzomală. Rolul citocromului P450 în reacțiile de oxido-reducere (dezintoxicarea xenobioticelor, sinteza hormonilor steroidici, acizilor biliari etc.).

Probleme de situație

1. Care vitamine și substanțe cu activitate vitaminică intră în componența lanțului respirator? Scrieți formulele lor.
2. Adăugarea rotenonei la mitocondriile care respiră pe glutamat conduce atât la încetarea sintezei ATP-ului, cât și a transportului de electroni. Cum se pot restabili aceste procese? (Amintim că rotenona blochează transportul de electroni în lanțul respirator pe sectorul NAD - ubiquinonă).
3. Adăugarea oligomicinei la mitocondriile care respiră pe succinat conduce la întreruperea transportului de electroni și a formării ATP-ului. Adăugarea ulterioară a dinitrofenolului sau a ionilor de Ca^{++} restabilește imediat transportul de electroni în lanțul respirator fără generare concomitentă de ATP. Ce proces inhibă oligomicina?
4. Adăugarea malonatului (inhibitorul competitiv al succinatdehidrogenazei) la mitocondriile care respiră pe succinat întrerupe transportul de electroni și sinteza ATP-ului. Cum se poate restabili:
a) doar transportul de electroni? b) transportul de electroni și sinteza ATP-lui?
5. În ce stare (redușă sau oxidată) se vor afla transportorii lanțului respirator la adăugarea în suspensia de mitocondrii a antimicinei A și a oxidului de carbon CO ?
6. În mitocondriile grăsimii brune la copiii nou-născuți și la animalele în stare de hibernare randamentul ATP-ului la un atom de oxigen absorbit constituie mai puțin de o moleculă:
a) ce funcție fiziologică poate fi determinată prin raportul P/O mic în grăsimea brună a nou-născuților?
b) indicați mecanisme posibile care ar putea determina un astfel de raport P/O caracteristic pentru mitocondriile grăsimii brune.

Teste pentru autoevaluare

1. Selectați afirmațiile corecte referitoare la lanțul respirator:

- a) este localizat în membrana externă mitocondrială
- b) este un proces reversibil
- c) este alcătuit din enzime și sisteme de oxido-reducere
- d) transferă H^+ și e^- de pe coenzimele reduse pe O_2
- e) produsul final al LR este H_2O_2

2. Referitor la potențialul de oxido-reducere (E_0) al sistemelor-redox din lanțul respirator sunt corecte afirmațiile:

- a) este o forță motrice ce determină capacitatea sistemului-redox de a adăuna și a ceda e^-
- b) cu cât valoarea E_0 este mai electronegativă, cu atât este mai înaltă capacitatea sistemului-redox de a adăuna e^-
- c) cu cât valoarea E_0 este mai electropozitivă, cu atât este mai înaltă capacitatea sistemului-redox de a ceda e^-
- d) torentul de e^- e orientat în direcția majorării energiei libere
- e) în lanțul respirator sistemele-redox sunt aranjate în ordinea creșterii E_0



3. Referitor la complexul I al lanțului respirator (NADH-CoQ reductaza) sunt corecte afirmațiile:

- a) îndeplinește funcția de colector de H^+ și e^- de la dehidrogenazele NAD^+ -dependente
- b) îndeplinește funcția de colector de H^+ și e^- de la dehidrogenazele FAD-dependente
- c) conține FMN
- d) conține proteine cu fier și sulf (FeS)
- e) conține FAD

4. Referitor la complexul II al lanțului respirator (succinat-CoQ reductaza) sunt corecte afirmațiile:

- a) transferă H^+ și e^- în lanțul respirator doar de pe succinat
- b) conține flavoproteine specializate pentru introducerea H^+ și e^- în lanțul respirator și de pe alte substraturi (acil-CoA, glicerol-3-fosfat)
- c) conține NAD^+
- d) conține citocromii a și a_3
- e) conține proteine cu fier și sulf (FeS)

5. Referitor la complexul IV al lanțului respirator (citocromoxidaza) sunt corecte afirmațiile:

- a) transferă $4e^-$ de la citocromii c la oxigenul molecular cu formarea a $2O^{2-}$
- b) O^{2-} interacționează cu protonii, formând apa
- c) conține citocromii b și c_1
- d) conține citocromii a și a_3
- e) conține ioni de cupru

6. Selectați afirmațiile adevărate referitor la citocromi:

- a) reprezintă hemoproteine
- b) funcționarea citocromilor implică transformarea: $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$
- c) participă la transferul doar a H^+
- d) transferă H^+ și e^- pe ubichinonă
- e) un citocrom poate transfera 2 e^-



8. Selectați afirmațiile corecte referitoare la ATP-sintaza:

- a) este enzimă implicată în fosforilarea la nivel de substrat
- b) este enzimă implicată în fosforilarea oxidativă
- c) este inhibată de oligomicină
- d) inhibarea ATP-sintazei micșorează atât sinteza ATP-ului, cât și transferul de electroni prin lanțul respirator
- e) inhibarea ATP-sintazei nu influențează transferul de electroni prin lanțul respirator

9. Referitor la țesutul adipos brun sunt adevărate afirmațiile:

- a) este țesut specializat în sinteza ATP-ului
- b) este țesut specializat în termogeneză
- c) este prezent la animalele în hibernare, la nou-născuți
- d) conține puține mitocondrii
mitocondriile din țesutul adipos brun conțin termogenina (proteine decuplante)

Indicația metodică nr. 10
Totalizare pe capitolele:
„Acizii nucleici” și „Bioenergetica”

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-tranlaționale ale proteinelor. Folding-ul proteinelor.
13. Reglarea biosintezei proteinelor la procariote și eucariote.
14. Inhibitorii medicinali al transcripției și tranlației la procariote și eucariote. Mecanismele de acțiune și rolul medical.
15. Noțiuni de metabolism. Anabolismul și catabolismul. Căile metabolice. Etapa amfibolică a metabolismului, rolul ei.
16. Metodele de studiere a metabolismului.
17. Legile termodinamicii. Noțiuni de entalpie, entropie și energie liberă. Energia liberă standard, semnificația ei. Reacțiile endergonice și exergonice.



18. Compușii macroergici: rolul, principalii reprezentanți, particularitățile structurale. Compușii supermacroergici. Structura chimică și rolul ATP-ului. Ciclul ATP-ului. Variantele de hidroliză a ATP. Mecanismele de sinteză a ATP.

Reglarea energetică a metabolismului celular. Indicii stării energetice a celulei.

19. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului: complexul polienzimatic, coenzimele, reacția sumară, etapele, reglarea procesului, legătura cu ciclul Krebs și cu lanțul respirator. Rolul biomedical.

20. Ciclul acizilor tricarboxilici (Krebs): funcțiile, reacțiile parțiale, enzimele, reacția sumară, legătura cu lanțul respirator, randamentul energetic, reglarea procesului.

21. Reacțiile anaplerotice. Semnificația lor.

22. Oxidarea biologică. Dehidrogenarea substraturilor – sursa energetică principală pentru sinteza ATP-ului. Reacțiile, enzimele și coenzimele dehidrogenării.

23. Lanțul respirator – localizarea, semnificația biologică:

a) Structura și proprietățile oxido-reducătoare ale principalilor acceptori de protoni și electroni (NAD⁺, FAD, FMN, CoQ). Noțiuni despre structura citocromilor și a proteinelor Fe-S.

b) Potențialul de oxido-reducere al componentelor lanțului respirator.

c) Schema lanțului respirator. Complexele enzimatic. Inhibitorii lanțului respirator.

24. Fosforilarea oxidativă. Punctele de fosforilare. Reglarea intensității funcționării lanțului respirator. Coeficientul P/O.

25. Mecanismul cuplării oxidării cu fosforilarea (ipoteza Mitchell). ATP-sintaza. Inhibitorii ATP-sintazei. Rolul membranei mitocondriale interne în biosinteza ATP-ului. Transportul nucleotidelor adenilice și al fosfatului prin membrana internă mitocondrială.

26. Decuplarea proceselor de oxidare și fosforilare. Agenții decuplanți, mecanismul lor de acțiune. Exemple de decuplare fiziologică și patologică.

27. Oxidarea microzomală. Rolul citocromului P450 în reacțiile de oxido-reducere (dezintoxicarea xenobioticelor, sinteza hormonilor steroidici, acizilor biliari etc.).