

## **Versuch 2 : Wirkung von Entkopplern auf die Atmungskette**

1961 formulierte der britische Biochemiker Peter Mitchell (Nobelpreis 1978) die „chemiosmotische Hypothese“, die besagt, dass die Bildung von ATP während der Atmungskette („chemi“) von einem Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran abhängt („osmosis“ vom griechischen „osmein“ = stoßen) . Man spricht daher auch von chemi-osmotischer Kopplung.

Als Entkoppler bezeichnet man Substanzen ,die einen „Kurzschluss“ in der Atmungskette verursachen, indem sie die ATP-Synthese vom Protonengradienten „entkoppeln“.

Beispiele für entkoppelnde Substanzen sind DNP (2,4 – Dinitrophenol) und Oligomycin !

In diesem Versuch soll nun festgestellt werden, wo und wie diese beiden Substanzen in die Atmungskette eingreifen und ob Mitchells Hypothese gestützt werden kann.

### **Aufgaben :**

1. Führen Sie die Läufe 1 und 2 durch!  
Beschreiben Sie die Ergebnisse aus den Läufen 1 und 2 anhand der Schreiberaufzeichnungen !
2. Stellen sie aufgrund ihrer Ergebnisse aus den Läufen 1 und 2 eine begründete Hypothese zu Lauf 3 auf :  
wie ändert sich der Sauerstoffverbrauch nach Zugabe der einzelnen Substanzen ?
3. Führen Sie Lauf 3 durch!  
Vergleichen Sie die Ergebnisse aus Lauf 3 mit ihrer Hypothese !
4. Schlagen Sie aufgrund dieser Ergebnisse und Ihrem Wissen über die Atmungskontrolle für die beiden Substanzen DNP und Oligomycin jeweils einen möglichen Mechanismus vor ! Wie und wo greifen die Substanzen in die Atmungskette ein ? Sprechen die Ergebnisse für Mitchells Hypothese ?

### **Versuchsdurchführung :**

#### **Lauf 1:**

1. Geben Sie in den Glaskolben Mitochondriensuspension, 20 µl 500 mM Pyruvatlösung und 20 µl 10 mM ADP - Lösung. Messen Sie den Sauerstoffverbrauch über 2 Minuten (bei 4 x Geschwindigkeit).
2. Geben Sie DNP (2 x Portion) hinzu und messen Sie den Sauerstoffverbrauch über 3 Minuten.
3. Geben Sie nun 20 µl 10 mM ADP - Lösung hinzu und messen Sie den Sauerstoffverbrauch erneut über 3 Minuten.

#### **Lauf 2 :**

Führen Sie die gleichen Reaktionsschritte wie in Lauf 1 durch, verwenden Sie aber Oligomycin an Stelle von DNP !

#### **Lauf 3 :**

1. Geben Sie in den Kolben Mitochondriensuspension, 20 µl 500 mM Pyruvatlösung und 20 µl 10 mM ADP - Lösung. Messen Sie den Sauerstoffverbrauch über 2 Minuten (bei 4 x Geschwindigkeit) !
2. Geben Sie Oligomycin hinzu und messen Sie den Sauerstoffverbrauch über 3 Minuten !
3. Geben Sie DNP (2 x Portion) hinzu und messen Sie den Sauerstoffverbrauch über 3 Minuten !

Ergebnis Lauf 1	Ergebnis Lauf 2

Hypothese Lauf 3	Ergebnis Lauf 3

Mögliche Mechanismen für DNP und Oligomycin :

--

Sprechen die Ergebnisse für Mitchells Hypothese ?

--