

UNIVERSITÄT ULM
Bachelorstudiengang Biochemie

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Molekulare Strukturbiologie

**Kryoelektronentomographische Analyse
makromolekularer Komplexe in Mitochondrien**

vorgelegt von:
Robin Stocklauser

Betreuer: Dr. Friedrich Förster
(Max-Planck-Institut für Biochemie)
Gutachter: Dr. Frank Rosenau
(Universität Ulm)

Bachelorarbeit 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Mitochondrien	5
1.1.1	Allgemein	5
1.1.2	ATP-Synthase	6
1.1.3	Morphologie	7
1.1.4	MINOS-Komplex	9
1.2	Ribosomen	10
1.2.1	Allgemein	10
1.2.2	Mitochondriale Ribosomen	11
1.3	Kryoelektronentomographie	11
1.3.1	Allgemein	11
1.3.2	Kryopräparation	12
1.3.3	Kontrastentstehung	12
1.3.4	Elektronentomographie	13
1.3.5	Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Tomogrammen	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Benötigte Pufferlösungen	15
2.2	Aufreinigung der <i>Neurospora crassa</i> Mitochondrien	16
2.3	Aufreinigung der <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mitochondrien	17
2.4	Vitrifizierung der Proben	17
2.5	Datenerfassung am Elektronenmikroskop	18
2.6	Dreidimensionale Rekonstruktion der Tomogramme	18
2.7	Lokalisierung makromolekularer Komplexe	18
3	Ergebnisse	20
3.1	Dreidimensionale Rekonstruktion der Tomogramme	20

Inhaltsverzeichnis

3.2	Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien	23
3.2.1	Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien von <i>Neurospora crassa</i>	23
3.2.2	Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
4	Diskussion und Ausblick	29
4.1	Mitochondriale Morphologie	29
4.2	Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien	30
4.2.1	Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien von <i>Neurospora crassa</i>	30
4.2.2	Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
	Literaturverzeichnis	33

1 Einleitung

Laut der Endosymbiontentheorie sind Eukaryoten durch Phagozytose von Bakterien in andere prokaryotische Zellen entstanden. Diese Endosymbionten haben sich im Laufe der Zeit zu Zellorganellen entwickelt. Mitochondrien - die Kraftwerke der Zelle - sind Zellorganellen, die einige Merkmale von Prokaryoten tragen und diese Theorie bekräftigen. Bekannt ist, dass Mitochondrien eine eigene ringförmige mitochondriale DNA besitzen, die transkribiert und anschließend von mitochondrialen Ribosomen, die den 70S Ribosomen der Bakterien ähneln, translatiert wird. Die genaue Anzahl der Ribosomen, deren Position im Mitochondrium, sowie deren genauere Struktur konnte jedoch bis jetzt nicht vollständig geklärt werden. Einige Studien haben bereits gezeigt, wie sehr sich Mitochondrien und deren mitochondrialen Ribosomen in verschiedenen Organismen unterscheiden. In Zusammenhang mit diesen morphologischen Unterschieden wurden kürzlich definierte Komplexe postuliert, die bei der Bildung von Cristae Junctions eine entscheidende Rolle spielen [Herrmann, 2011]. Position und Struktur der Proteinkomplexe, die für die morphologischen Unterschiede in der Bildung der Cristae verantwortlich sind, konnten noch nicht beschrieben werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, diese makromolekularen Komplexe am Beispiel aufgereinigter Mitochondrien von *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* zu lokalisieren. Es soll erfasst werden, wie viele Ribosomen membranassoziiert vorliegen und wieviele sich frei in der mitochondrialen Matrix befinden. Zusätzlich soll die Position und Ausrichtung der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthase in der inneren Membran der Mitochondrien, sowie die Bildung der Cristae Junctions durch Proteinkomplexe untersucht werden.

Als Methode zur dreidimensionalen Abbildung wird hierfür die Kryoelektronentomographie (KET) verwendet. KET ermöglicht die Auflösung von molekularen Strukturen im Bereich von wenigen Nanometern in quasi-physiologischer Umgebung.

1.1 Mitochondrien

1.1.1 Allgemein

Aufgrund ihres bakteriellen Ursprungs sind Mitochondrien Zellorganellen, die von zwei Membranen umgeben sind. Sie besitzen eine eigene mitochondriale DNA (mtDNA), die in Form von Plasmiden in der mitochondrialen Matrix zu finden ist und die für die vom Mitochondrium benötigten Proteine kodiert. Der Transkriptions- und Translationsapparat ähnelt dem der Bakterien. Mitochondrien enthalten insbesondere die molekularen Bausteine, die für die Respiration notwendig sind, welche an der inneren Mitochondrienmembran stattfindet, sowie die Enzyme des Zitronensäure-Zyklus und der Fettsäureoxidation, welche in der Mitochondrienmatrix stattfinden. Mitochondrien werden häufig als die Kraftwerke der Zelle betitelt, da bei der oxidativen Phosphorylierung ATP als essentieller Energieträger der Zelle gebildet wird. Durch eine Serie von Proteinkomplexen in der inneren Mitochondrienmembran werden Elektronen von NADH oder FADH₂ auf Sauerstoff übertragen und dadurch ein Protonengradient über die innere Membran erzeugt. Die ATP Synthese erfolgt über den Rückfluss von Protonen in die mitochondriale Matrix über einen Proteinkomplex, der als FoF₁-ATPase bezeichnet wird. Die elektromotorische Kraft wird folglich in protonmotorische Kraft umgewandelt und letztendlich in chemischer Energie in Form von ATP gespeichert. Durch die vollständige Oxidation von einem Molekül Glukose werden 26 Moleküle ATP synthetisiert.

1.1.2 ATP-Synthase

Die F_0F_1 -ATP-Synthase ist in der inneren Membran von Mitochondrien lokalisiert und dient zur Gewinnung von ATP unter Ausnutzung eines Protonengradienten bei der Respiration. Dieser 600 kDa große Komplex gehört zusammen mit Komplex 1 (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette zu den größten Membranprotein-Komplexen in Mitochondrien (Abb. 1.1). Er besteht aus dem F_1 -Faktor, welcher der Synthese von ATP dient und dem Oligomycin empfindlichen F_0 -Faktor, der den Protonenkanal bildet. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist die Identifizierung der ATP-Synthase in Mitochondrien sehr leicht über den 10 nm große F_1 -Kopf, der über einen 5nm langen Stiel mit der Membran verbunden ist, möglich [Davies et al., 2011].

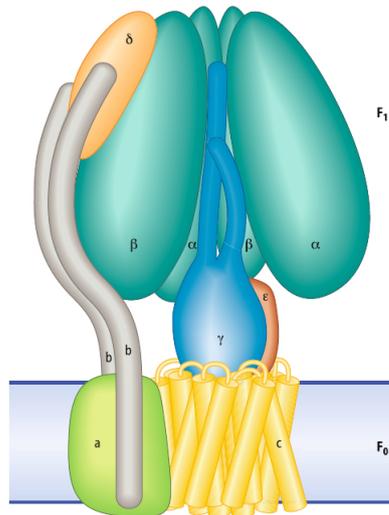


Abbildung 1.1: **Schematischer Aufbau der F_0F_1 -ATP-Synthase:** Der Komplex besteht aus insgesamt 16 Untereinheiten. Die Untereinheit a und 10 Kopien der Untereinheit c bilden den F_0 -Teil der ATP-Synthase. Der F_1 -Teil besteht aus einem Hexamer aus drei α - und drei β -Untereinheiten (eine α - und eine β -Untereinheit sind nicht gezeigt) sowie der δ -Untereinheit und zwei b -Untereinheiten, welche den peripheren Stiel bilden [Loeffler et al., 2006, S. 500ff.]. (Abbildung aus [Loeffler et al., 2006])

1.1.3 Morphologie

Palade (1952) und Sjöstrand (1953) waren mit ihren ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Mitochondrien Wegbereiter für deren morphologische Aufklärung. Das von Palade beschriebene Baffle-Modell (Abb. 1.2 A) mit einer sehr stark gefalteten inneren Membran mit weiten Öffnungen zum Intermembranraum wird häufig schematisch in Büchern gezeigt. Diese Cristae reichen weit in die Mitochondrienmatrix und wurden mit Oberflächenvergrößerung begründet. Bei dem Modell von Sjöstrand hingegen (Abb. 1.2 B) bilden diese Cristae eigene Zellkompartimente, die die Matrix in mehrere Kompartimente unterteilt und mit der inneren Membran verbunden sind. Diese tubulären Verbindungen zwischen Cristae und innerer Membran werden als Cristae junctions bezeichnet. Spätere EM Aufnahmen haben gezeigt, dass Sjöstrands Modell eher der Wirklichkeit entspricht und Mitochondrien von verschiedenen Organismen oder Zelltypen stark variieren [Frey und Mannella, 2000].

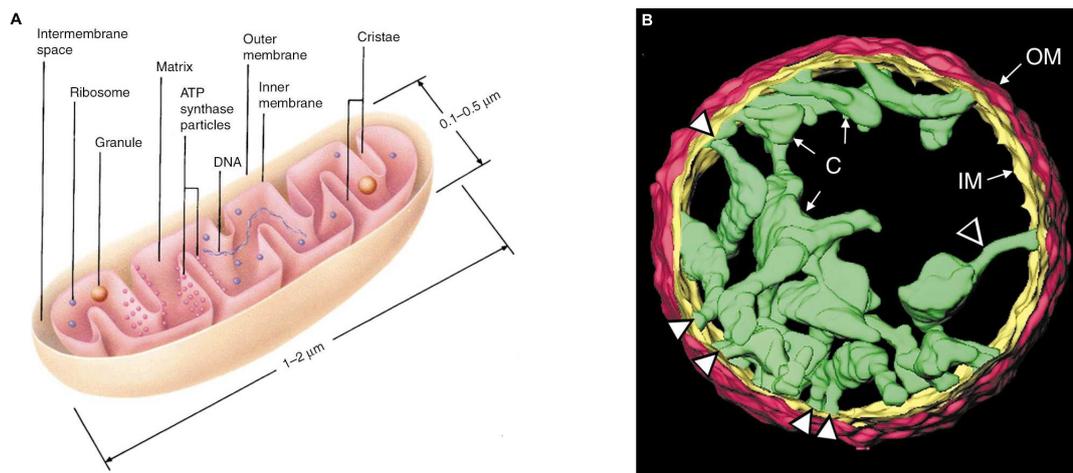


Abbildung 1.2: **Mitochondrien-Modell nach Palade (A) und Sjöstrand (B)**: Das Baffle Modell (A) zeigt die stark gefaltete innere Membran mit Einstülpungen ins Innere des Mitochondrium und weiten Öffnungen zum Intermembranraum. Das Sjöstrand-Modell (B) verdeutlicht, wie die Cristae eigene Kompartimente bilden und mit der inneren Membran über tubuläre Verbindungen (Cristae Junctions) verknüpft sind. C, Cristae; IM, Innere Membran; OM, Äußere Membran; Pfeile zeigen auf die tubulären Verbindungen, die sie mit der inneren Membran verknüpft. (Abbildung aus [Frey und Mannella, 2000])

Bisherige KET Studien aufgereinigter Mitochondrien von *Neurospora crassa* haben gezeigt, dass diese ellipsenförmig sind und eine Größe von 0,6 bis 1,5 μm aufweisen (Abb. 1.3). Die Cristae sind über Cristae-Junctions mit der inneren Membran verknüpft, jedoch bilden sie ein dreidimensionales stark verzweigtes Netzwerk von Lamellen. Dies unterscheidet sie von den meisten anderen Mitochondrien, bei denen eine regelmäßige Anordnung von parallelen Cristae häufig zu finden ist [Nicastro et al., 2000].

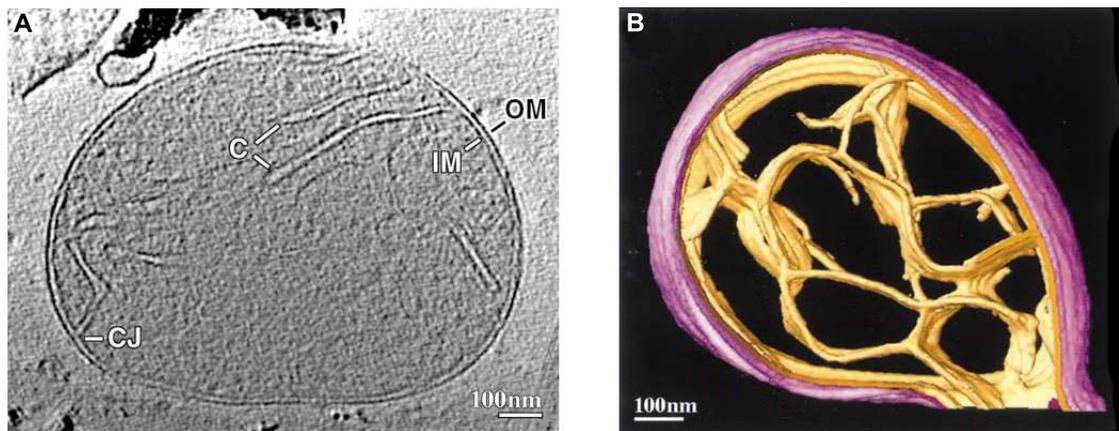


Abbildung 1.3: **Morphologie der Mitochondrien von *Neurospora crassa*:** Die Cristea bilden ein dreidimensionales stark verzweigtes Netzwerk das über Cristae Junctions mit der inneren Membran verknüpft ist. (A) Zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondrium von *Neurospora crassa*. C, Cristae; CJ, Cristae Junctions; IM, Innere Membran; OM, Äußere Membran. (B) Zeigt die Segmentierung der inneren und äußeren Membran einer dreidimensionalen Rekonstruktion einer Kippserie. (Abbildung aus [Nicastro et al., 2000])

Spezifische makromolekulare Strukturen in den Mitochondrien, wie z.B. mitochondriale Ribosomen oder die FoF₁-ATPase, konnten aufgrund der limitierten Auflösung des Mikroskops, fehlender Software zur Prozessierung, sowie des schlechten Signal Rausch Verhältnis, (*Signal to Noise Ratio*) (SNR) bei der Studie von Nicastro et al noch nicht beschrieben werden.

1.1.4 MINOS-Komplex

Der MINOS-Komplex (mitochondrial inner membrane organizing system) wurde in drei unabhängigen Studien identifiziert und auch MICOS (mitochondrial contact site complex) und MitOS (mitochondrial organizing structure) bezeichnet [Herrmann, 2011]. Er besteht aus sechs Untereinheiten und ist wahrscheinlich durch seine Struktur für die Bildung der Cristae Junctions verantwortlich (Abb. 1.4).

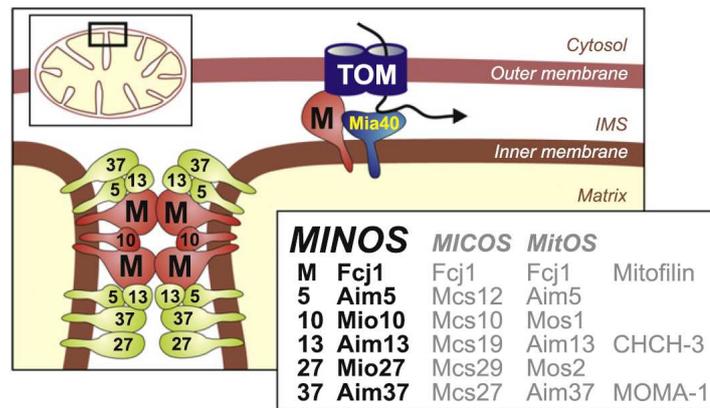


Abbildung 1.4: **Strukturbildung der Cristae Junctions durch den MINOS-Komplex (mitochondrial inner membrane organizing system):** Die in rot gezeigten Untereinheiten Mitofilin/Fcj1 und Mio10 bilden mit den anderen (grün gezeigten) Untereinheiten einen Proteinkomplex, der für die Bildung der Kontaktstellen von Cristae Junctions mit der inneren Membran verantwortlich ist. (Abbildung aus [Herrmann, 2011])

Die Untereinheiten Mitofilin/Fcj1 und Mio10 spielen hierbei eine bedeutende Rolle. Das Fehlen dieser Untereinheiten führt zu einer Wachstumsbeeinträchtigung und starken Veränderungen der Morphologie von Mitochondrien. Dies prägt sich durch eine reduzierte Anzahl an Verknüpfungen und Bildung von eher parallelen Cristae aus [von der Malsburg et al., 2011]. Bekannt ist jedoch, dass dieser Komplex nicht alleine für die Bildung der Cristae Junctions verantwortlich ist und weitere, nicht identifizierte, strukturelle Komponenten vorhanden sein müssen. Folglich konnte noch nicht genau geklärt werden, wie der MINOS-Komplex mit der Bildung der Cristae Junctions in Verbindung steht [Herrmann, 2011].

1.2 Ribosomen

1.2.1 Allgemein

Ribosomen sind sehr komplexe Makromoleküle aus Proteinen und ribosomaler RNA (rRNA). Ihre Aufgabe liegt darin, die genetische Information, die durch RNA-Polymerasen von DNA in messenger RNA (mRNA) transkribiert wurde, in Polypeptidketten zu translatieren, welche durch Faltung ein funktionelles Protein bilden. Transfer-RNA (tRNA)-Moleküle dienen dabei als Transportmoleküle für die jeweiligen Aminosäuren, welche mittels komplementärer Basenpaarung zwischen tRNA und mRNA die gewünschte Aminosäure-Sequenz bilden. Prokaryotische Ribosomen haben einen Sedimentationskoeffizient von 70S und sind aus zwei Untereinheiten aufgebaut. Sie können in eine große (50S) und eine kleine (30S) Untereinheit unterteilt werden. Die große Untereinheit enthält ca. 30 verschiedene Proteine und zwei RNA-Moleküle (23S und 5S), die kleine Untereinheit dagegen ca. 20 verschiedene Proteine und ein 16S RNA-Molekül. Diese drei RNA-Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Struktur und Funktion der Ribosomen und machen zwei Drittel der Gesamtmasse dieses Riboprotein-Komplexes aus. Die kleine

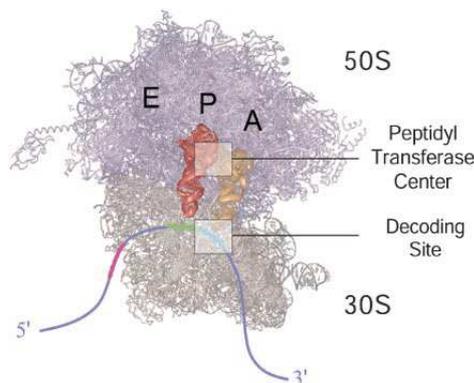


Abbildung 1.5: **Der grundlegende Prozess der Proteinbiosynthese am 70s Ribosom von *Escherichia coli*:** Gezeigt sind die drei tRNA-Bindungsstellen (A-, P- und E-Seite) des 70s Ribosoms zwischen großer und kleiner Untereinheit. Es ist schematisch gezeigt, wie die mRNA in der kleinen ribosomalen Untereinheit gebunden und decodiert wird. Das Peptidyltransferase Zentrum, in dem die Peptidbindung geknüpft wird, befindet sich in der großen Untereinheit. (Abbildung aus [Blanchard et al., 2004])

Untereinheit dient dazu, die zu translatierende mRNA zu binden und zu dekodieren und kontrolliert die Basenpaarung zwischen mRNA und tRNA. Die Peptidbindung wird in der 50S Untereinheit durch ihre Peptidyltransferase-Aktivität geknüpft. Die tRNA Moleküle liegen folglich wie eine Brücke im Zwischenraum der beiden Untereinheiten (Abb. 1.5). Die mRNA läuft durch einen Kanal zwischen Kopf und Körperregion der kleinen Untereinheit und das naszierende Protein verlässt das Ribosom durch einen Tunnel der großen ribosomalen Untereinheit [Frank, 1998].

1.2.2 Mitochondriale Ribosomen

Mitochondriale Ribosomen (Mitoribosomen) ähneln sehr stark den Ribosomen von Bakterien, wobei sie sich in ihrer detaillierten Struktur jedoch klar von diesen unterscheiden und eine größere Anzahl an Proteinen besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass Mitoribosomen von Pilzen und Tieren die 5S RNA der großen ribosomalen Untereinheit fehlt. Es ist schwer, eindeutige strukturelle Gemeinsamkeiten von verschiedenen Mitoribosomen aus verschiedenen Organismen zu finden, da sie sich trotz des gemeinsamen Ursprungs von einem Organismus der den heutigen Purpurbakterien ähnelt, durch evolutionäre Änderungen stark voneinander abheben [Kitakawa und Isono, 1991].

1.3 Kryoelektronentomographie

1.3.1 Allgemein

Da in der klassischen Optik die mikroskopische Auflösung von zwei beliebigen Punkten nur möglich ist, wenn deren Abstand mindestens der halben Wellenlänge der verwendeten Strahlung entspricht, wird das maximale Auflösungsvermögen eines Mikroskops durch die Wellenlänge der Strahlung begrenzt. Der einfachste Weg eine Probe mit einer hohen Bildauflösung darzustellen ist folglich, die Wellenlänge der Strahlungsquelle zu reduzieren. Da ein kohärenter Elektronenstrom mit einer Field Emission Gun (FEG) heutzutage relativ einfach zu generieren ist und ein Elektron mit einer kinetischen Energie von 300 keV eine Wellenlänge von $0,02 \text{ \AA}$ besitzt, eignet sich Elektronenmikroskopie sehr gut für die Auflösung von molekularen Strukturen. Das Auflösungsvermögen eines Elektronenmikroskops ist derzeit praktisch nicht durch die Wellenlänge begrenzt, sondern durch andere Fak-

toren, wie beispielsweise die Vorbereitung der Probe, fehlerbehaftete, magnetische Linsensysteme und mögliche strukturelle Schäden bei Verwendung von zu hoch-energetischer Strahlung. Da Elektronen sehr stark mit Materie interagieren, sollte die Probe bei Elektronenmikroskopie nicht dicker als 500 nm sein und der Strahlengang evakuiert werden, um hochauflösende Bilder zu erhalten [Lucić et al., 2012].

1.3.2 Kryopräparation

Biologische Objekte sind meist in Wasser gelöst, welches im Hochvakuum des Elektronenmikroskops verdampfen würde. Um biologische Proben im nativen, gelösten Zustand zu analysieren muss dieses Problem umgangen werden. Bei der Kryopräparation entsteht durch abruptes Abkühlen der Probe auf Temperaturen unter -140° amorphes Eis, welches die native Struktur der Probe konserviert und das Verdampfen von Wasser verhindert. Dieser Vitrifizierungsvorgang wird durch Einschließen der Probe in flüssiges Ethan, welches durch flüssigen Stickstoff gekühlt wird, realisiert. Vor der Vitrifizierung muss der Wasserfilm mit Hilfe von Filterpapier abgezogen werden um die Dicke des Eises gering zu halten. Dies kann manuell oder automatisch am Vitrobot passieren. Die so präparierten Proben müssen bis zur Untersuchung im Elektronenmikroskop bei Temperaturen unter -140° gehalten werden, was Lagerung und Handhabung wesentlich erschwert [Lucić et al., 2012].

1.3.3 Kontrastentstehung

Aufgrund der geringen Elektronendichte von biologischen Proben ist eine hochauflösende Abbildung nur mittels Amplitudenkontrast nicht möglich. Stattdessen nutzt man Phasenkontrast, bei dem der Kontrast durch Interferenz der gestreuten Elektronen mit dem Primärstrahl erzeugt wird. Die Kontrasttransferfunktion (KTF) resultiert aus den Eigenschaften des Elektronenmikroskops. Amplitude und Vorzeichen des Phasenkontrast werden als Funktion der räumlichen Frequenz moduliert. Dabei ist der Defokuswert der einzige Parameter, der durch den Benutzer variiert wird. Geringe Defokus-Werte führen zu einem höheren Auflösungsvermögen von detaillierten Strukturen, aber gleichzeitig zu einem schwachen Kontrast. Sehr hohe Defokus-Werte haben gegenläufigen Effekt und führen zu einer schlechteren Auflösung aber stärkeren Phasenkontrast. Die Wahl des richtigen Defokus-Wertes spielt folglich eine entscheidende Rolle für die Abbildung einer Probe mittels Elek-

tronenmikroskopie mit ausreichender Auflösung und hinreichenden Phasenkontrast [Lucić et al., 2012].

1.3.4 Elektronentomographie

Um aus zweidimensionalen Abbildungen eine dreidimensionale Dichte rekonstruieren zu können, muss eine Kippserie entlang einer Achse senkrecht zum Elektronenstrahl der zu untersuchenden Probe aufgenommen werden. Bei der Elektronentomographie wird die Probe üblicherweise von -60° bis $+60^\circ$ gekippt. Für jeden Kippwinkel muss neu fokussiert und die Wanderung der Probe durch das Kippen kompensiert werden (Tracking). Um die Strahlenbelastung für die Probe so gering wie möglich zu halten, finden an einer Fokusstelle, die einige Mikrometer entfernt auf der Kippachse liegt, Fokussierung und Tracking statt, bevor das Bild an der zu untersuchenden Stelle erfasst wird. Bei diesem sogenannten „low-dose“ Datenerfassungsschema werden durch einen Computer verschiedene Mikroskop-Zustände für verschiedene Aufgaben, wie Fokussierung, Tracking und Bilderfassung genutzt. Nachdem die zweidimensionalen Projektionen der Kippserie mit Hilfe von kolloidalen Gold-Markern in der Probe auf ein gemeinsames dreidimensionales Koordinatensystem aligniert wurden, wird durch gewichtete Rückprojektion eine dreidimensionale Dichte rekonstruiert. Da durch den Kipphalter der zugängliche Winkelbereich für die Aufnahme von Tomogrammen auf Winkel zwischen -60° und $+60^\circ$ beschränkt ist, ergibt sich ein keilförmiger Bereich im Fourierraum des rekonstruierten Objekts, in dem die Informationen fehlen. Dieser Bereich wird als „missing-wedge“ bezeichnet (Abb. 1.6).

1.3.5 Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Tomogrammen

In den rekonstruierten Tomogrammen kann mit Hilfe einer Referenzstruktur gezielt nach makromolekularen Komplexen gesucht werden. Mit einem Mustereerkennungsalgorithmus wird durch Kreuzkorrelation eine relative Ähnlichkeit zwischen Referenz und Subvolumina des Tomogramms berechnet, indem sie pixelweise in jede Raumrichtung verschoben und rotiert wird [Frangakis et al., 2002]. Der berechnete Kreuzkorrelations-Koeffizient wird dem jeweiligen zentralen Pixel im Tomogramm zugeordnet, wodurch ein Korrelationsvolumen entsteht. Durch den großen

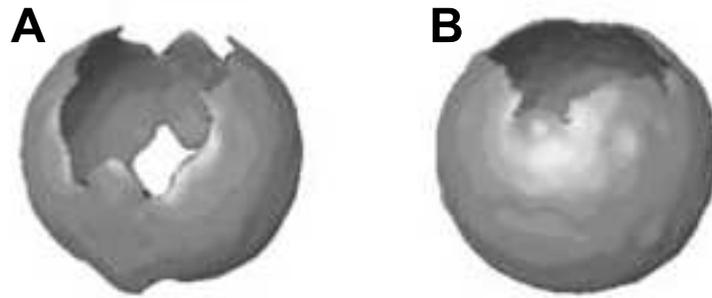


Abbildung 1.6: **Bereiche fehlender Information („missing-wedge“)**: Durch den unzugänglichen Winkelbereich außerhalb von -60° und $+60^\circ$ entsteht bei der dreidimensionalen Rekonstruktion ein keilförmiger Bereich fehlender Information. (A) veranschaulicht den „missing-wedge“-Effect bei einer Kippserie um eine Achse. Dieser keilförmige Bereich fehlender Information kann durch eine doppelte Kippserie entlang senkrecht aufeinander stehender Achsen (B) reduziert werden. (Abbildung aus [Lucić et al., 2005])

Rechenaufwand werden hierfür Computercluster benötigt, auf die die einzelnen Subvolumina des Tomogramms verteilt werden können. Positionen und Orientierungen von Partikeln mit besonders hohem Kreuzkorrelations-Koeffizient können aus diesem Korrelationsvolumen extrahiert werden und Subtomogramme mit dem enthaltenen detektierten Partikel rekonstruiert werden. Die Struktur der Partikel kann durch iterative Alignierung der Subtomogramme analysiert werden. Die Subtomogramme werden bezüglich ihrer Translation und Rotation so variiert, dass der Kreuzkorrelations-Koeffizient in Bezug auf eine Referenz maximiert wird. In einem iterativen Prozess werden die rotierten und translatierten Subtomogramme gemittelt und als neue Referenz für eine weitere Alignierung verwendet. Dies wird so lange wiederholt, bis Translation und Rotation der Subtomogramme konvergieren.

2 Material und Methoden

2.1 Benötigte Pufferlösungen

Tabelle 2.1: ST/SET-Puffer

	ST 1x (500 ml)	SET 1x (500 ml)
Sucrose (1 M)	125 ml	125 ml
EDTA (0,25 M)		2 ml
Tris (1 M)	10 ml	10 ml
H ₂ O	365 ml	363 ml

Tabelle 2.2: MP1/MP2-Puffer

	MP1 (2ml/g Feuchtgewicht)
Tris	100 mM
DTT	10 mM
	MP2 (6,7 ml/g Feuchtgewicht)
Sorbitol	1,2 M
KPi-Puffer (pH 7,4)	20mM
Zymolyse	3 mg/g Feuchtgewicht

Tabelle 2.3: Homogenisierungspuffer und SEH-Puffer

	Homogenisierungspuffer (13,4 ml/g Feuchtgewicht)	SEH
Tris (pH 7,4)	10 mM	
HEPES (pH 7,4)		20 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM	1 mM
Sorbitol	0,6 M	0,6 M
BSA	0,2 %	
PMSF	1 mM	

2.2 Aufreinigung der *Neurospora crassa* Mitochondrien

In Zusammenarbeit mit AG Neupert wurden die Untersuchungen bezüglich mitochondrialer Proteine an aufgereinigten *Neurospora crassa* Mitochondrien durchgeführt, bei denen vor der Aufreinigung die Translation durch Zugabe von Cycloheximid gestoppt wurde. Die geernteten *Neurospora crassa* Zellen wurden über Nacht für mindesten 18 Stunden in 2 Liter Flüssigkultur, zu der 80ml 50%ige Zuckerlösung und 40ml 50x Vogels Salz zugeführt wurden, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die abgeernteten *N. crassa* Zellen mit dem Mörser, Seesand und zugeführtem SET-Puffer mit PMSF homogenisiert. Anschließend wurden die Mitochondrien durch schrittweises abzentrifugieren der übrigen Zellbestandteile isoliert. Das Pellet mit den Mitochondrien wurde in 1 x ST-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rpm und 2°C konnten die Mitochondrien, die den äußeren, weichen und orange-farbenen Rand des Pellets bilden, in Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 1 x ST-Puffer überführt werden. Die gemessene Mitochondrienkonzentration betrug 31,38 mg/ml. Zur Kryoelektronentomographischen Analyse wurden die Mitochondrien 1:3 verdünnt mit 1 x ST-Puffer (10,46 mg/ml) verwendet.

2.3 Aufreinigung der *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrien

Die Aufreinigung der *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrien wurde von Michael Wöllhaf (Technische Universität Kaiserslautern, Abteilung für Zellbiologie) durchgeführt. Die Anzucht der *S. cerevisiae* Zellen erfolgte in YPGal Medium (Galactose 2% ; Casein Pepton 21g/l; Hefeextrakt 11g/l). Zum Ernten der Zellen wurde 1L YPGal Medium bei einer OD₆₀₀ von 1 bis 1,5 zentrifugiert (5 min, 2900 g, RT). Nach Resuspendieren des Sediments in MP1 wurde erneut zentrifugiert (5 min, 2900 g, RT), anschließend mit 1,2 M Sorbitol gewaschen und wieder zentrifugiert (5 min, 2900 g, RT). Nach der Resuspension in MP2 für 60 min bei 30°C wurde auf Eis weiter gearbeitet und erneut zentrifugiert (5 min, 2900 g, 4°C). Das resuspendierte Pellet wurde im Dounce Homogenisator mit Homogenisierungspuffer gelöst, homogenisiert und anschließend dreimal zentrifugiert (5 min 2200 rpm, 4°C) und mit Homogenisierungspuffer gewaschen, wobei das Sediment verworfen wurde. Der Überstand wurde für 12 min bei 17.700 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in SEH resuspendiert und bei 3000g und 4°C erneut zentrifugiert. Nach Zentrifugation des Überstandes für 10 min bei 18.000 g wurde das Pellet in SEH resuspendiert und in flüssigem Stickstoff für Lagerung und Transport schockgefroren.

2.4 Vitrifizierung der Proben

Für die Vitrifizierung wurden Molybdängrids mit lacey carbon Film (Ted Pall, San Diego, USA) verwendet, die mit Hilfe eines Plasmacleaners gesäubert und hydrophilisiert wurden. Hierzu wurden sie für 15s beglimmt. Anschließend wurden 3 μ l der unverdünnten Mitochondrien-Probe aufgetragen. Direkt vor der Vitrifizierung in flüssigem Ethan, welches mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, wurden 3 μ l kolloidales Gold hinzupipettiert. Die Vitrifizierung erfolgte am FEI Vitrobot Mark IV, welcher für 3 s und mit einer blotting-force von 1 mit Filterpapier von beiden Seiten des Grids Flüssigkeit abzog. Die Aufbewahrung bis zur späteren Untersuchung am Elektronenmikroskop erfolgte in flüssigen Stickstoff.

2.5 Datenerfassung am Elektronenmikroskop

Die Erfassung der zweidimensionalen Rohdaten erfolgte an einem Krios Titan Transmissionselektronenmikroskop, das mit einer Direct Detection Kamera (FEI Falcon) mit einer Auflösung von 4096x4096 Pixeln ausgestattet war. Die Bilder wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 300 keV, einem nominalen Defokus von $8\mu\text{m}$ und einer Pixelgröße von 0,288 nm/Pixel aufgenommen. Für die spätere Erzeugung des Tomogramms wurde eine Kippserie angefertigt, bei der die Probe von -60° bis $+60^\circ$ in Schritten von 3° gekippt wurde. Hierfür wurde das Softwarepaket FEI Tomography zur Hilfe genommen. Die Dosis von 100 Elektronen pro Quadrat-Ångström wurde über die Kippserie zur Vermeidung von Strahlenschäden nicht überschritten.

2.6 Dreidimensionale Rekonstruktion der Tomogramme

Die gesamte Datenprozessierung wurde mit der *TOM-toolbox* [Nickell et al., 2005], dem av3-Paket [Förster et al., 2008] und PyTom [Hrabe et al., 2011] durchgeführt. Durch die gewichtete Rückprojektion konnte aus den gewonnen Rohdaten der Kippserie eine dreidimensionale Rekonstruktion der Tomogramme erfolgen. Für die Alignierung wurden sechs gleichmäßig verteilte Goldpartikel, die sich in unmittelbarer Nähe der zu untersuchenden Stelle befanden, ausgewählt. Über die gesamte Kippserie hinweg, betrug die berechnete Abweichung der gewählten Markerpositionen und der berechneten Position im dreidimensionalen Tomogramm weniger als vier Pixel. Aus den 4kx4K original Daten wurden dreifach gebinnte Tomogramme (512x512x128 Pixel) rekonstruiert.

2.7 Lokalisierung makromolekularer Komplexe

Für die automatische Selektierung der Ribosomen in den rekonstruierten Tomogrammen von *Saccharomyces cerevisiae* mittels Kreuzkorrelation wurde das mitochondriale Ribosom von *Leishmania tarentolae* [Sharma et al., 2009] als Referenz verwendet. Nach Aussortierung falsch positiver Partikel und Rekonstruktion von 71 ungebinten Subtomogrammen mit einer Kantenlänge von 128 Pixeln und einer

resultierenden Pixelgröße von 2,88 Ångström, konnte durch Mittelung der Elektrendichten eine experimentelle Struktur des mitochondrialen Ribosoms von *Saccharomyces cerevisiae* erfasst werden. Bei der manuellen Lokalisierung der Ribosomen von *Neurospora crassa* wurden die Koordinaten der Ribosomen in der Software UCSF Chimera (Version 1.5.2) bestimmt und anschließend einfach gebinnete Subtomogramme (80x80x80 Pixel) rekonstruiert. Die resultierende Pixelgröße der Subtomogramme betrug 5,8 Ångström. Für die iterative globale Alignierung der Subtomogramme wurde das mitochondriale Ribosom von *Leishmania tarentolae* [Sharma et al., 2009] als Startreferenz verwendet und auf die Objektpixelgröße der Subtomogramme skaliert. Durch die Mittelung der alignierten Subvolumina konnte die experimentelle Struktur des mitochondrialen Ribosoms erfasst werden. Für die Lokalisierung der Proteinkomplexe, die für die Bildung der Cristae-Junctions verantwortlich sind, wurden in Chimera die Koordinaten von 41 Regionen in 12 Tomogrammen bestimmt und anschließend die ungebinnten Subtomogramme (200x200x200) global aligniert und gemittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Dreidimensionale Rekonstruktion der Tomogramme

Aus den Rohdaten der Kippserien wurden dreifach gebinnte Tomogramme rekonstruiert. Abbildung 3.1 zeigt den Schnitt durch die xy-Ebene von drei, rekonstruierten Tomogrammen der Mitochondrien von *Neurospora crassa*.

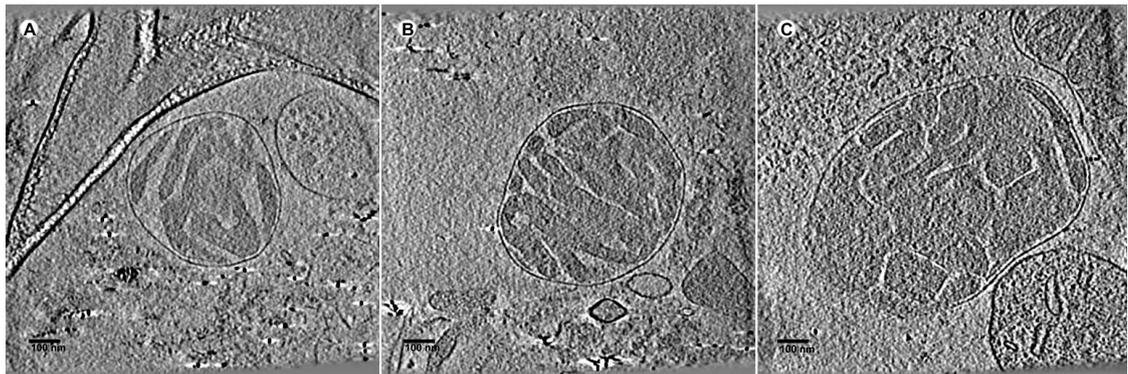


Abbildung 3.1: **Ergebnis der dreidimensional rekonstruierten Volumen der Mitochondrien von *Neurospora crassa***: Gezeigt ist ein Schnitt durch die xy-Ebene von drei rekonstruierten Tomogrammen (A, B und C). Der Durchmesser der Mitochondrien schwankt von ca. $0,5\mu\text{m}$ (Tomogramm A) bis $1,5\mu\text{m}$ (Tomogramm C). Ebenfalls ist zu erkennen, dass die Form der Cristae variiert. In Tomogramm A sind große Cristaekompartimente zu sehen, die von kleinen Matrixkompartimenten unterteilt werden, wohingegen Tomogramm C sehr eng verlaufende Cristae zeigt, die einen einheitlichen Membranabstand aufweisen und die weitläufige Matrix in große Kompartimente unterteilen.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Morphologie der Mitochondrien stark variiert. Die Größe der Mitochondrien, gemessen an ihrem Durchmesser, divergiert von etwa 0,5 bis 1,5 μm . Die Form der Cristae zeigt sich als sehr unbeständig und reicht von teils voluminösen Cristaekompartimenten (Abb. 3.1A) hin zu sehr schmalen Cristae mit einheitlichen Membranabstand von etwa 15nm (Abb. 3.1C). Durch die Form der Cristae wird die mitochondriale Matrix in mehrere Kompartimente unterteilt. Die einzelnen, dreifach gebintten Tomogramme, wurden mit der Software Amira (Version 5.4.0; Visage Imaging, San Diego) durch Segmentierung der inneren und äußeren Membran visualisiert (Abb. 3.2). Durch die Einstülpungen der Cristae bilden sich mehrere, verschieden große Matrixkompartimente mit hoher Elektronendichte, in denen sich Ribosomen (R) mit dem Auge lokalisieren lassen. Die Segmentierung der inneren und äußeren Membran veranschaulicht sehr gut das stark verzweigte Netzwerk der Cristae in den Mitochondrien von *Neurospora crassa*.

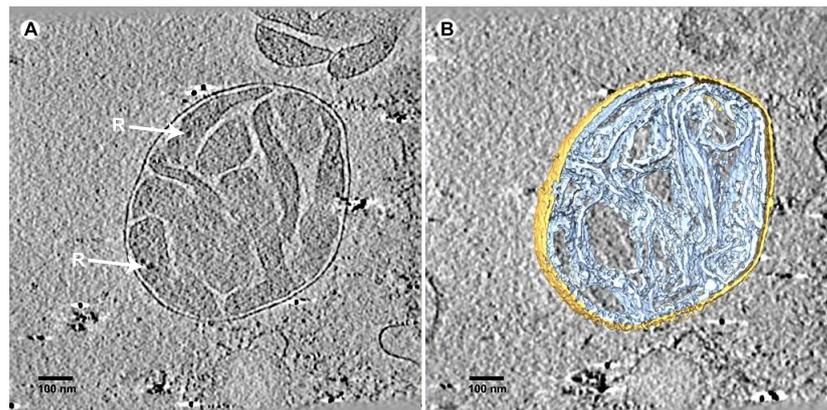


Abbildung 3.2: **Ergebnis des dreidimensional rekonstruierten Volumen der Kippserien eines *Neurospora crassa* Mitochondrium mit anschließender Segmentierung der inneren und äußeren Membran:**(A) Zeigt den Schnitt durch die xy-Ebene des rekonstruierten Tomogramms. Es ist sehr gut zu erkennen, wie sich durch die Cristaeinstülpungen mehrere Matrixkompartimente bilden, die in ihrer Größe variieren. Trotz der hohen Matrixdichte sind Ribosomen (R) zu erkennen. In (B) wurden die innere und äußere mitochondriale Membran mit der Software Amira (Version 5.4.0; Visage Imaging, San Diego) segmentiert und damit das stark verzweigte Cristae-Netzwerk und die Abstände zwischen innerer (blau) und äußerer Membran (gelb) visualisiert.

Der sehr einheitliche Abstand von etwa 10 nm zwischen innerer und äußerer Membran lässt sich in diesem Tomogram (Abb. 3.2 A) sehr gut erkennen. Obwohl die mitochondriale Matrix sehr dicht wirkt, lassen sich durch die bessere Auflösung des Elektronenmikroskops detaillierte Strukturen mit höherer Dichte erkennen. Die untersuchten Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* (Abb. 3.3) zeigen im Vergleich zu den Mitochondrien von *Neurospora crassa* einen wesentlich höheren Kontrast und eine weniger dichte Matrix, wodurch sich Ribosomen (R) in der mitochondrialen Matrix oder sogar ATP-Synthasen (A) an der inneren Mitochondrienmembran im Tomogramm erkennen lassen. Anders als bei den Mitochondrien von *Neurospora crassa*, bilden sich in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* kleine tunnelartige Cristaekompimente, die von einer einheitlichen Matrix umgeben sind. In ihrem Durchmesser zeigen sie eine ähnliche Länge wie Mitochondrien von *Neurospora crassa* (etwa 1 μm).



Abbildung 3.3: **Ergebnis der dreidimensional rekonstruierten Volumen der Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae***: Der Kontrast der erhaltenen Tomogramme ist wesentlich höher und lässt bereits mit dem Auge Strukturen von Ribosomen (R) und ATP-Synthasen (A) erkennen. In der einheitlichen mitochondrialen Matrix mit einem homogenen Abstand zwischen innerer und äußerer Membran bilden sich mehrere kleine Cristaekompimente. An der Membran dieser Kompartimente lassen sich die Köpfe der ATP-Synthase (A) erkennen, die in die Matrix hineinreichen. In der weniger diffusen Matrix können Ribosomen (R) mit einer deutlich höheren Dichte wahrgenommen werden.

3.2 Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien

3.2.1 Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien von *Neurospora crassa*

Durch die hohe Dichte der mitochondrialen Matrix in *Neurospora crassa* und dem daraus resultierenden schlechten Signal zu Rausch Verhältnisses, war eine automatische Selektierung mitochondrialer Ribosomen mittels Kreuzkorrelation nicht möglich. Da die hohen Dichten der Ribosomen mit dem Auge jedoch gut zu erkennen waren, erfolgte die Lokalisierung der Ribosomen durch Bestimmung der Koordinaten im dreifach gebintten Tomogramm und anschließender Rekonstruktion einfach gebinnter Subtomogramme mit einer Kantenlänge von 80 Pixeln. Aus drei rekonstruierten Tomogrammen konnten die Koordinaten von 68 Ribosomen bestimmt werden. Nach globaler Alignierung der einfach gebintten Subtomogramme (80x80x80 Pixel) mit 10 Iterationen, konnte durch Mittelung der alignierten Subvolumina die experimentelle Struktur des mitochondrialen Ribosoms erfasst werden (Abb. 3.4).

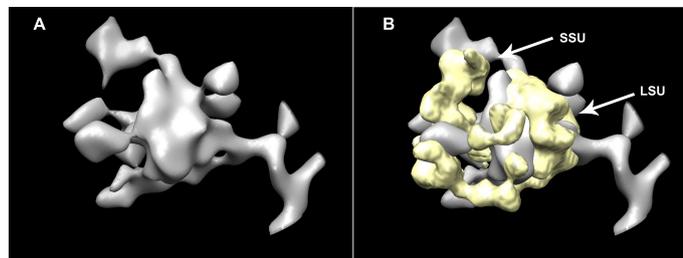


Abbildung 3.4: **Experimentelle Struktur des mitochondrialen Ribosoms von *Neurospora crassa***: Abbildung (A) zeigt in grau die erhaltene Elektronendichte des mitochondrialen Ribosoms von *Neurospora crassa* nach Alignierung und Mittelung von 68 einfach gebintten Subtomogrammen, subjektiv auf eine Auflösung von 60Å gefiltert. In Abbildung (B) wurde zur Visualisierung der Unterschiede zur Startreferenz die Dichte des mitochondrialen Ribosoms von *Leishmania tarentolae* in gelb eingebettet. SSU (small subunit) kleine ribosomale Untereinheit; LSU (large subunit) große ribosomale Untereinheit

Es ist deutlich zu erkennen, dass im Bereich der großen Untereinheit (large subunit, LSU) der Startreferenz in gelb (mitochondriales Ribosom von *Leishmania tarentolae*), die erwartete Elektronendichte für die große Untereinheit des Ribosoms von *Neurospora crassa* in grau zu finden ist. Allerdings lässt sich ein Fehlen der kleinen ribosomalen Untereinheit (small subunit, SSU) feststellen. Mit den erhaltenen Koordinaten der mitochondrialen Ribosomen im Tomogramm, konnte deren Elektronendichte in das segmentierte Mitochondrium übernommen werden und dadurch deren Position und Ausrichtung im Mitochondrium mit der Software Amira visualisiert werden (Abb. 3.5).

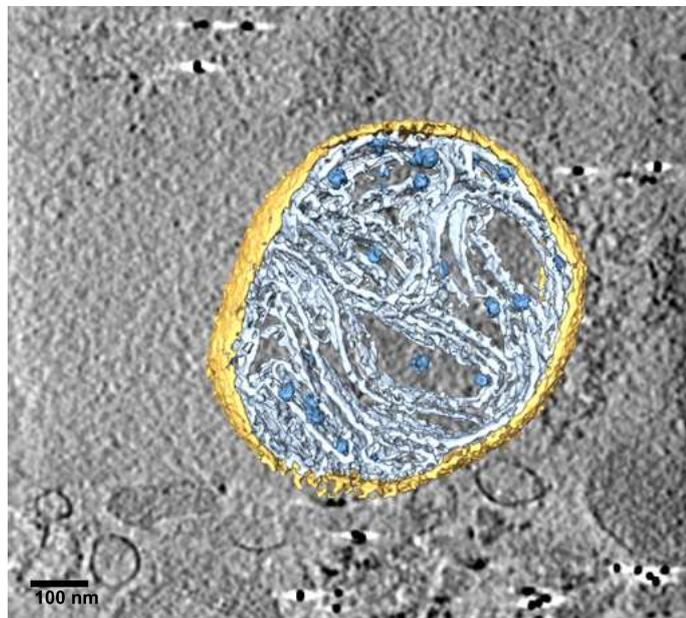


Abbildung 3.5: **Dreidimensionale Segmentierung der inneren und äußeren Membran, sowie der Ribosomen im Mitochondrium von *Neurospora crassa***: Gezeigt ist die äußere Membran in gelb, die innere Membran in hellblau und mitochondriale Ribosomen in dunkelblau. Ein Großteil der identifizierten Ribosomen befindet sich in der Nähe zur inneren Membran. Insgesamt konnten in diesem Tomogramm etwa 20 mitochondriale Ribosomen lokalisiert werden

Die Lokalisierung von ATP-Synthasen in den Mitochondrien von *Neurospora crassa* war aufgrund des schlechten SNR und fehlendem Kontrast nicht möglich.

Für die Untersuchung der Proteinkomplexe, die für die Bildung der Cristae-Junctions in *Neurospora crassa* verantwortlich sind, wurden im Tomogramm Mem-

branabschnitte der inneren Membran lokalisiert, die an der äußeren Membran einen charakteristischen Winkel von etwa 30° bilden. Durch die Alignierung und Mittelung der Subtomogramme sollte Aufschluss darüber gegeben werden, ob definierte Proteinkomplexe in der mitochondrialen Matrix im Winkelinneren oder in den Cristae-Junctions zu finden sind. Abbildung 3.6 zeigt beispielhaft welche Positionen im Tomogramm für die Rekonstruktion der Subtomogramme gewählt wurden. Mit

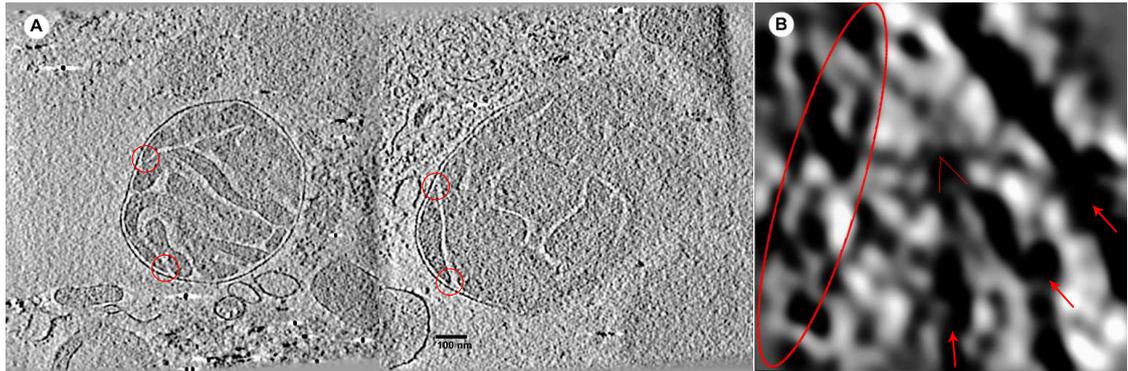


Abbildung 3.6: **Position der charakteristischen 30° Winkel in den Tomogrammen von *Neurospora crassa* Mitochondrien:** Die gewählten Positionen für die anschließende Rekonstruktion der Subtomogramme wurden beispielhaft in den xy-Ebenen von zwei verschiedenen Tomogrammen (A) in rot markiert. Abbildung (B) zeigt den Schnitt durch die xy-Ebene der erhaltenen Elektronendichte, nach Alignierung und Mittelung der 41 Subtomogramme. Die Pfeile markieren die gut definierte äußere Membran und den Winkel, der durch die zwei Membranabschnitte der Innere Membran gebildet wird. Der schlecht definierte, verwaschene Membranabschnitt der Junction wurde rot umrandet dargestellt.

der Software Chimera wurden die Koordinaten von 41 Winkeln in 12 Tomogrammen bestimmt und anschließend Subtomogramme zur Alignierung rekonstruiert. Die Alignierung und Mittelung der Subtomogramme lieferte eine hohe Elektronendichte der äußeren Membran und der beiden Schenkel des Winkels, der durch die Membranabschnitte der inneren Membran gebildet wird (Abb. 3.6 B). Der innere Schenkel des Winkels, der in die mitochondriale Matrix hinein reicht, war jedoch im Vergleich zum äußeren Schenkel unbestimmt und weniger deutlich. Der andere Membranabschnitt der Junction, der nicht an der Bildung des Winkels beteiligt ist, wirkte sehr verwaschen und nicht genau definiert.

3.2.2 Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae*

Der höhere Kontrast, der bei den Aufnahmen der Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* erreicht wurde, ermöglichte die Lokalisierung mitochondrialer Ribosomen durch Kreuzkorrelation mit dem mitochondrialen Ribosom von *Leishmania tarentolae*. Anschließend wurden falsch positive Partikel, wie Goldmarker oder Membranbestandteile, aussortiert. Insgesamt konnten etwa 10 bis 20 Ribosomen pro Mitochondrium lokalisiert werden. Durch die Erfassung mittels Kreuzkorrelation wird die exakte Ausrichtung der Ribosomen im Tomogramm erfasst. Die Mittelung der Subtomogramme von insgesamt 71 selektierten Partikeln lieferte eine aufschlussreiche Elektronendichte, bei der große und kleine ribosomale Untereinheit deutlich zu erkennen sind. (Abb. 3.7). Die anschließende Alignierung mit lokaler Winkel Abtastung lieferte durch das schlechte SNR keine Verbesserung.

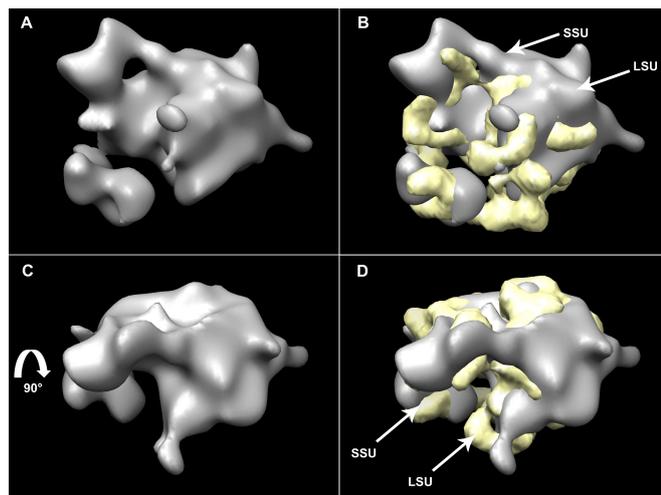


Abbildung 3.7: **Experimentelle Struktur des mitochondrialen Ribosoms von *Saccharomyces cerevisiae***: Abbildung (A) zeigt in grau die erhaltene, subjektiv auf eine Auflösung von 60Å gefilterte, Elektronendichte des mitochondrialen Ribosoms von *Saccharomyces cerevisiae* nach Mittelung der Subtomogramme. In Abbildung (B) wurde zur Visualisierung der Unterschiede die Dichte des mitochondrialen Ribosoms von *Leishmania tarentolae* in gelb eingebettet. In (C) und (D) wurde die Elektronendichte jeweils um 90° gedreht.) SSU (small subunit) kleine ribosomale Untereinheit; LSU (large subunit) große ribosomale Untereinheit

Zur Visualisierung der Lokalisierung der Ribosomen im Mitochondrium wurden die innere und äußere Membran segmentiert und die Elektronendichten der positiv selektierten Partikel implementiert. Zusätzlich wurden beispielhaft, einige der deutlich zu erkennenden F₁-Faktoren der ATP-Synthasen in rot markiert um deren Position an der inneren Mitochondrienmembran zu veranschaulichen (Abb. 3.8).

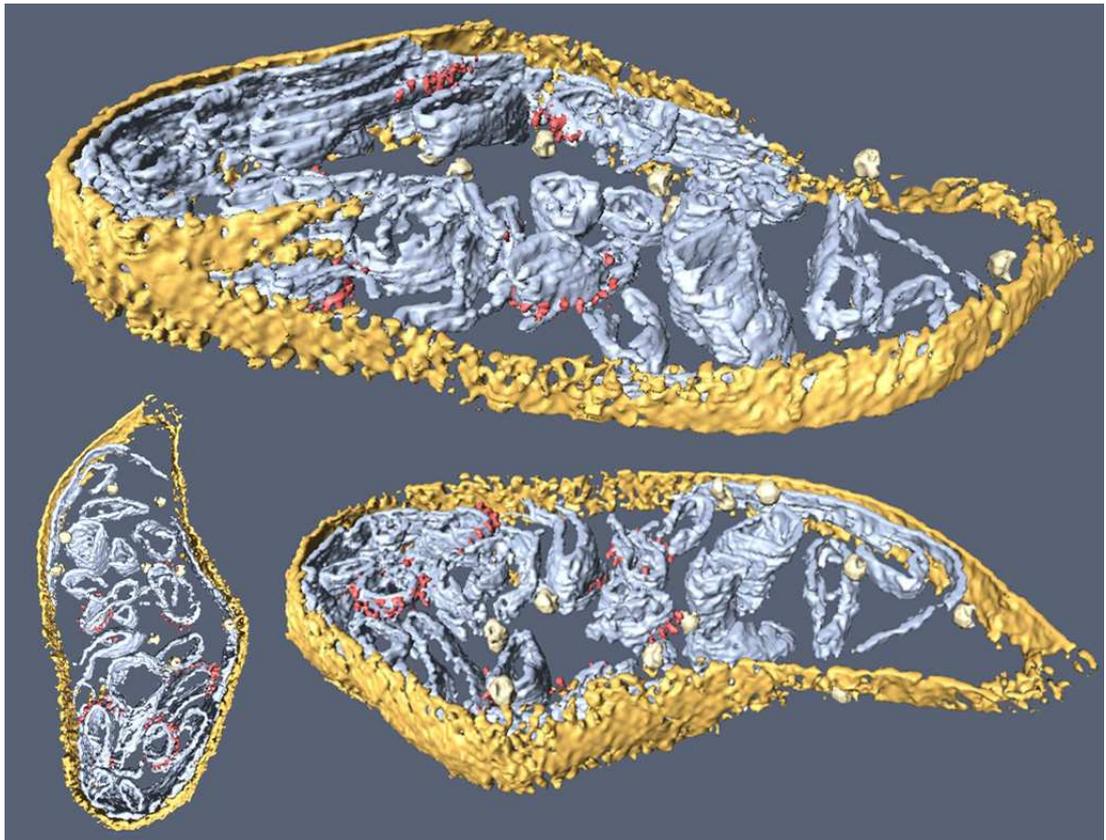


Abbildung 3.8: **Segmentiertes Mitochondrium von *Saccharomyces cerevisiae* nach dreidimensionaler Rekonstruktion der Kippserie:** Gezeigt ist das segmentierte Mitochondrium aus verschiedenen Blickwinkeln. Durch die Segmentierung wird eine „Landkarte“ mit Position und Ausrichtung der Ribosomen und ATP-Synthasen erzeugt. gelb: Äußere Membran, blau: Innere Membran, beige: mitochondriale Ribosomen, rot: F₁-Faktoren der ATP-Synthasen;

Durch die Membransegmentierung lässt sich sehr gut erkennen, dass im Vergleich zu den Mitochondrien von *Neurospora crassa* die Cristae Kompartimente nicht über Cristae-Junctions verbunden sind und somit kein dreidimensionales Netzwerk

formen. Die Cristae bilden tunnelartige Gebilde, die entlang der z-Achse verlaufen. An den äußeren Seiten dieser Tunnel sitzen die rot markierten Köpfe der ATP-Synthasen. Durch eine vergrößerte Ansicht auf ein Cristaekompartiment mit ATP-Synthasen lässt sich eine detailliertere Position und Ausrichtung der F₁-Teile erkennen (Abb. 3.9).

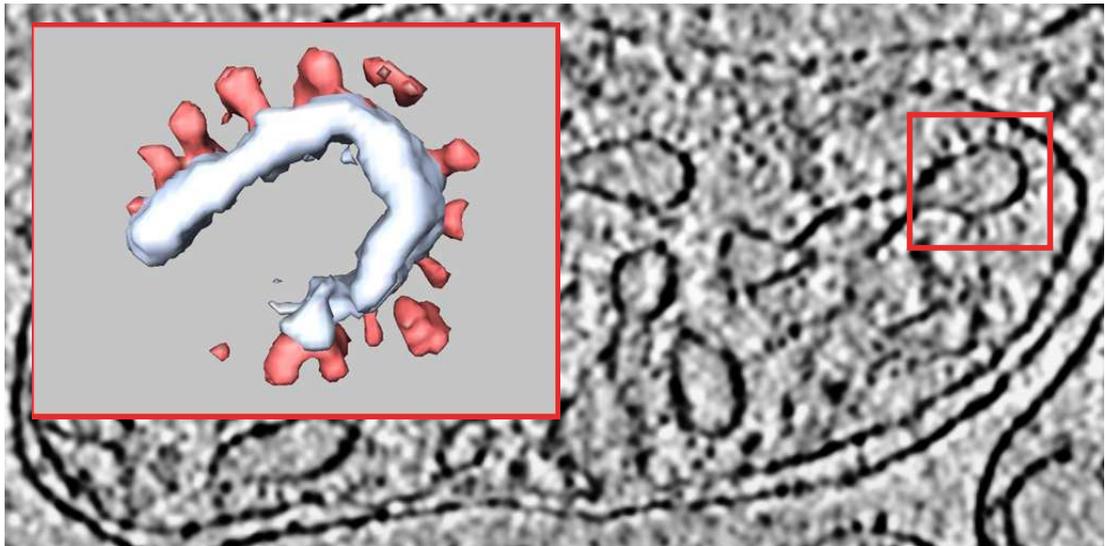


Abbildung 3.9: **Detaillierter Einblick auf Position und Ausrichtung der FoF₁-ATP-Synthasen:** Im Tomogramm lassen sich die ATP-Synthasen sehr einfach mit dem Auge lokalisieren. Durch Segmentierung und Vergrößerung des Ausschnitts kann die genaue Ausrichtung gut visualisiert werden. Die ATP-Synthasen sitzen in einem einheitlichen Abstand in der inneren Mitochondrienmembran. Die innere mitochondriale Membran ist in blau dargestellt, der F₁-Faktor in rot.

Die FoF₁-ATP-Synthasen sitzen senkrecht im Abstand von etwa 10nm in der inneren Mitochondrienmembran die einen Halbkreis bildet. Der F₁-Teil der ATP-Synthasen reicht ca 20nm aus der Membran in die mitochondriale Matrix hinein. Der Kopf des F₁-Faktors, gebildet aus dem Hexamer der drei α - und drei β -Untereinheiten, zeigt einen Durchmesser von 10nm.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Mitochondriale Morphologie

Verglichen mit früheren Studien bezüglich der Morphologie von *Neurospora crassa* Mitochondrien (Abb.: 1.3) fällt auf, dass das beschriebene dreidimensionale Netzwerk aus Lamellen auch hier zu finden ist. Die Dicke der Cristae, die als sehr einheitlich beschrieben wurden [Nicastro et al., 2000], variieren teilweise aber stark, wohingegen der Abstand zwischen innerer und äußerer Membran sich als durchwegs homogen beschreiben lässt. Grund für die heterogene Form der Cristae könnte sein, dass die Mitochondrien von *Neurospora crassa* in verschiedenen Ausrichtungen tomographiert wurden. Dies lässt sich durch das Betrachten der Schnitte in xz-Ebene und yz-Ebene bestätigen (nicht gezeigt). Ein weiterer Faktor könnte die Saccharose bei der Aufreinigung der Mitochondrien von *Neurospora crassa* sein. Die innere Membran ist im Gegensatz zur äußeren für Saccharose nicht passierbar und verhält sich infolgedessen wie ein Osmometer. Durch den osmotischen Druck wird Wasser aus dem Matrixvolumen in den Intermembranraum abgegeben. Dies hat zur Folge, dass sich das Matrixvolumen verringert und dichter wirkt und folglich das Volumen von Intermembranraum bzw. Cristae durch die Wasseraufnahme zunimmt. Mitochondrien, die verschiedenen hohen Konzentrationen von Saccharose ausgesetzt wurden, unterscheiden sich folglich in ihrer Form von Cristae- und Matrixkompartimenten. Die tunnelartigen Cristaekompartimente, die bei den Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben werden konnten, unterscheiden sich stark von der Cristae-Form der Mitochondrien von *Neurospora crassa*. Anders als beim dreidimensionalen Cristae Netzwerk der Mitochondrien von *N. crassa* werden bei *S. cerevisiae* kaum Cristae junctions gefunden. Durch das Fehlen dieser Junctions bildet sich eine große, weitläufige mitochondriale Matrix, mit einem einheitlichen Abstand zur äußeren Membran, in der mehrere verschieden große Teilstücke der inneren Membran ein tunnelartiges Gebilde formen. Die weitläufige Matrix wirkt

weniger dicht und erlaubt dem Betrachter Ribosomen und ATP-Synthasen sehr gut zu erkennen. Diese Heterogenitäten spiegeln sehr gut wieder, wie stark sich die Mitochondrien verschiedener Spezies unterscheiden. Grund hierfür könnten auch verschieden stark favorisierte Stoffwechselwege sein.

4.2 Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien

4.2.1 Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien von *Neurospora crassa*

Die Lokalisierung der mitochondrialen Ribosomen mit kreuzkorrelationsbasierten Template-matching war durch die sehr dichte mitochondriale Matrix der *Neurospora crassa* Mitochondrien nicht möglich. Das manuelle Erfassen der Position der Ribosomen im Mitochondrium hatte zur Folge, dass lediglich die Koordinaten, nicht aber deren Winkel und Ausrichtung, bei der Rekonstruktion der Subtomogramme berücksichtigt wurden. Die Alignierung erfolgte somit über globale Winkelabtastung.

Das Ribosom bildet im Mitochondrium den einzigen Komplex dieser Größenordnung und lässt damit ausschließen, dass es sich bei den gewählten Partikeln um einen anderen Komplex handelt. Durch die geringe Anzahl (68) an rekonstruierten Subtomogrammen und das geringe SNR, lassen sich keine detaillierteren Erkenntnisse über strukturelle Aspekte des mitochondrialen Ribosoms von *Neurospora crassa* erfassen. Auffällig ist jedoch das Fehlen der kleinen ribosomalen Untereinheit. Dies lässt vermuten, dass die Translationsrate für mitochondrial kodierte Proteine in *Neurospora crassa* geringer ist als angenommen. Vor dem Start der Translation liegen die kleine und große ribosomale Untereinheit dissoziiert vor. Erst nach Verlassen eines Initiationsfaktor (IF), der das vorzeitige Zusammenlagern verhindert, kann die große Untereinheit assoziieren und die Translation beginnen. Eine andere Möglichkeit für das Fehlen der kleinen ribosomalen Untereinheit ist eine potentielle Fehlalignierung der einzelnen Partikel aufgrund des niedrige SNRs.

Durch die Visualisierung der Position und Orientierung der Ribosomen im Mitochondrium mit der Software Amira konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der erfassten Ribosomen in Membrannähe zu finden sind und nur wenige Ribosomen

frei in der mitochondrialen Matrix vorliegen. Dies bekräftigt die Vermutung, dass viele mitochondriale Ribosomen membranassoziiert sind. Für die Bestätigung dieser Hypothese müsste eine Klassifizierung mit einer größeren Anzahl an Ribosomen durchgeführt werden. Durch die Bildung einer Klasse mit dem Ribosom, gebunden an einen Membranabschnitt und einer Klasse in der das Ribosom frei vorliegt, könnten weitere Aufschlüsse über die prozentuale Verteilung zwischen gebundenen und ungebundenen Ribosomen gegeben werden. Die Lokalisierung von lediglich 20 Ribosomen pro Mitochondrium zeigt, dass für die Translation der wenigen, im Mitochondrium kodierten Proteine nur eine geringe Anzahl an Ribosomen notwendig ist. In *Neurospora crassa* sind 9 Proteine mitochondrial kodiert. Drei (von sieben) Untereinheiten des Cytochrome C Oxidase Komplex¹, vier (von neun) Untereinheiten der ATP-Synthase, eine (von neun) Untereinheiten des Cytochrome C Reductase Komplex² sowie eine (von 22) Untereinheiten der kleinen ribosomalen Untereinheit [Borst, 1977].

Bei der Alignierung von Subtomogrammen der 41 Membranabschnitte mit dem Winkelinkrement von etwa 30°, konnte trotz der vermeintlich erkennbaren Homogenität kein aufschlussreiches Ergebnis erreicht werden. Der weniger deutliche innere Schenkel des Winkels, der in die mitochondriale Matrix hinein reicht und der verwaschene Membranabschnitt der Junction, der nicht an der Bildung des Winkels beteiligt ist, lässt vermuten, dass diese Winkel doch deutlich unterscheiden und deshalb nicht der gleiche Referenz zugeordnet werden können. Eine genauere Untersuchung möglicher Proteinkomplexe im Inneren des Winkels oder in den Cristae Junctions hätte eine sehr viel größere Anzahl an Mitochondrien bedarft und wäre über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgegangen.

4.2.2 Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae*

Im Vergleich zu den Mitochondrien von *Neurospora crassa* hat sich gezeigt, dass die Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* für die kryoelektronentomographische Analyse makromolekularer Komplexe besser geeignet ist. Durch den wesentlich besseren Kontrast konnten die Ribosomen in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* mittels Kreuzkorrelation zu mitochondrialen Ribosomen von *Leishmania tarentolae* selektiert werden. Die Mittelung der 71 rekonstruierten Subtomogramme lieferte eine aufschlussreiche Elektronendichte, die deutlich große und kleine ribosomale

Untereinheiten erkennen lässt. Die erhaltene Elektronendichte zeigt auf den ersten Blick eine große Ähnlichkeit zu der Referenzstruktur des mitochondrialen Ribosoms von *Leishmania tarentolae*, wobei im Detail merklich Unterschiede zu erkennen sind. Dies bestätigt die Annahme, dass mitochondriale Ribosomen verschiedener Spezies sich im Detail unterscheiden können, ihr grober Aufbau jedoch dem 70S Typ der Prokaryoten zu Grunde liegt. Die Verschlechterung der experimentellen Struktur des mitochondrialen Ribosoms nach Alignierung und Mittelung mittels lokalem Winkel Sampling lässt eine Fehlalignierung vermuten.

Durch Segmentierung der inneren und äußeren Membran mitochondrialer Ribosomen und der FoF₁-ATP-Synthasen, konnte eine ‚Landkarte‘ des Mitochondriums von *S. cerevisiae* erstellt werden, die Aufschluss über Position und Ausrichtung dieser Komplexe im Mitochondrium gibt. Die Anzahl von etwa 10-20 detektierten Ribosomen pro Mitochondrium ist vergleichbar mit dem Ergebnis der Mitochondrien von *Neurospora crassa* und bestätigt die Hypothese, dass für die Translation mitochondrial kodierter Proteine eine geringe Anzahl an mitochondrialen Ribosomen ausreicht. Die Position der lokalisierten Ribosomen lässt auch hier vermuten, dass ein Teil membranassoziiert vorliegt und ein anderer Teil frei in der mitochondrialen Matrix zu finden ist.

Die Größe des F₁-Faktors der ATP-Synthasen von 20nm und einem Durchmesser von 10 nm an der Kopfregion, sowie deren Position, Ausrichtung und deren Abstand zueinander, bestätigten die Ergebnisse von früheren Studien [Davies et al., 2011].

Abschließend kann gesagt werden, dass die Dichte der mitochondrialen Matrix für die strukturelle Charakterisierung von Komplexen entscheidend ist. Diese scheint für verschiedene Organismen deutlich zu variieren. Die Mitochondrien von *S. cerevisiae* haben sich als besonders geeignet erwiesen und könnten einen guten Ausgangspunkt für weitere Studien bilden.

Literaturverzeichnis

- [Blanchard et al., 2004] Blanchard, S. C., Kim, H. D., Gonzalez, R. L., Puglisi, J. D., und Chu, S. (2004). tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35):12893–8.
- [Borst, 1977] Borst, P. (1977). Structure and function of mitochondrial DNA. *Trends in Biochemical Sciences*, (February):22–25.
- [Davies et al., 2011] Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., Zickermann, V., und Kühlbrandt, W. (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34):14121–6.
- [Förster et al., 2008] Förster, F., Pruggnaller, S., Seybert, A., und Frangakis, A. S. (2008). Classification of cryo-electron sub-tomograms using constrained correlation. *Journal of structural biology*, 161(3):276–86.
- [Frangakis et al., 2002] Frangakis, A. S., Böhm, J., Förster, F., Nickell, S., Nicastro, D., Typke, D., Hegerl, R., und Baumeister, W. (2002). Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22):14153–8.
- [Frank, 1998] Frank, J. (1998). The ribosome-structure and functional ligand-binding experiments using cryo-electron microscopy. *Journal of structural biology*, 124(2-3):142–50.
- [Frey und Mannella, 2000] Frey, T. G. und Mannella, C. a. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences*, 25(7):319–24.

- [Herrmann, 2011] Herrmann, J. M. (2011). MINOS is plus: a Mitofilin complex for mitochondrial membrane contacts. *Developmental cell*, 21(4):599–600.
- [Hrabe et al., 2011] Hrabe, T., Planck, M., und Fo, F. (2011). Structure Determination by Single Particle Tomography. pages 1–11.
- [Kitakawa und Isono, 1991] Kitakawa, M. und Isono, K. (1991). The mitochondrial ribosomes. *Biochimie*, 73(6):813–25.
- [Loeffler et al., 2006] Loeffler, Petrides, und Heinrich (2006). *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin Heidelberg, 8. edition.
- [Lucić et al., 2012] Lucić, V., Baumeister, W., und Förster, F. (2012). Studying the macromolecular machinery of cells in situ by cryo-electron tomography. *Comprehensive Biophysics (2012)*.
- [Lucić et al., 2005] Lucić, V., Förster, F., und Baumeister, W. (2005). Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annual review of biochemistry*, 74:833–65.
- [Nicastro et al., 2000] Nicastro, D., Frangakis, a. S., Typke, D., und Baumeister, W. (2000). Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria. *Journal of structural biology*, 129(1):48–56.
- [Nickell et al., 2005] Nickell, S., Förster, F., Linaroudis, A., Net, W. D., Beck, F., Hegerl, R., Baumeister, W., und Plitzko, J. M. (2005). TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography. *Journal of structural biology*, 149(3):227–34.
- [Sharma et al., 2009] Sharma, M. R., Booth, T. M., Simpson, L., Maslov, D. a., und Agrawal, R. K. (2009). Structure of a mitochondrial ribosome with minimal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(24):9637–42.
- [von der Malsburg et al., 2011] von der Malsburg, K., Müller, J. M., Bohnert, M., Oeljeklaus, S., Kwiatkowska, P., Becker, T., Loniewska-Lwowska, A., Wiese, S., Rao, S., Milenkovic, D., Hutu, D. P., Zerbes, R. M., Schulze-Specking, A., Meyer, H. E., Martinou, J.-C., Rospert, S., Rehling, P., Meisinger, C., Veenhuis, M., Warscheid, B., van der Klei, I. J., Pfanner, N., Chacinska, A., und van der Laan,

M. (2011). Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Developmental cell*, 21(4):694–707.

Abkürzungsverzeichnis

ATP Adenosintriphosphat

mtDNA mitochondriale DNA

mRNA messenger RNA

tRNA Transfer-RNA

rRNA ribosomale RNA

IF Initiationsfaktor

KET Kryoelektronentomographie

FEG Field Emission Gun

KTF Kontrasttransferfunktion

SNR Signal Rausch Verhältnis, (*Signal to Noise Ratio*)

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau der FoF₁-ATP-Synthase: Der Komplex besteht aus insgesamt 16 Untereinheiten. Die Untereinheit <i>a</i> und 10 Kopien der Untereinheit <i>c</i> bilden den Fo-Teil der ATP-Synthase. Der F ₁ -Teil besteht aus einem Hexamer aus drei α - und drei β -Untereinheiten (eine α - und eine β -Untereinheit sind nicht gezeigt) sowie der δ -Untereinheit und zwei <i>b</i> -Untereinheiten, welche den peripheren Stiel bilden [Loeffler et al., 2006, S. 500ff.]. (Abbildung aus [Loeffler et al., 2006])	6
1.2	Mitochondrien-Modell nach Palade (A) und Sjöstrand (B): Das Baffle Modell (A) zeigt die stark gefaltete innere Membran mit Einstülpungen ins Innere des Mitochondrium und weiten Öffnungen zum Intermembranraum. Das Sjöstrand-Modell (B) verdeutlicht, wie die Cristae eigene Kompartimente bilden und mit der inneren Membran über tubuläre Verbindungen (Cristae Junctions) verknüpft sind. C, Cristae; IM, Innere Membran; OM, Äußere Membran; Pfeile zeigen auf die tubulären Verbindungen, die sie mit der inneren Membran verknüpft.(Abbildung aus [Frey und Mannella, 2000])	7
1.3	Morphologie der Mitochondrien von <i>Neurospora crassa</i>: Die Cristea bilden ein dreidimensionales stark verzweigtes Netzwerk das über Cristae Junctions mit der inneren Membran verknüpft ist. (A) Zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondrium von <i>Neurospora crassa</i> . C, Cristae; CJ, Cristae Junctions; IM, Innere Membran; OM, Äußere Membran. (B) Zeigt die Segmentierung der inneren und äußeren Membran einer dreidimensionalen Rekonstruktion einer Kippserie. (Abbildung aus [Nicastro et al., 2000])	8

1.4	Strukturbildung der Cristae Junctions durch den MINOS-Komplex (mitochondrial inner membrane organizing system): Die in rot gezeigten Untereinheiten Mitofilin/Fcj1 und Mio10 bilden mit den anderen (grün gezeigten) Untereinheiten einen Proteinkomplex, der für die Bildung der Kontaktstellen von Cristae Junctions mit der inneren Membran verantwortlich ist. (Abbildung aus [Herrmann, 2011])	9
1.5	Der grundlegende Prozess der Proteinbiosynthese am 70s Ribosom von <i>Escherichia coli</i>: Gezeigt sind die drei tRNA-Bindungsstellen (A-, P- und E-Seite) des 70s Ribosoms zwischen großer und kleiner Untereinheit. Es ist schematisch gezeigt, wie die mRNA in der kleinen ribosomalen Untereinheit gebunden und decodiert wird. Das Peptidyltransferase Zentrum, in dem die Peptidbindung geknüpft wird, befindet sich in der großen Untereinheit. (Abbildung aus [Blanchard et al., 2004])	10
1.6	Bereiche fehlender Information („missing-wedge“): Durch den unzugänglichen Winkelbereich außerhalb von -60° und $+60^\circ$ entsteht bei der dreidimensionalen Rekonstruktion ein Keilförmiger Bereich fehlender Information. (A) veranschaulicht den „missing-wedge“-Effect bei einer Kippserie um eine Achse. Dieser keilförmige Bereich fehlender Information kann durch eine doppelte Kippserie entlang senkrecht aufeinander stehender Achsen (B) reduziert werden. (Abbildung aus [Lucić et al., 2005])	14
3.1	Ergebnis der dreidimensional rekonstruierten Volumen der Mitochondrien von <i>Neurospora crassa</i>: Gezeigt ist ein Schnitt durch die xy-Ebene von drei rekonstruierten Tomogrammen (A, B und C). Der Durchmesser der Mitochondrien schwankt von ca. $0,5\mu\text{m}$ (Tomogramm A) bis $1,5\mu\text{m}$ (Tomogramm C). Ebenfalls ist zu erkennen, dass die Form der Cristae variiert. In Tomogramm A sind große Cristaekompartimente zu sehen, die von kleinen Matrixkompartimenten unterteilt werden, wohingegen Tomogramm C sehr eng verlaufende Cristae zeigt, die einen einheitlichen Membranabstand aufweisen und die weitläufige Matrix in große Kompartimente unterteilen.	20

3.2	<p>Ergebnis des dreidimensional rekonstruierten Volumen der Kippserien eines <i>Neurospora crassa</i> Mitochondrium mit anschließender Segmentierung der inneren und äußeren Membran:(A) Zeigt den Schnitt durch die xy-Ebene des rekonstruierten Tomogramms. Es ist sehr gut zu erkennen, wie sich durch die Cristaeinstülpungen mehrere Matrixkompartimente bilden, die in ihrer Größe variieren. Trotz der hohen Matrixdichte sind Ribosomen (R) zu erkennen. In (B) wurden die innere und äußere mitochondriale Membran mit der Software Amira (Version 5.4.0; Visage Imaging, San Diego) segmentiert und damit das stark verzweigte Cristae-Netzwerk und die Abstände zwischen innerer (blau) und äußerer Membran (gelb) visualisiert.</p>	21
3.3	<p>Ergebnis der dreidimensional rekonstruierten Volumen der Mitochondrien von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: Der Kontrast der erhaltenen Tomogramme ist wesentlich höher und lässt bereits mit dem Auge Strukturen von Ribosomen (R) und ATP-Synthasen (A) erkennen. In der einheitlichen mitochondrialen Matrix mit einem homogenen Abstand zwischen innerer und äußerer Membran bilden sich mehrere kleine Christaekompartimente. An der Membran dieser Kompartimente lassen sich die Köpfe der ATP-Synthase (A) erkennen, die in die Matrix hineinreichen. In der weniger diffusen Matrix können Ribosomen (R) mit einer deutlich höheren Dichte wahrgenommen werden.</p>	22
3.4	<p>Experimentelle Struktur des mitochondrialen Ribosoms von <i>Neurospora crassa</i>: Abbildung (A) zeigt in grau die erhaltene Elektronendichte des mitochondrialen Ribosoms von <i>Neurospora crassa</i> nach Alignierung und Mittelung von 68 einfach gebinteten Subtomogrammen, subjektiv auf eine Auflösung von 60Å gefiltert. In Abbildung (B) wurde zur Visualisierung der Unterschiede zur Startreferenz die Dichte des mitochondrialen Ribosoms von <i>Leishmania tarentolae</i> in gelb eingebettet. SSU (small subunit) kleine ribosomale Untereinheit; LSU (large subunit) große ribosomale Untereinheit</p>	23

3.5	<p>Dreidimensionale Segmentierung der inneren und äußeren Membran, sowie der Ribosomen im Mitochondrium von <i>Neurospora crassa</i>: Gezeigt ist die äußere Membran in gelb, die innere Membran in hellblau und mitochondriale Ribosomen in dunkelblau. Ein Großteil der identifizierten Ribosomen befindet sich in der Nähe zur inneren Membran. Insgesamt konnten in diesem Tomogram etwa 20 mitochondriale Ribosomen lokalisiert werden . . .</p>	24
3.6	<p>Position der charakteristischen 30° Winkel in den Tomogrammen von <i>Neurospora crassa</i> Mitochondrien: Die gewählten Positionen für die anschließende Rekonstruktion der Subtomogramme wurden beispielhaft in den xy-Ebenen von zwei verschiedenen Tomogrammen (A) in rot markiert. Abbildung (B) zeigt den Schnitt durch die xy-Ebene der erhaltenen Elektronendichte, nach Alignierung und Mittelung der 41 Subtomogramme. Die Pfeile markieren die gut definierte äußere Membran und den Winkel, der durch die zwei Membranabschnitte der Innere Membran gebildet wird. Der schlecht definierte, verwaschene Membranabschnitt der Junction wurde rot umrandet dargestellt.</p>	25
3.7	<p>Experimentelle Struktur des mitochondrialen Ribosoms von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: Abbildung (A) zeigt in grau die erhaltene, subjektiv auf eine Auflösung von 60Å gefilterte, Elektronendichte des mitochondrialen Ribosoms von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nach Mittelung der Subtomogramme. In Abbildung (B) wurde zur Visualisierung der Unterschiede die Dichte des mitochondrialen Ribosoms von <i>Leishmania tarentolae</i> in gelb eingebettet. In (C) und (D) wurde die Elektronendichte jeweils um 90° gedreht.) SSU (small subunit) kleine ribosomale Untereinheit; LSU (large subunit) große ribosomale Untereinheit</p>	26

- 3.8 **Segmentiertes Mitochondrium von *Saccharomyces cerevisiae* nach dreidimensionaler Rekonstruktion der Kippserie:** Gezeigt ist das segmentierte Mitochondrium aus verschiedenen Blickwinkeln. Durch die Segmentierung wird eine „Landkarte“ mit Position und Ausrichtung der Ribosomen und ATP-Synthasen erzeugt. gelb: Äußere Membran, blau: Innere Membran, beige: mitochondriale Ribosomen, rot: F₁-Faktoren der ATP-Synthasen; 27
- 3.9 **Detaillierter Einblick auf Position und Ausrichtung der FoF₁-ATP-Synthasen:** Im Tomogramm lassen sich die ATP-Synthasen sehr einfach mit dem Auge lokalisieren. Durch Segmentierung und Vergrößerung des Ausschnitts kann die genaue Ausrichtung gut visualisiert werden. Die ATP-Synthasen sitzen in einem einheitlichen Abstand in der inneren Mitochondrienmembran. Die innere mitochondriale Membran ist in blau dargestellt, der F₁-Faktor in rot. 28

Tabellenverzeichnis

2.1	ST/SET-Puffer	15
2.2	MP1/MP2-Puffer	15
2.3	Homogenisierungspuffer und SEH-Puffer	16

Danksagung

Diese Bachelorarbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Förster in der Abteilung Molekulare Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Ich möchte hiermit allen Mitarbeitern dieser Abteilung für die angenehme und produktive Arbeitsumgebung und Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt:

Friedrich Förster, der mir die Chance gegeben hat an diesem Projekt zu arbeiten und mir fortwährend mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dr. Frank Rosenau, der sich bereitwillig als Gutachter der Universität Ulm zur Verfügung gestellt hat.

Stefan Pfeffer für die nette Betreuung und Hilfe bei jeglicher Fragestellung bezüglich KET und deren Auswertung.

Thomas Hrabe und Yuxiang Chen für die Hilfestellung bei der Datenprozessierung.
Prof. Dr. Walter Neupert und Astrid Klein für die Aufreinigung der *Neurospora crassa* Mitochondrien.

Michael Wöllhaf (Technische Universität Kaiserslautern, Abteilung für Zellbiologie) für die Aufreinigung der *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrien.

Erklärung:

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

Kryoelektronentomographische Analyse makromolekularer Komplexe in Mitochondrien

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Satzung der Universität Ulm zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ angefertigt habe.

Ulm, den _____

(Unterschrift)