

Diss. ETH Nr.7283.

HOCHAUFLÖSENDE ABBILDUNG
EINER PARAKRISTALLINEN PROTEIN-MEMBRAN-STRUKTUR
MITTELS GEFRIERTROCKNUNG UND SCHWERMETALLBESCHATTUNG

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Ivo Wildhaber
dipl. Natw. ETH
geboren am 4. Juni 1955
von Flums SG

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. Moor, Referent
PD Dr. W. Baumeister, Korreferent
Dr. H. Gross, Korreferent

1983

ZUSAMMENFASSUNG

Der sogenannte HPI-Layer, eine periodische Zellwandstruktur des strahlenresistenten Bakteriums *Micrococcus radiodurans* (*Deinococcus rad.*), wurde als Testobjekt für methodische Untersuchungen in der Elektronenmikroskopie (Entwässerung, Reliefabbildung mittels Schwermetallbeschattung) verwendet. Gleichzeitig konnten mit der erarbeiteten, verbesserten Präparationstechnik neue Erkenntnisse über den molekularen Aufbau des HPI-Layers gewonnen werden. Das regelmässige Proteingitter erlaubt eine Mittelung der Bilder mit Bildverarbeitungsmethoden und ermöglicht damit objektive Aussagen über Strukturhaltung und Auflösungsvermögen.

Mittels Entwässerungsexperimenten wurde ein Vergleich zwischen Luft- und Gefriertrocknung ermöglicht: Nach Lufttrocknung konnte im besten Fall eine Auflösung von 4nm, mit Gefriertrocknung 2nm erreicht werden. Die Gefriertrocknung, mit der feinere Strukturdetails präservierbar sind, wurde bezüglich ihres Verlaufs, ihres Endpunkts und des Restwassers in der Probe genauer untersucht. Dazu wurde das Probenwasser durch schweres Wasser (D_2O) ersetzt und so die Beobachtung des Sublimationsverlaufs mit Hilfe eines Massenspektrometers ermöglicht.

Die beiden Beschattungsmaterialien Pt/C und Ta/W wurden miteinander verglichen und ihr potentiellles Auflösungsvermögen quantifiziert: Speziell untersucht wurden der Einfluss der Aufdampfmenge, des Elevationswinkels, der Objekttemperatur sowie Vor- und Nachteile der einseitigen und der Rotationsbeschattung. Für Informationen in lateraler Ausdehnung wurde bevorzugt die Rotations- und für zusätzliche Auskunft in der dritten Dimension einseitige Beschattung eingesetzt. Ta/W ist auf Grund seines feineren

Korns Pt/C für Oberflächenabbildung überlegen. Beste Ergebnisse zeitigte das unidirektionelle Aufdampfen einer im Durchschnitt 0,5nm dicken Metallschicht unter einem Elevationswinkel von 45° bei sehr tiefer Objekttemperatur (-265°C). Damit konnten (nach Mittelung) Details bis hinunter zur Korngrösse des Aufdampfmaterials (ca. 2nm) dargestellt werden.

Auf Grund der Bedampfungsdaten konnten drei identische Untereinheiten pro Einheitszelle der HPI-Struktur ermittelt werden. Durch Kombinieren der unterschiedlichen Daten beider Oberflächen des HPI-Layers konnte ausserdem ein dreidimensionales Modell hergestellt werden, das mit bereits bekannten Daten gut vergleichbar ist.

ABSTRACT

The HPI-layer, a periodic cell wall structure of the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans* (*Deinococcus rad.*) was used as a test object for studies in electron microscopy (dehydration and relief representation using heavy metal shadowing). At the same time using these designed and improved preparation methods new information regarding the molecular composition of the HPI-layer was obtained. The repeating protein lattice allows objective statements to be made regarding structure maintenance and attainable resolution.

Dehydration experiments allowed a comparison between air- and freeze-dried preparations. Following air-drying a resolution of 4nm in the best cases was obtained whereas with freeze-drying 2nm was possible. The freeze-drying process (whereby the finer structural details were preserved) was studied with regards to the course of drying, the endpoint and the water remaining in the sample. For this the samples' water was replaced by heavy water (D_2O) thus enabling the course of sublimation to be followed with a mass spectrometer.

Two shadowing materials Pt/C and Ta/W were compared with one another and their potential resolution quantified: In particular the effects of amount of shadowing material, the elevation angle and the advantages and disadvantages of unidirectional or rotational shadowing were studied. Rotational shadowing was preferred in order to obtain information on the lateral dimension while unidirectional shadowing was used to obtain additional information in the third dimension. Due to its finer grain Ta/W is superior to Pt/C for surface representation. The best results were obtained using unidirectional shadowing of 0.5nm average

thickness of metal at an angle of 45° at extremely low object temperature (-265°C). By this means even details down to the grain size of the shadowing material (ca. 2nm) could be visualised (after averaging).

Due to the data obtained using the shadowing technique three identical subunits per unit cell were obtained for the HPI-layer. A three dimensional model was produced by combining the data obtained on both surfaces of the HPI-layer. This model compares well with other data obtained so far.