

Diss. ETH Nr. 8053.

HOCHAUFLOESENDE ABBILDUNG
VON BIOLOGISCHEN BRUCH- UND OBERFLAECHE
MITTELS KRYOPRAEPARATION UND KORNLOSER BESCHATTUNG


ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von
THEODOR MUELLER
dipl. Natw. ETH
geboren am 20. Juni 1950
von Waldkirch SG

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. Moor, Referent
Prof. Dr. L. Bachmann, Korreferent
Dr. H. Gross, Korreferent

1986



Zusammenfassung

In der Präparationstechnik für die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie werden dünne Schwermetallfilme zur Kontrastierung von Bruch- und Oberflächen biologischer Objekte verwendet. Das strukturelle Auflösungsvermögen dünnster Beschattungsschichten ist durch Körnigkeit des Bedampfungsmaterials limitiert und die Interpretation wird zusätzlich durch Dekorationsphänomene erschwert. Wege, die zur Erzeugung kornloser Beschattungsschichten führen, sind deshalb von allgemeinem Interesse:

1. Die Beschattung mit reiner Kohle bei 193 K

Für die Untersuchung des Kondensationsverhaltens von reiner Kohle auf biologischen Oberflächen verwendeten wir als Testobjekte eine flache Plasmamembran mit grossem Protein/Lipid-Verhältnis (Purpormembran von *Halobacterium halobium*) und einen reich strukturierten zweidimensionalen Proteinkristall (HPI-Layer von *Deinococcus radiodurans*). Diese periodischen Objekte erlauben ein einfaches Mitteln durch digitale Bildverarbeitung und damit ein objektives Vergleichen von Bedampfungsergebnissen. Die Beschattungsschicht aus reiner Kohle ist ohne zusätzliche Verstärkung im TEM stabil und erlaubt bei genügendem Kontrast ein routinemässiges Arbeiten im Hellfeld; sie weist keine Eigenstruktur auf, welche bei der Abbildung von Details ≥ 1 nm auflösungslimitierend wäre. Eine spezielle Eigenschaft der Kohle, das partielle Reflexionsverhalten, bewirkt eine Umhüllung von Reliefstrukturen und erlaubt somit eine Art "Negativkontrastierung" nach Gefriertrocknung.

2. Die Pt/C-Beschattung bei 13 K

Bei einer Objekttemperatur von 13 K resultiert schon bei einer Schichtdicke von 1 nm Pt/C ein zusammenhängender Beschattungsfilm. Die Anwendung dieser Beschattung in der Tieftemperatur-Gefrierätzung wurde durch die Konstruktion eines Doppelabdrucktisches mit verbessertem thermischem Kontakt zu den Objekten ermöglicht. Der Einbau eines "Shroud-Systems" in die UHV-Gefrierätzanlage (Prototyp zur BAF

500 K) erlaubt ausserdem das Gefrierbrechen bei höherer Temperatur und danach das Abkühlen der Objekte auf 13 K ohne sichtbare Kondensation aus der Restgasatmosphäre. Mithilfe eines wasserfreien Testobjekts. (Stearinsäurekristalle) wurde das Kondensations- bzw. das Evaporationsverhalten des Wassers in Abhängigkeit von der Objekttemperatur untersucht. Durch simultanes Aufbrechen von Stearinsäurekristallen und Hefe- oder Liposomenpräparaten konnten die wasserhaltigen Objekte als H₂O-Kontaminationsquellen beim Gefrierbrechen und Aetzen nachgewiesen werden. Die Beschattung bei 13 K erlaubte die Abbildung von einzelnen Transmembranproteinen auf den Membranspaltflächen von Liposomen und das Erstellen eines verbesserten Modells der parakristallinen Bereiche des Hefeplasmalemmas (*Saccharomyces cerevisiae*).

Abstract

In transmission electron microscopy, thin heavy metal films are widely used for contrasting biological freeze-fracture faces and freeze-dried surfaces. The resolution power of such films is limited by their granularity; in addition, the decoration behaviour of these grains may obscure the relief structure which leads to interpretation problems. Therefore, in order to produce grainless shadowing films two approaches have been made:

1. Shadowing with pure carbon at 193 K:

In order to investigate the condensation behaviour of pure carbon evaporated onto biological surfaces, we chose the purple membrane of *Halobacterium halobium* and the HPI-layer of *Deinococcus radiodurans* as test specimens. These periodic objects allow an objective comparison of shadowing data with the help of digital image averaging. Part of the evaporated carbon (about 10%) does not condense directly, but is reflected and finally coats the exposed surfaces independent from the shadowing direction. This leads to an additional uniform covering of an object and improves the stability of the shadowing layer. The result is a 2 nm carbon film, which is stable in the microscope and produces sufficient contrast for routine work under bright field conditions. The resolution power of such a shadowing with pure carbon does not depend from its granularity but mainly from the film thickness.

2. Pt/C-shadowing at 13 K

At a specimen temperature of 13 K a Pt/C film, with an average thickness of 1 nm is more or less continuous. The application of such low temperature shadowing in freeze-etching was enabled by the construction of a double replica device with improved thermal contact mechanisms. In addition, a "shroud-system" built in the UHV freeze-etch apparatus (prototype of BAF 500 K) enabled us to carry out freeze-fracturing at higher temperatures and afterwards to cool the fractured specimen down to 13 K without visible condensation of

residual gases of the vacuum. By the use of a water-free test specimen (stearic acid crystals) we have investigated the condensation and evaporation behaviour of water as a function of the specimen temperature. By simultaneous fracturing of stearic acid crystals and ice containing specimens (yeast cells), we demonstrated that aqueous objects may act as H₂O vapour sources during the fracturing process.

The low temperature shadowing enabled the visualisation of single 4 nm transmembrane proteins on the fracture faces of liposome membranes, and a portrayal of the paracrystalline regions of the yeast plasmalemma (*Saccharomyces cerevisiae*) with improved resolution.