

Diss. ETH No. 9920

**Surface imaging of protein complexes with high resolution  
coating, TEM, SEM and STM techniques**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by:

Roger Albert Wepf  
dipl. sc. ETH  
born on the 28. September 1962  
citizen of Müllheim (TG)

accepted on the recommendation of:

Examiner:  
Co-examiner:

Prof. Dr. H. Moor  
Prof. Dr. U. Aebi  
Dr. H. Gross  
1992



## Summary

Electron Microscopy (TEM & SEM), including atomic probe microscopy (e.g. STM), are the only imaging techniques that have the potential to directly image the topography of single non-crystalline macromolecular structures. Benefit from this potential can only be taken, if the three-dimensional structure and arrangement of the macromolecules are preserved close to their native state until imaging. The required preparation steps for surface relief imaging, especially the surface contrasting by metal coating for the different imaging modes, and the preservation of the coated specimen until imaging have been investigated. To test the potential of topographic imaging methods and their extractable informations on protein interactions, two-dimensional protein crystals such as *T4 type III polyheads* and *HPI-layers from Deinococcus radiodurans*, and *tobacco mosaic viruses (TMV)*, were used as test specimens. *F-actin* was chosen for a first biological application of the improved coating and imaging technique.

Adequate structural preservation is achieved by freeze-drying the immobilized, and rapidly frozen macromolecular structures prior to coating. Metal coated samples are commonly stabilized with an additional carbon layer to maintain their 3-D shape and fine granular structure when exposed to atmospheric conditions during transfer. Such a carbon layer blurs fine surface structures when investigated with an SEM, or with a STM and even in a TEM. A HV cryo-transfer ( $p \leq 10^{-6}$  mbar and  $T = 193$  K) allows to transfer the coated sample from the preparation chamber into the cryo-TEM without exceeding the temperature reached during freeze-drying (193 K). Such a transfer preserves the structure and the coating film until imaging at low temperature without the need of an additional carbon layer. Similar preservation of coated structures could be obtained with a transfer under liquid nitrogen. For adequate imaging of freeze-dried and coated specimens imaging at low dose condition is required.

The use of thin Pt/Ir/C, Ta/W or W films in combination with a high elevation angle ( $65^\circ$ ) for rotary shadowing improved the resolution in TEM. The grain size and shape of Pt/Ir/C and Ta/W films determined with a dedicated STEM revealed a grain structure which is less expanded in height (1-1.5 nm) than in the lateral dimensions (1.5-3 nm). These findings and a weak contrast in perpendicularly coated specimens were used to postulate a new coating and contrast model for TEM.

1 nm W films, exhibiting the finest grains of the coating material have been applied for SEM. They improved the resolution on coated biological macromolecular structures down to 2 nm if an "in-lens" type of FESEM is used. The high S/N ratio found in SE-images of W coated specimens, e.g. the direct visibility of the TMV helix (2.3 nm), has shown that FESEM is a powerful tool for macromolecular structure research. Similar results can be obtained either by Planar Magnetron Sputtering or High Angle Rotary Shadowing of W.

Improved reproducibility for STM measurements under atmospheric conditions have been obtained by coating the surface with a Pt/Ir/C film. WDX-measurments for quantification of the composition of Pt/Ir/C films in parallel with TEM experiments on freeze-dried and coated structures have shown, that best structural preservation can only be achieved with a Pt/Ir/C film containing at least 25% carbon.

These improvements in coating and transfer techniques made direct imaging of single actin monomers and even of substructures of the monomer in the ATP-F-actin filament possible. STM and SEM have the potential to directly localize single actin binding proteins or complexes, such as the troponin complex, associated with the actin filament. With a correlative study of TEM, SEM and STM a 3-D map of actin binding proteins could be obtained.

## Zusammenfassung

Die Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskopie (TEM & REM), einschliesslich der Rastertunnelmikroskopie (RTM), sind die einzigen Abbildungstechniken, die es erlaubt nicht-kristalline makromolekulare Strukturen direkt abzubilden. Der Vorteil einer direkten Abbildung kann nur genutzt werden, wenn die dreidimensionale Struktur sowie die Anordnung der Makromoleküle zueinander bis bzw. während der Abbildung erhalten bleibt. Die notwendigen Präparationsschritte für die Oberflächenabbildung von biologischen makromolekularen Strukturen, im speziellen die Oberflächenkontrastierung durch Metallbeschichtung sowie die Strukturhaltung bis und mit der Abbildung, wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die topographischen Abbildungstechniken wurden mit Hilfe von zweidimensionalen Proteinkristallen, dem Polyhead des *T4 Typ III Phagen* und dem *HPI-layer von Deinococcus radiodurans*, sowie mit Hilfe des *Tabak Mosaik Virus (TMV)* getestet. Eine erste biologische Anwendung der verbesserten Beschichtungs- und Abbildungstechnik wurde auf *F-Aktin Filamenten* gezeigt.

Eine bestmögliche Strukturhaltung bzw. eine Freilegung der Moleküloberflächen für die Bedampfung mit Schwermetallen kann durch Gefriertrocknung rasch eingefrorener Strukturen erreicht werden. Metallbeschichtete Proben werden routinemässig mit einer zusätzlich aufgedampften Kohleschicht stabilisiert, um die dreidimensionale Struktur und den feinkörnigen Metallfilm vor Einflüssen der Atmosphäre während des Transfers zum Mikroskop zu schützen. Feine Reliefstrukturen werden durch einen zusätzlichen Kohlefilm bei der Abbildung im REM oder im RTM, sowie im TEM eingeebnet oder verschmiert dargestellt. Ein Transfer bei tiefer Temperatur unter Hochvacuumbedingungen ( $p \leq 10^{-6}$  mbar und  $T = 193$  K) ermöglicht es, metallbeschichtete Proben von der Präparationskammer in das Kryo-TEM zu transferieren ohne die Temperatur, die bei der Gefriertrocknung (193 K) erreicht wurde, zu überschreiten. Ein solcher Transfer erlaubt es zudem, die gefriergetrockneten Strukturen und den Beschattungsfilm ohne zusätzlichen Kohlefilm zu erhalten und vor äusseren Einflüssen zu schützen. Eine ähnlich gute Strukturhaltung kann mit einem Transfer unter flüssigem Stickstoff erreicht werden. Für eine bestmögliche Abbildung gefriergetrockneter und metallbeschichteter Proben ohne zusätzliche Kohlestabilisierung ist eine Abbildung unter minimaler Strahlbelastung notwendig.

Die Auflösung im TEM konnte durch die Verwendung dünner Pt/Ir/C, Ta/W- oder W-Filme in Kombination mit einer Rotationsbeschattung (Kegelbeschattung) unter hohem Beschattungswinkel ( $65^\circ$ ) verbessert werden. Grösse und Form der Körner von Pt/Ir/C- und Ta/W-Schichten wurden mit einem Rastertransmissionselektronenmikroskop (RTEM) bestimmt. Die Untersuchungen ergaben, dass die Höhe (1-1.5 nm) der Metallkörner kleiner ist als deren laterale Ausdehnung (1.5-3 nm). Dieses Ergebnis

und die Tatsache, dass senkrecht bedampfte Strukturen einen schwachen Relief-Kontrast ergaben, führten zu einem neuen Modell der Anlagerung der Metallkörner und des daraus resultierenden Kontrastes im TEM.

1 nm dicke W-Filme, das feinkörnigste bekannte Beschattungsmaterial, wurde in der REM angewendet. Die Auflösung auf W-beschichteten biologischen makromolekularen Strukturen konnte in einem "in-lens" Typ Feldemissions REM (FEREM) bis auf 2 nm verbessert werden. Eine direkte Sichtbarkeit der TMV-Helix (2.3 nm) zeigt das gute Signal-zu-Rausch Verhältnis in den REM Bildern W-beschichteter Proben. Dies zeigt deutlich, dass das FEREM ein ernst zu nehmendes Werkzeug für die makromolekulare Struktur-Aufklärung ist. Ähnlich gute W-Schichten konnten sowohl mit "Planar Magnetron Sputter" Beschichtung als auch mit Rotationsbeschattung unter hohem Beschattungswinkel erreicht werden.

Eine verbesserte Reproduzierbarkeit bei den RTM-Messungen an Atmosphäre konnte durch die Verwendung von Pt/Ir/C als Beschichtungsmaterial erreicht werden. Die Zusammensetzung der Pt/Ir/C-Filme wurde mit Hilfe von Wellenlängendispersiver Röntgen Analyse-Messungen (WDX) quantifiziert. Die WDX-Messungen und parallel dazu durchgeführte TEM Untersuchungen an gefriergetrockneten und Pt/Ir/C-beschichteten Proben ergaben, dass beste Strukturhaltung nur mit einem Kohleanteil von mindestens 25% C erreicht werden kann.

Die erzielten Verbesserungen in der Beschichtung- und Transfertechnik ermöglichten es, einzelne Aktinmonomere bzw. deren Unterstruktur in den ATP-F-Aktin Filamenten darzustellen. Das RTM und das REM erlauben es, Aktin bindende Proteine und deren Komplexe, wie z.B. der Troponin-Komplex, direkt am F-Aktin Filament zu lokalisieren. Eine korrelative Untersuchung mit dem TEM, REM und RTM könnte eine dreidimensionale Kartierung von an Aktin bindenden Proteinen ermöglichen.