

# **Strukturuntersuchungsmethoden in der Medizin: Spektroskopische und mikroskopische Methoden. Superresolutionsmikroskopie.**

**Balázs Kiss**

kissb3@gmail.com



**Myofilament-Mechanobiophysik Forschungsgruppe,  
Semmelweis Universität,  
Institut für Biophysik und Strahlenbiologie.**

*15. November 2023.*

# Strukturuntersuchungsmethoden in der medizinischen Forschung

## 1. Spektroskopische Verfahren

- a) Fluoreszenzspektroskopie
- b) Absorptionsspektroskopie (UV-VIS)
- c) Infrarotspektroskopie

## 2. Mikroskopie

- a) Lichtmikroskop
- b) Spezielle Lichtmikroskope (Stereo-, Polarisations-, Phasenkontrast-, Fluoreszenzmikroskop, CLSM)
- c) Superresolutionsmikroskope (SIM, STED)
- d) Elektronenmikroskope (TEM, SEM)
- e) Rastersondenmikroskope (AFM)

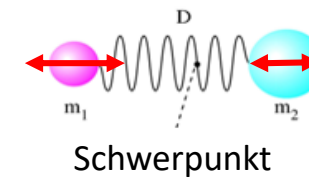
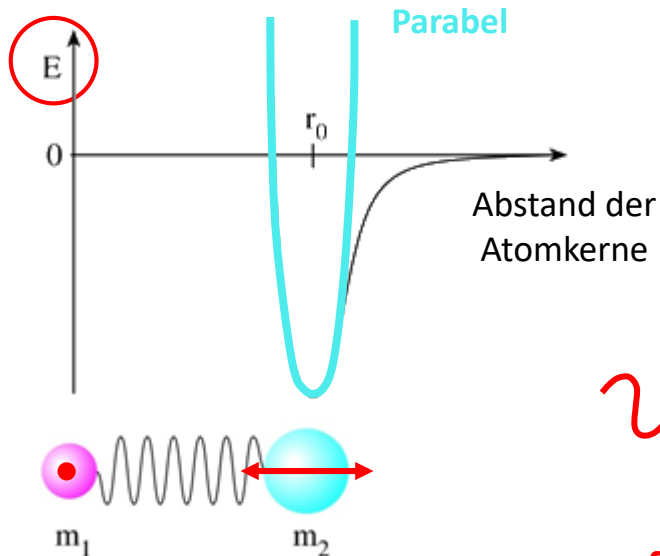
## 3. Diffraktionsmethoden

- a) Röntgendiffraktion
- b) Elektronendiffraktion
- c) Neutronendiffraktion

# Spektroskopische Verfahren

# Infrarotspektroskopie

- Infrarotes Licht (IR):  $\lambda = 800 \text{ nm} - 1000 \text{ }\mu\text{m}$  → Nahe IR (NIR oder IR-A): 800 nm – 2,5  $\mu\text{m}$   
 Mittleres IR (MIR oder IR-B): 2,5-50  $\mu\text{m}$
- Ein Typ der Absorptionsspektroskopie  
 Ferne IR (FIR oder IR-C): 50  $\mu\text{m}$  – 1000  $\mu\text{m}$
- IR-Lichtabsorption induziert **Molekülschwingungen** → **Molekülstruktur**



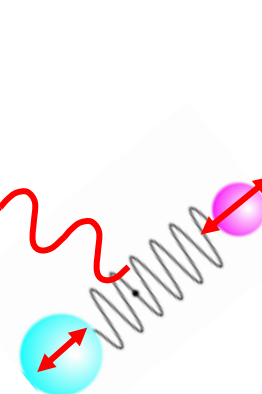
Eigenfrequenz  
der Schwingung:

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{red}}}$$

$$m_{red} = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

$$E_{Feder} = \frac{1}{2} D \cdot \Delta x^2 \quad \text{Parabel}$$

$f_{\text{Licht}} = c / \lambda$   
**Resonanz:  $f_{\text{Licht}} = f_0$**

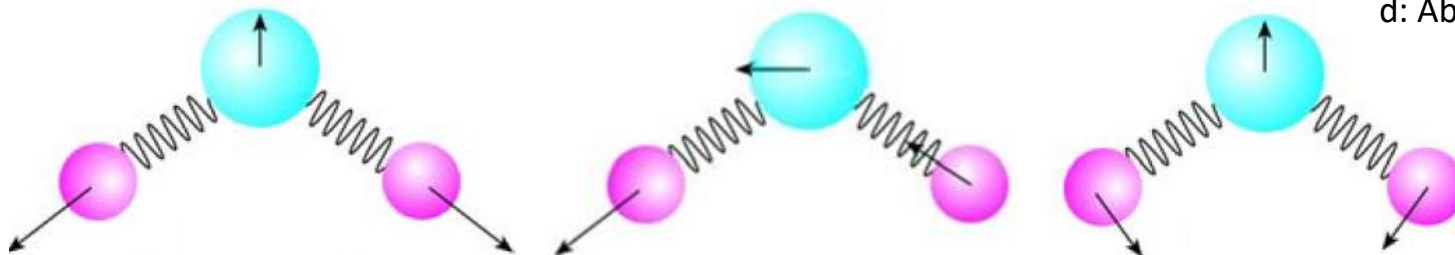


$D \sim 1000 \text{ N/m}$   
 $f_0 \sim 5 \cdot 10^{13} \text{ Hz}$

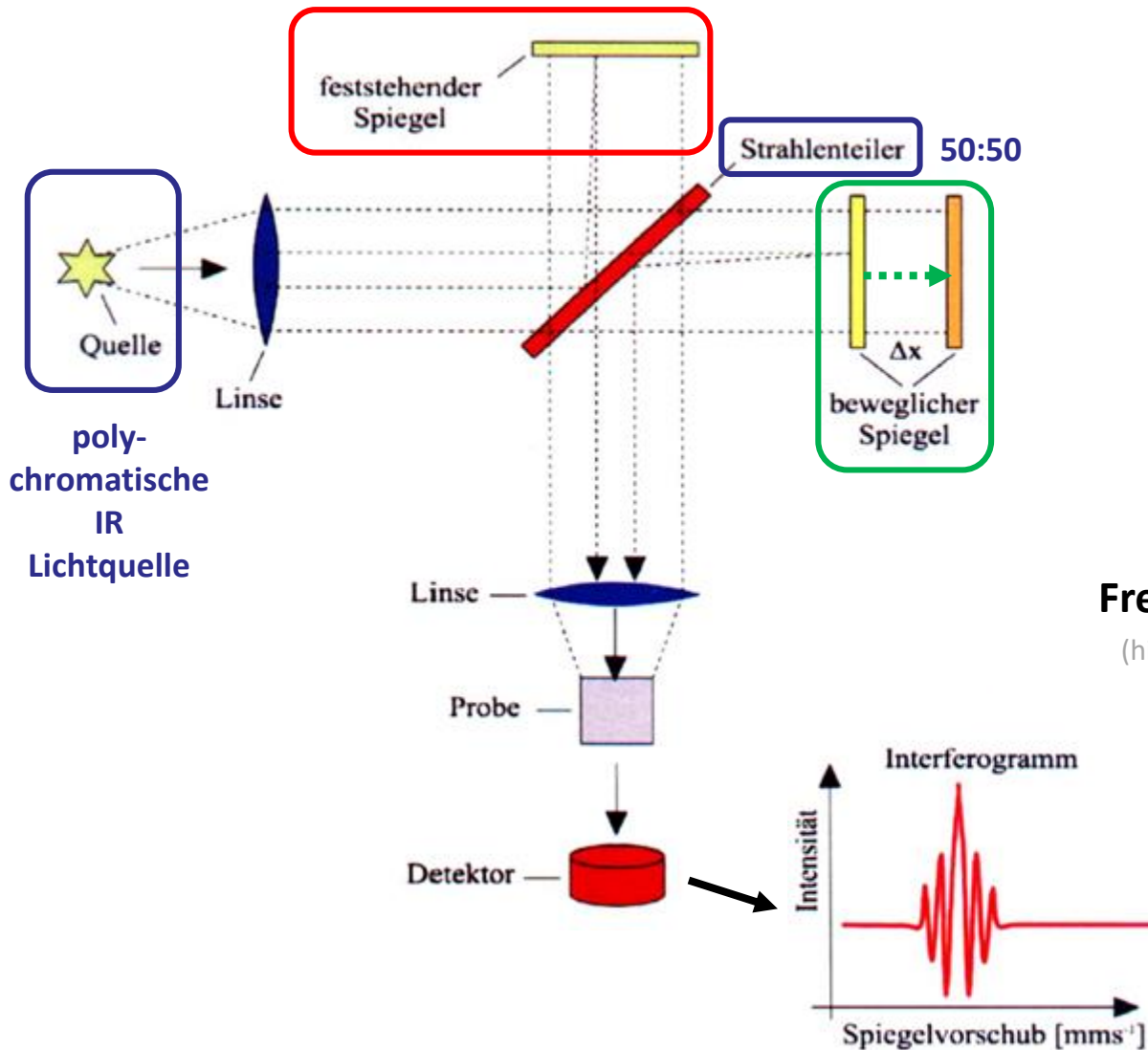
# Die Molekülschwingungen des Wassers

- Alle Atome schwingen mit **derselben Frequenz** aber mit **unterschiedlichen Amplitude und Richtung**.
- Die Atome müssen **elektrisches Dipolmoment ( $p$ )** besitzen:  $p = q \cdot d$

q: Ladung  
d: Abstand



# Aufbau eines infraroten Spektrometers



## Interferenzmuster

<https://www.geogebra.org/m/qg9wzrf9>



Die Probe wird mit diesem modulierten Licht bestrahlt  
(Interferogramm)



**berechnetes IR-Spektrum:**  
**Frequenzverteilung der Absorbanz**

(hier wird mit Fourier-Transformation berechnet)

# Anwendung: Identifizierung der Moleküle, Beweis des Raumstrukturs

Statt Wellenlänge verwendet man die **Wellenzahl** ( $\nu$ , Reziprok der Wellenlänge):

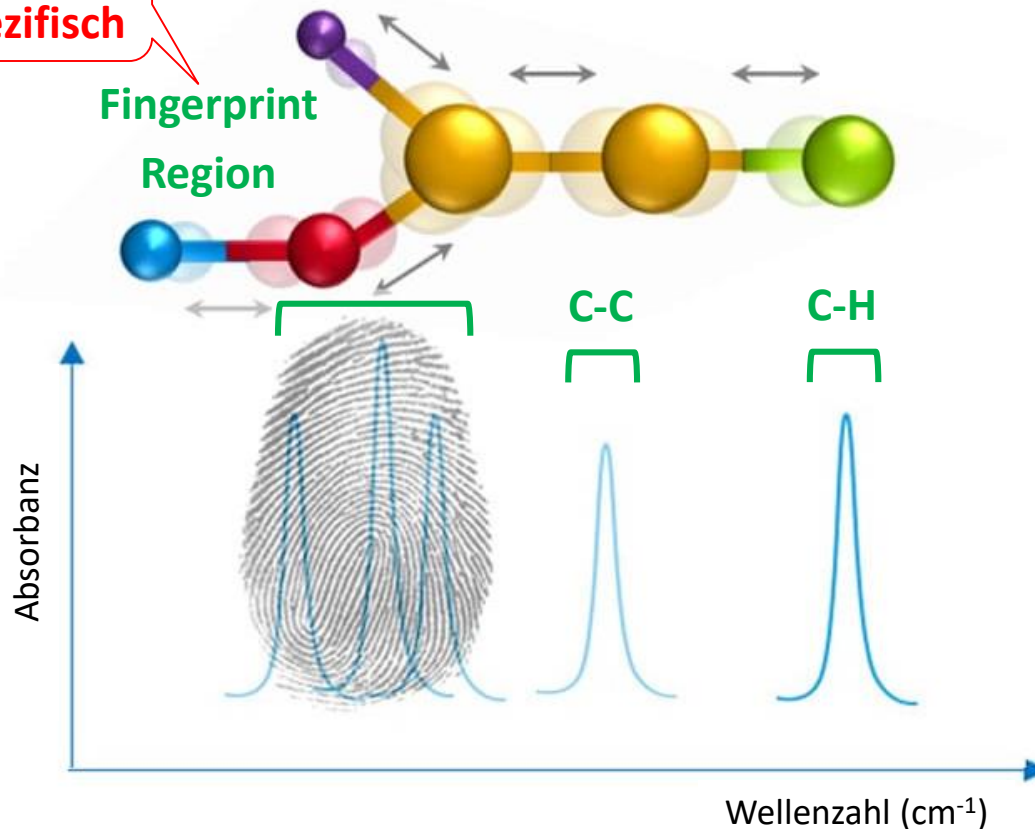
$$\nu = \frac{1}{\lambda}$$

$\nu$ : [ $\text{m}^{-1}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ]

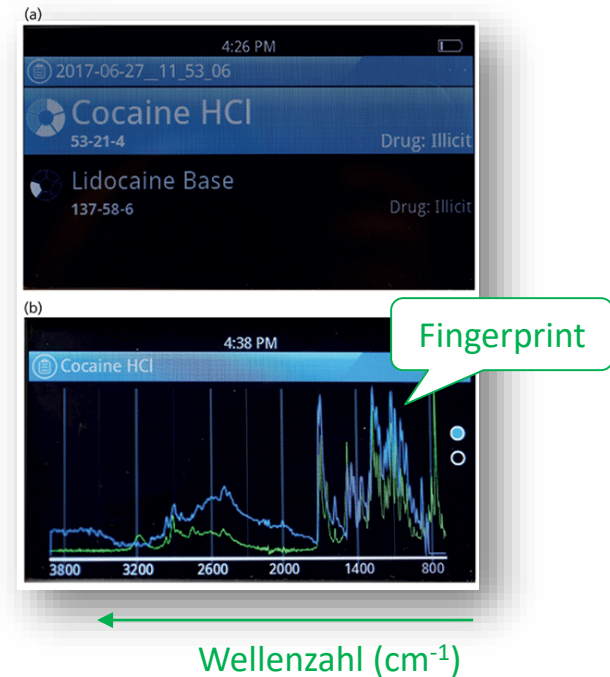
**direkt proportional zur Photonenenergie**

molekül-  
spezifisch

Fingerprint  
Region



Identifizierung der Moleküle  
mithilfe einer Spektrumbibliothek

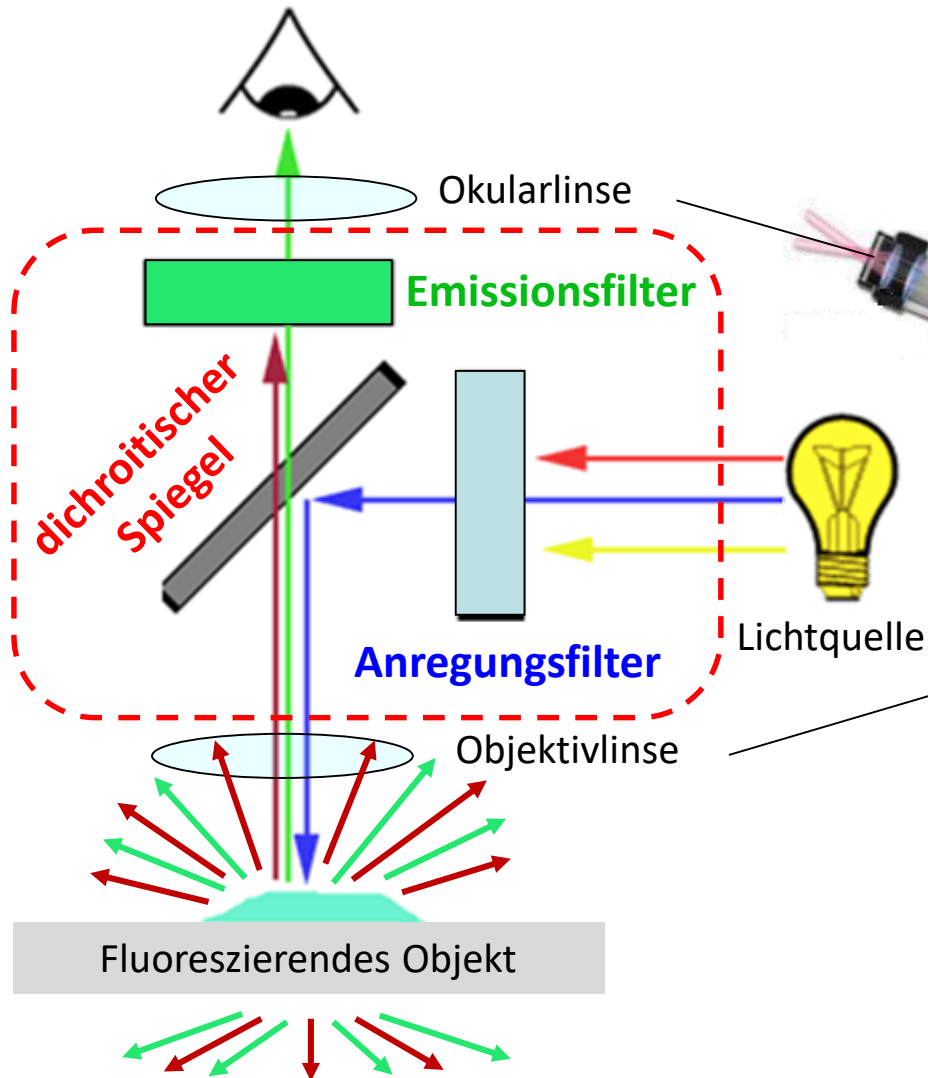


# **Spezielle Lichtmikroskope**

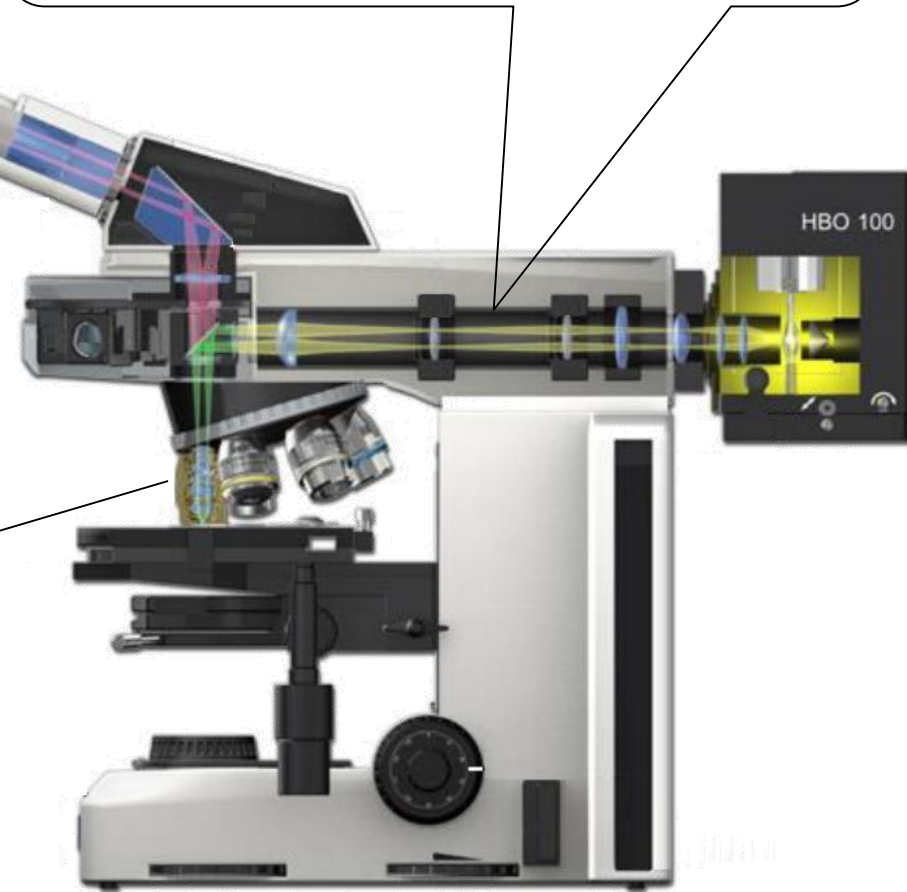


# Fluoreszenzmikroskop 1.

## Epifluoreszenz-Anordnung:

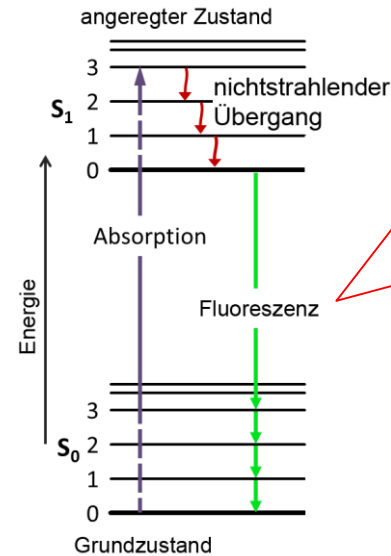
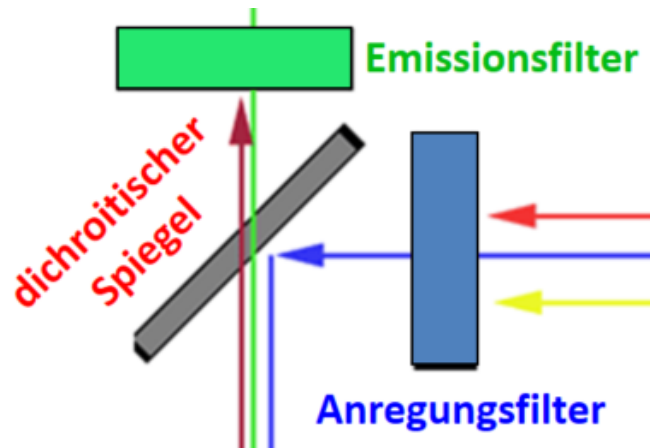


„Auflicht-Fluoreszenzmikroskop“:  
Anregungslicht wird über das Objektiv in  
das Präparat eingestrahlt.



# Fluoreszenzmikroskop 2.

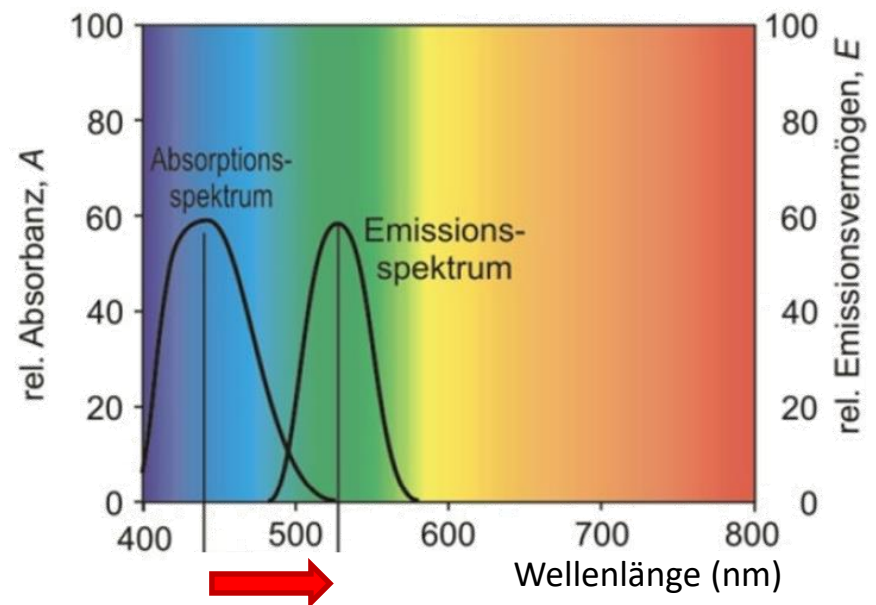
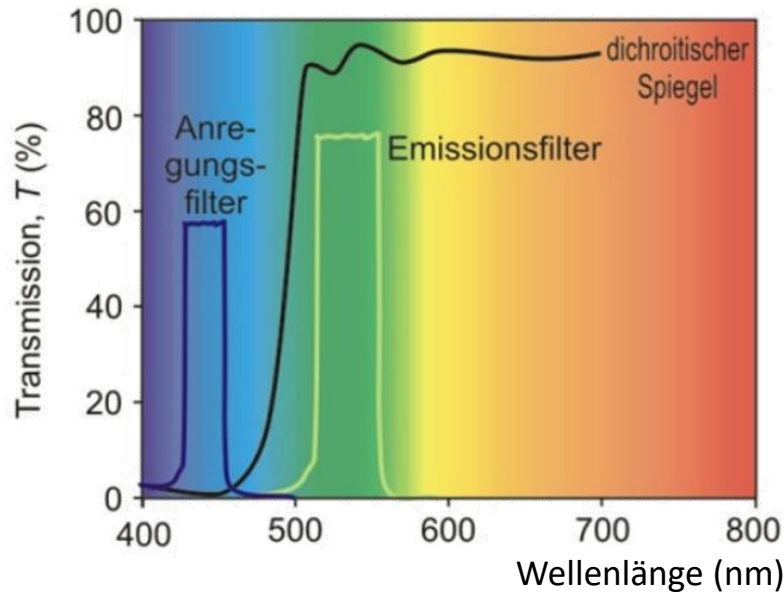
## Physikalische Grundlagen:



**Stokes-Verschiebung:**

$$E_{\text{Abs}} > E_{\text{Fluo}}$$

$$\lambda_{\text{Abs}} < \lambda_{\text{Fluo}}$$



# Fluoreszenzmikroskop 3.

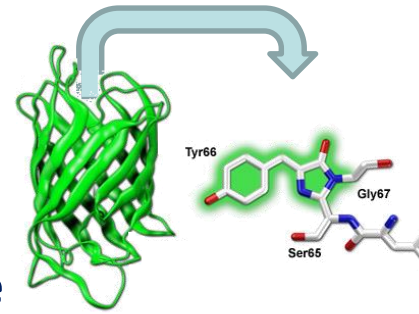
## Angewandte fluoreszierende Farbstoffe:

### Intrinsic Fluorophore: „Eigenfluoreszenz“

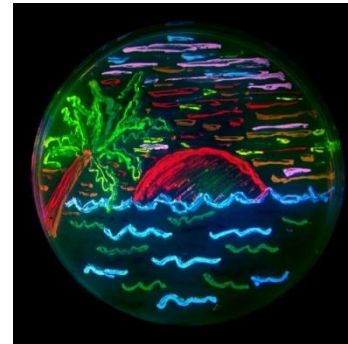
- Tryptophan, Tyrosin, Porphyrine

### Extrinsic Fluorophore: fluoreszierende Stoffe

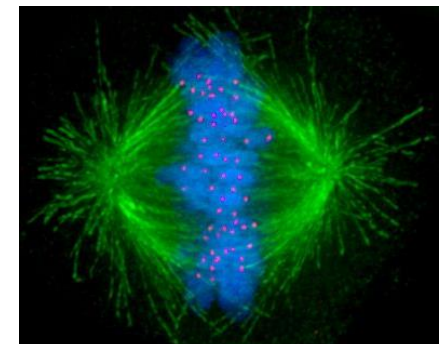
- **Der ideale Fluorophor:**
  - klein
  - hydrophil
  - emittiert im sichtbaren Lichtbereich
  - große Stokes-Verschiebung
  - spezifische Bindung
  - verursacht keine photochemische Reaktionen
- **fluoreszierende Proteine:**
  - GFP: Green Fluorescent Protein
  - FMN-bindende: Flavinmononukleotid



Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

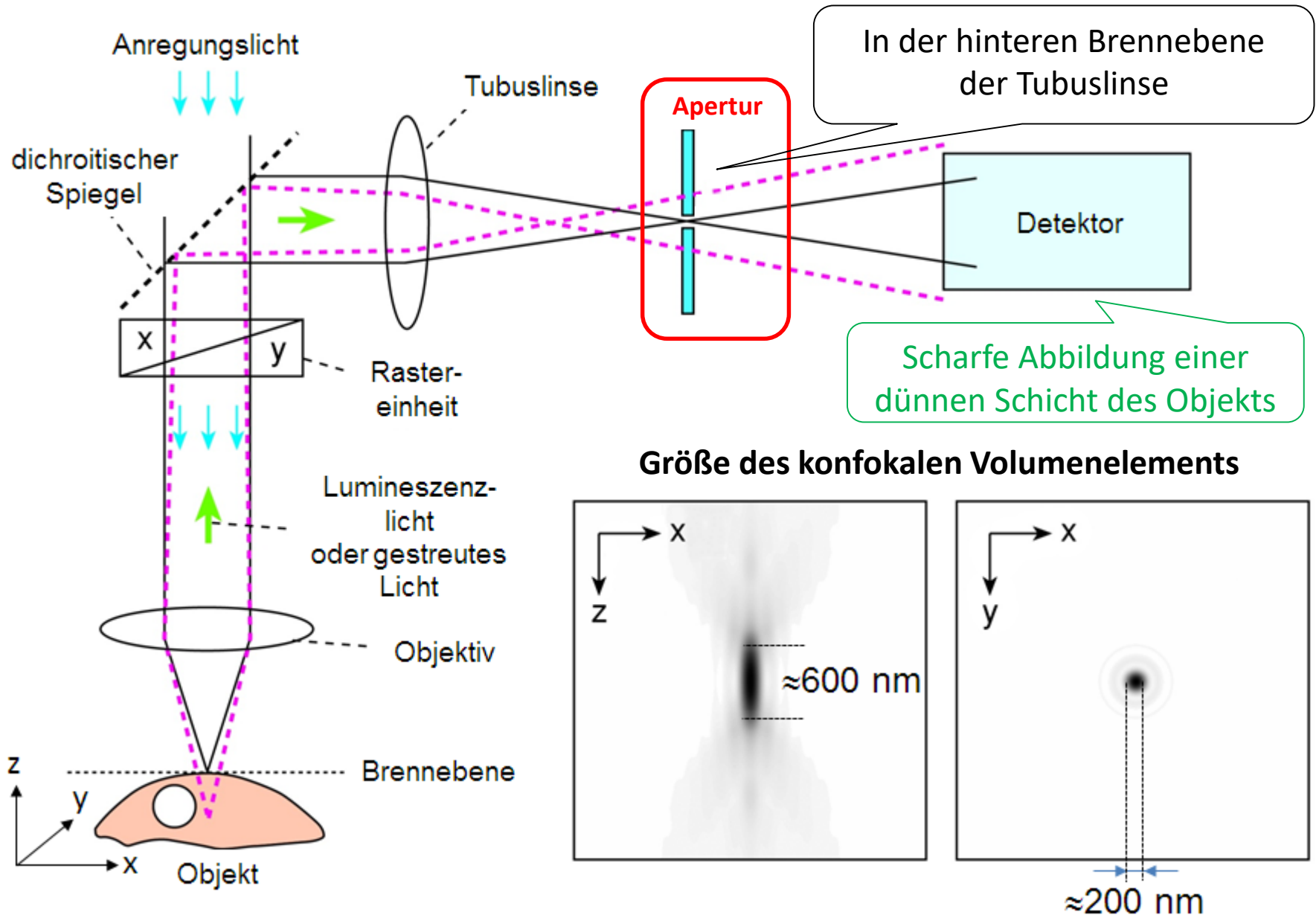


Bakterienkulturen, die verschiedene fluoreszierende Proteine exprimieren



Mikroskopische Aufnahme während der Metaphase einer Mitose (Mikrotubuli: grün, Chromosomen: blau, Kinetochoren: rosa).

# Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)



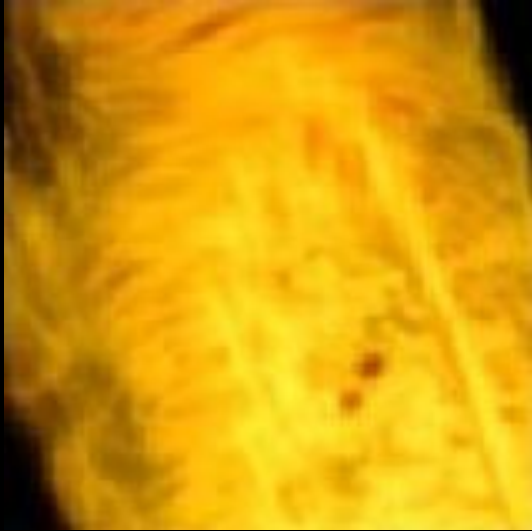
# **Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM): Funktionsprinzip**

**Fluorescence  
and confocal  
microscopes**

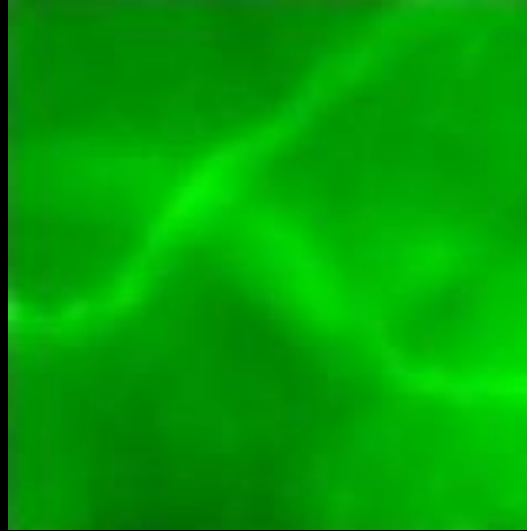
# Vergleichung von CLSM und Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzmikroskop

Medulla



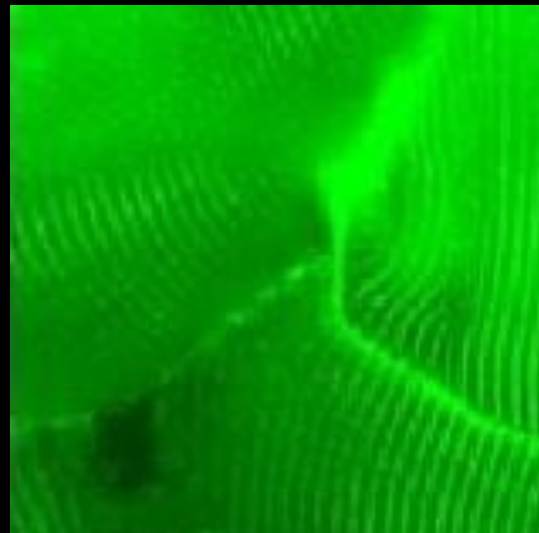
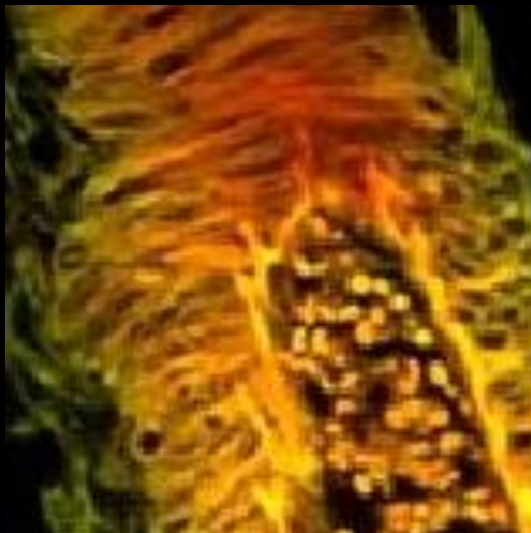
Skelettmuskel



Pollen



CLSM



# **Superresolutionsmikroskope**

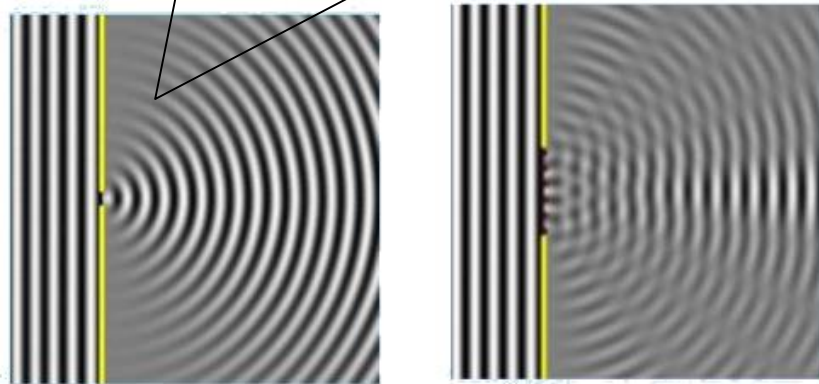


# Grundproblem – 1.

## Beugung des Lichtes:

### Huygensches Prinzip:

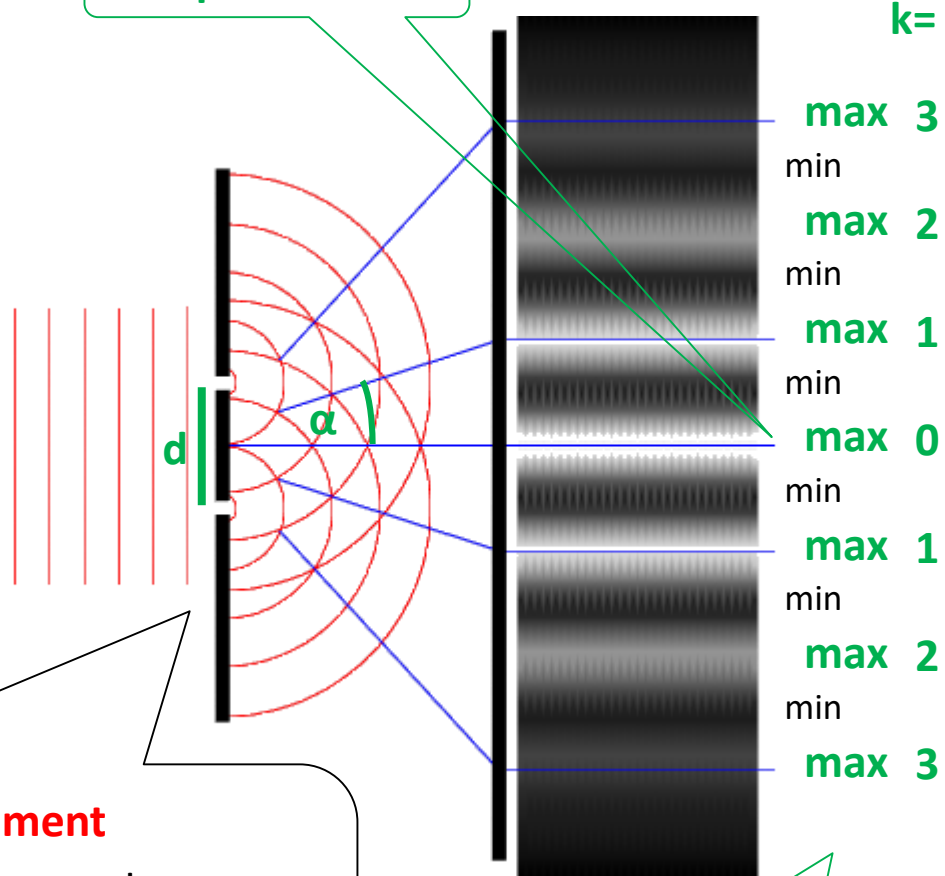
jeder Punkt einer Wellenfront dient als Ausgangspunkt einer neuen Welle



### Thomas Young: Doppelspaltexperiment

Interferenzmuster entsteht durch Beugung der Wellenausbreitung am Doppelspalt. Bei monochromatischem Licht besteht dieses Muster auf dem Schirm aus **hellen Streifen (Maxima)** und **dunklen Streifen (Minima)**.

Hauptmaximum

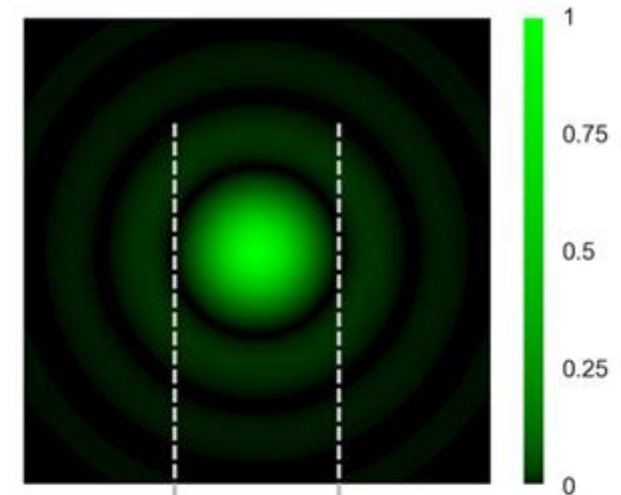
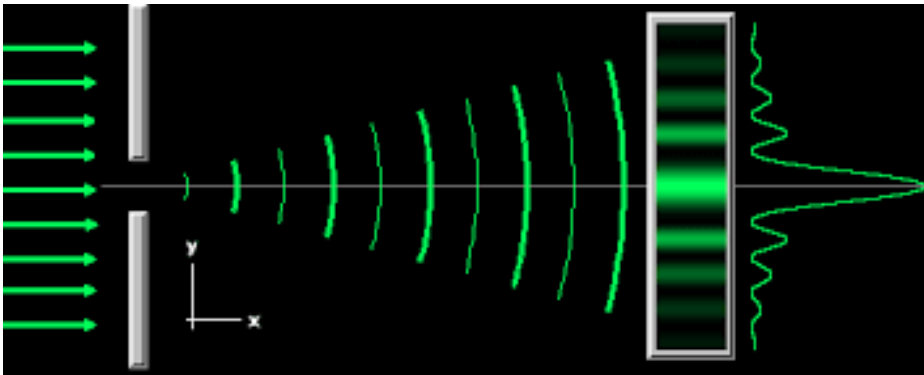


Maximale Verstärkung:  
 $k \cdot \lambda = d \cdot \sin(\alpha)$



# Grundproblem – 2.

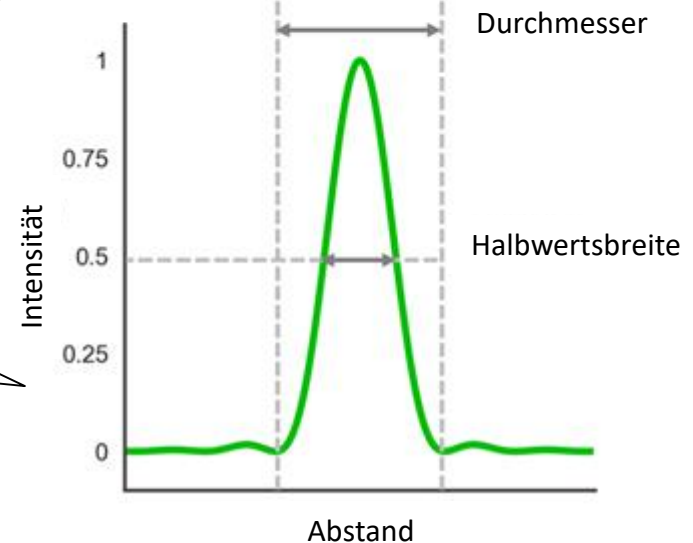
## Entstehung der Beugungsscheiben:



### **Airy-Scheibe:**

zentrales Maximum, umgeben von Ringen abnehmender Intensität.

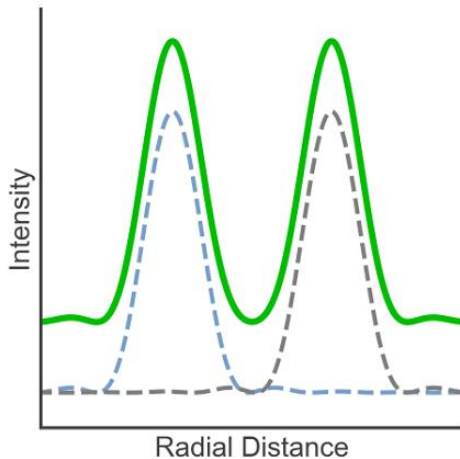
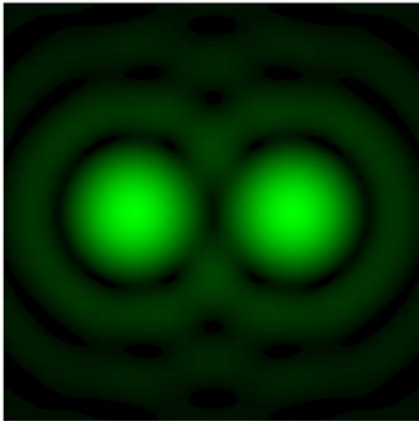
Das zentrale Maximum enthält 84% der Intensität, die Umgebung enthält 16% der Intensität.



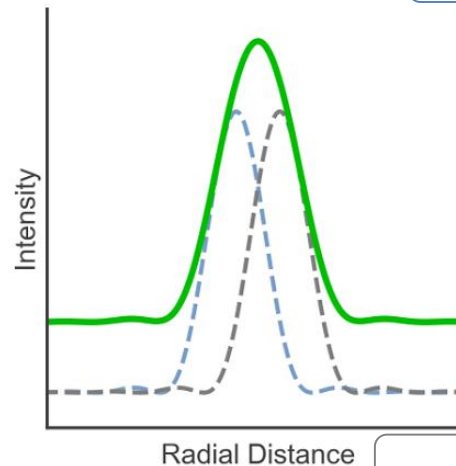
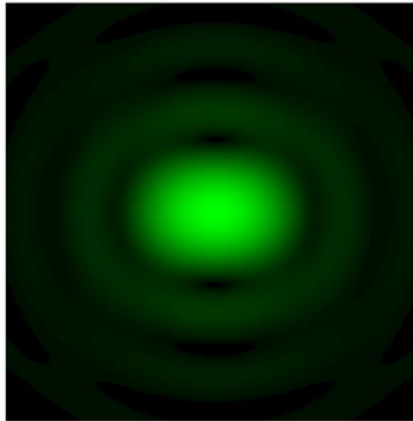
# Grundproblem – 3.

## Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

auflösbar

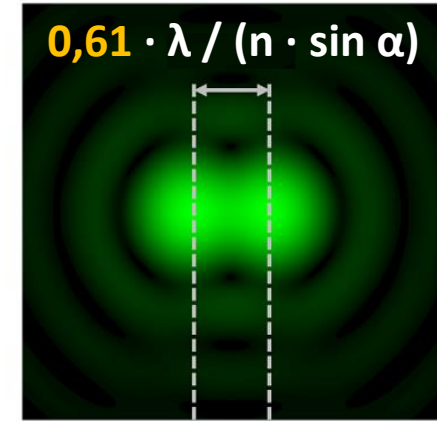


nicht mehr auflösbar



**Rayleigh-Grenzfall:**

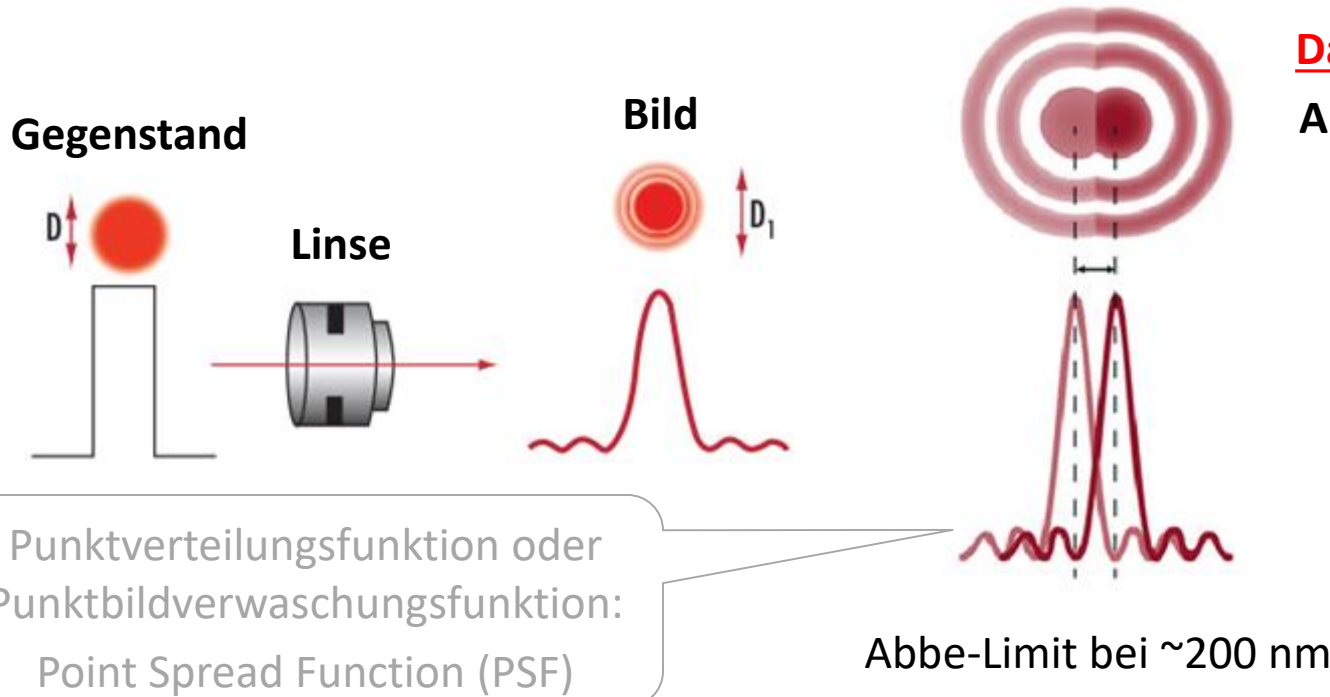
Hauptmaximum stimmt mit dem ersten Minimum der benachbarten Beugungsscheibe



Hauptmaximum

erstes Minimum

# Lichtmikroskop

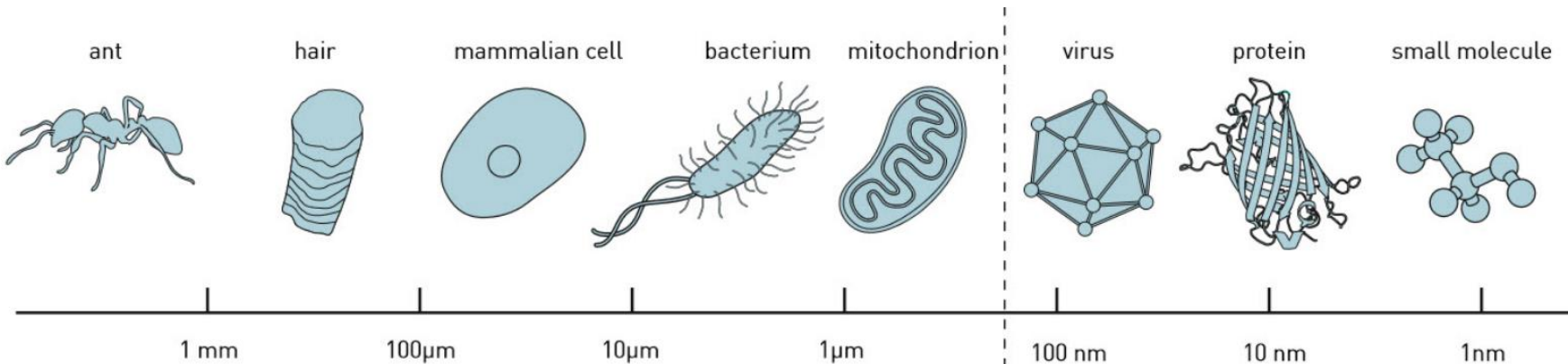


## Das Abbesche Prinzip:

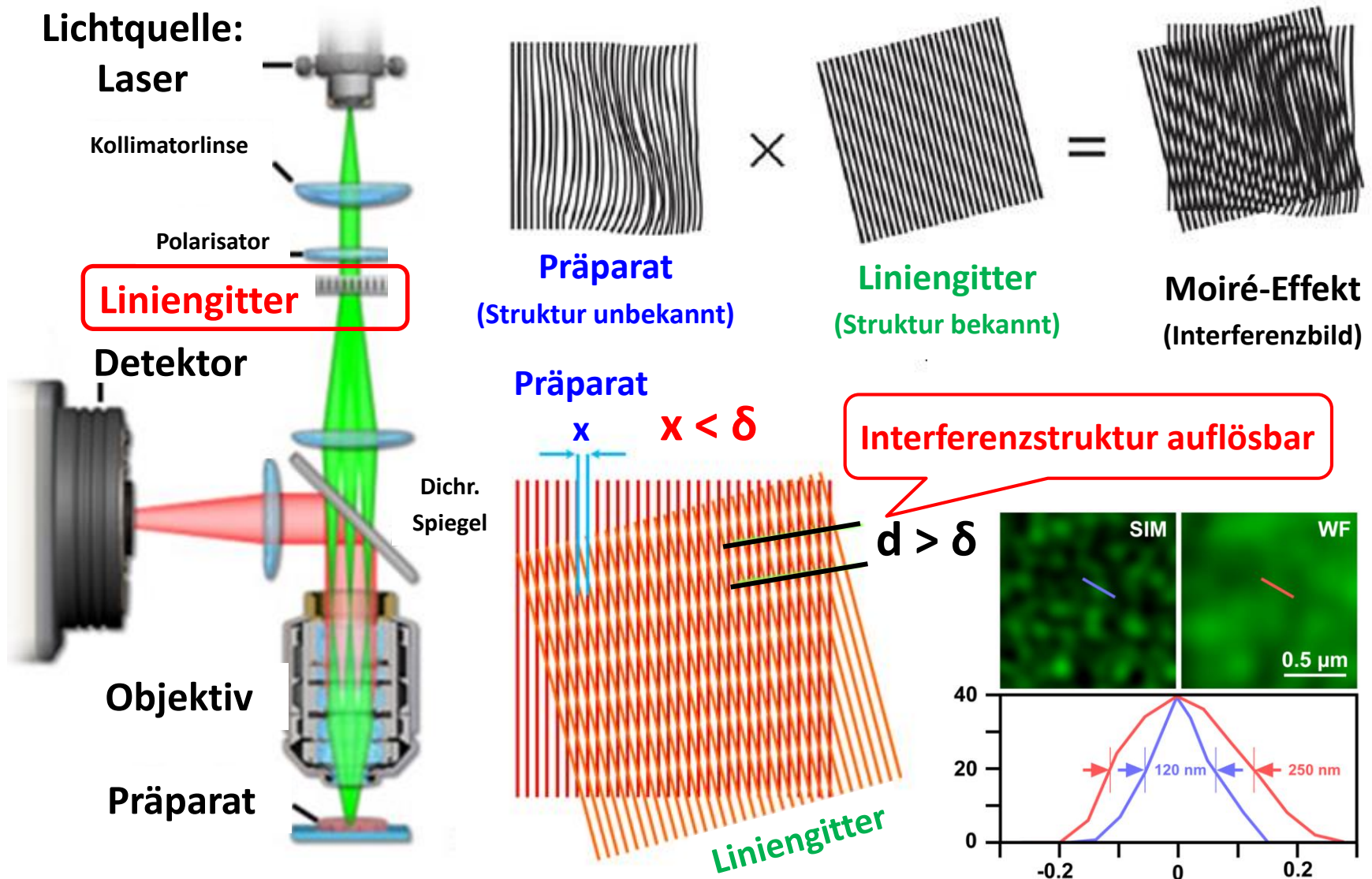
**Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:**

$$\delta = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \omega}$$

**Numerische Apertur (NA)**



# Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung, Structured Illumination Microscopy (SIM)

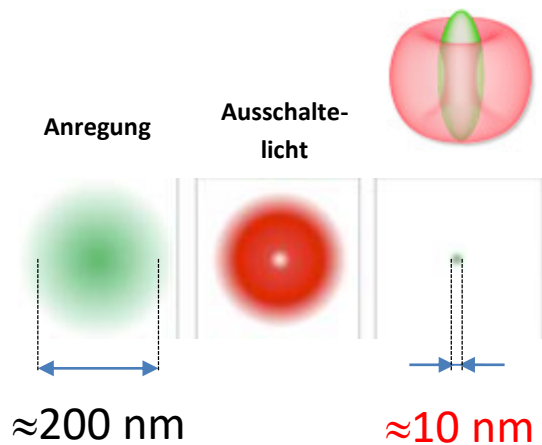
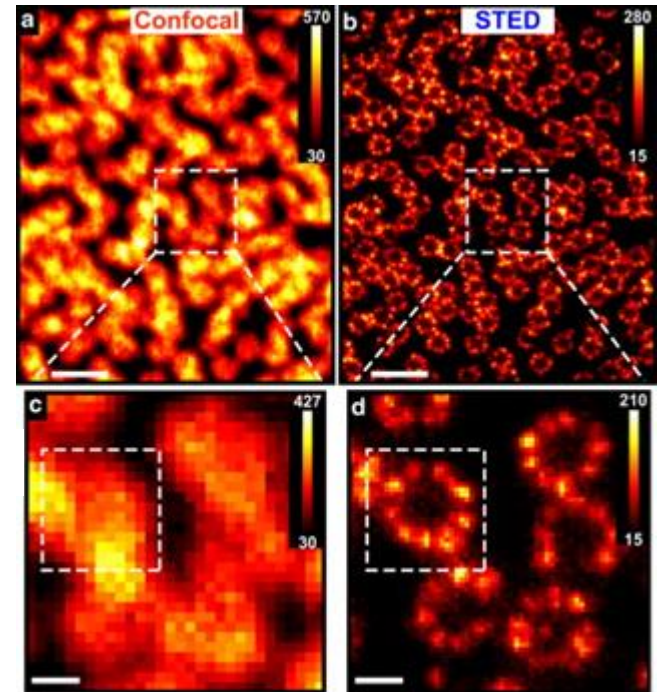
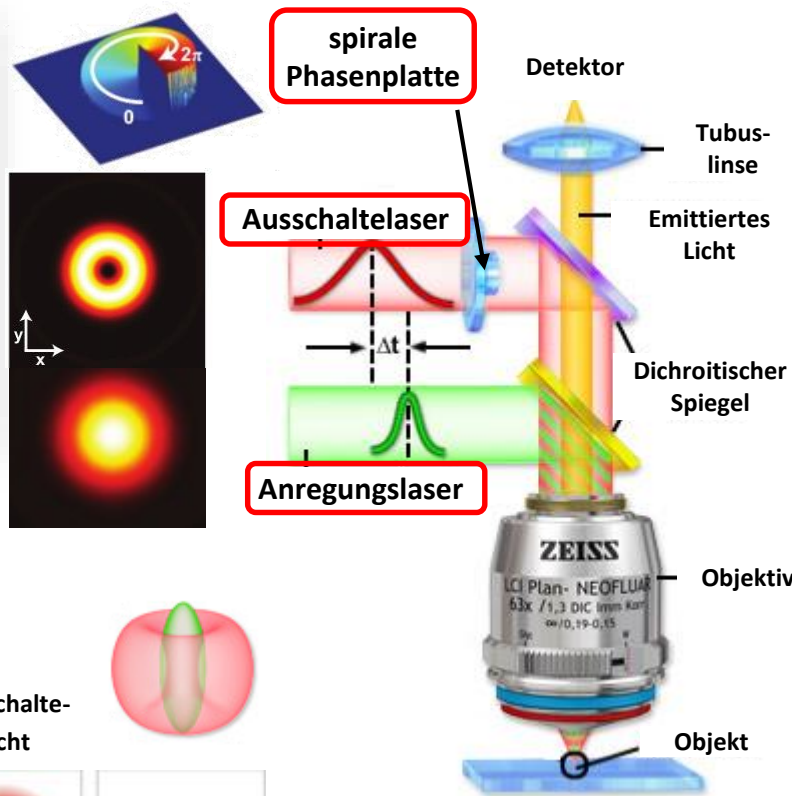




# Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)



**Stefan W. Hell**  
Nobel Preis 2014

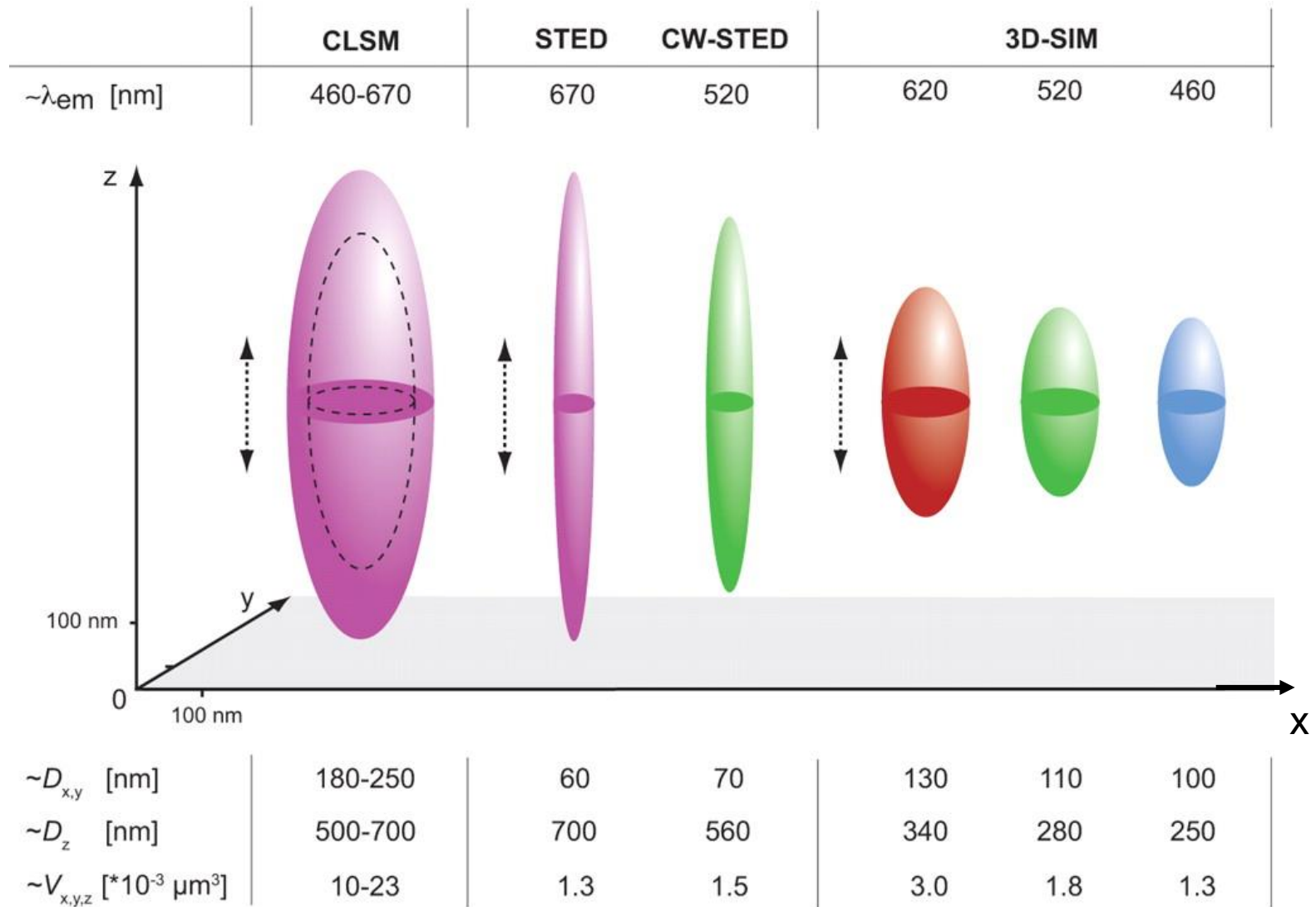


**Abbe-Grenze**

**Superresolution**

- **Anregung** gleich nach der „**Ausschaltung**“ der Fluorophoren
- **Stimulierte Emission** in einer sehr kleinen Raumteil: **Spirale Phasenplatte**
- **Abtastung** ist notwendig

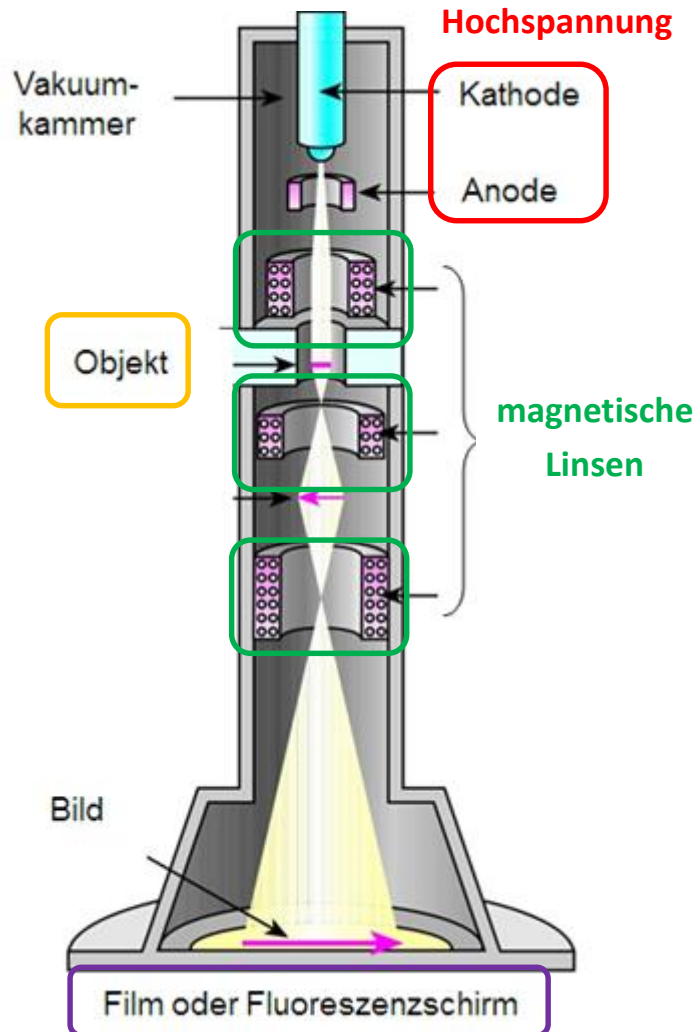
# 3D-Auflösung der Spezialmikroskope



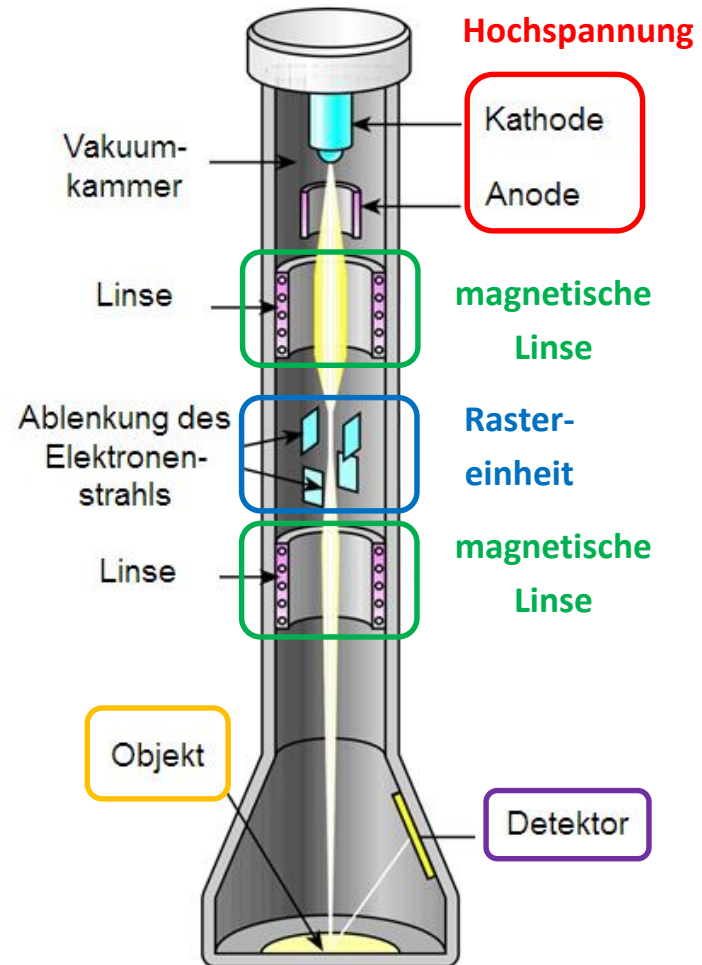
# Elektronenmikroskope

# Elektronenmikroskope

## Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM)



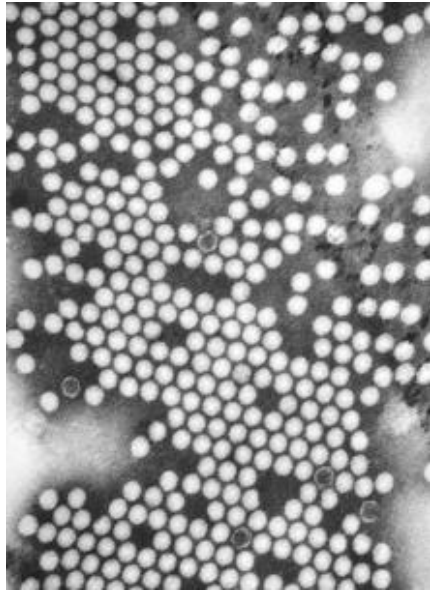
## Raster-Elektronenmikroskop (SEM)



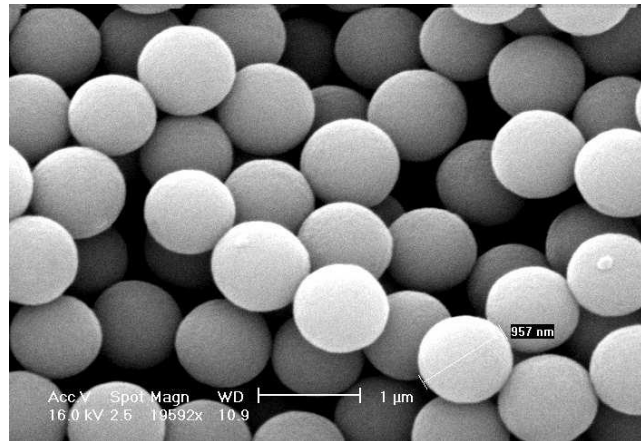


# Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugelchen (SEM)



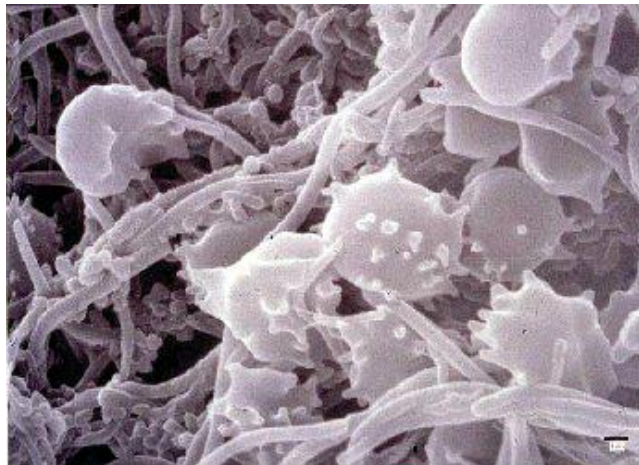
Auflösungsgrenze ( $\delta$ ):

$$\left. \begin{array}{l} \delta \approx \frac{\lambda}{NA} \\ NA \approx 0,03 \\ \lambda \approx 0,005 \text{ nm} \end{array} \right\} \delta \approx 0,2 \text{ nm}$$

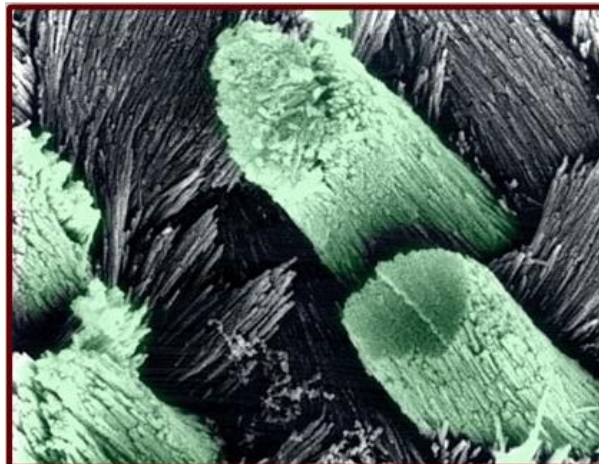
s. Materiewellen

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$$

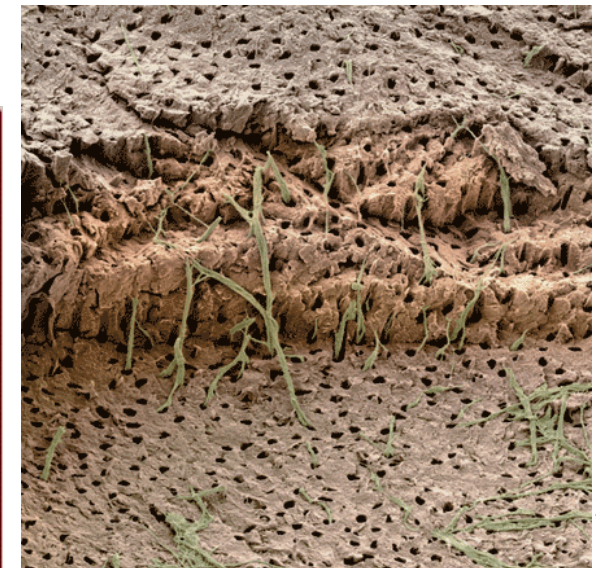
Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den Apatitkristallen (SEM)



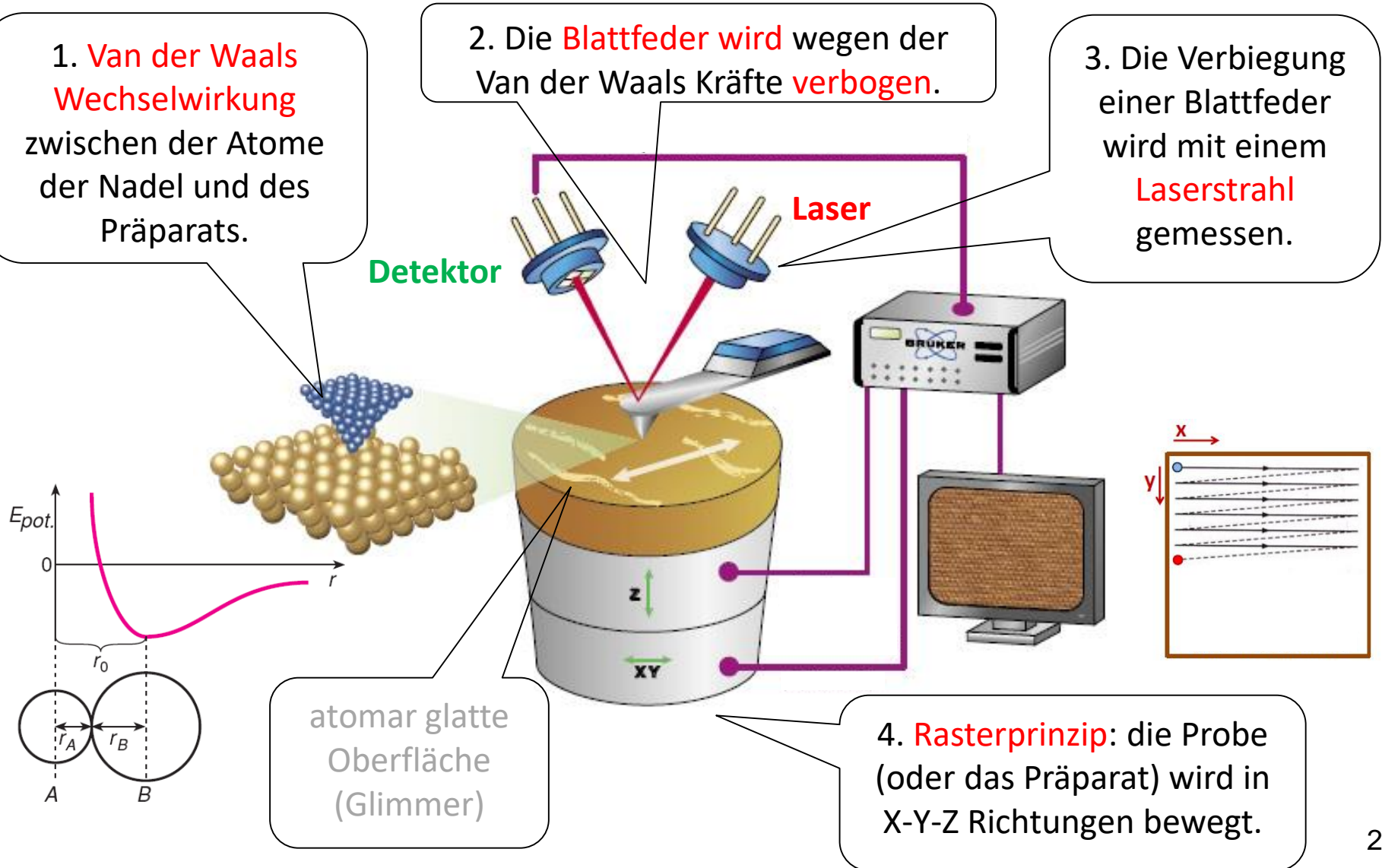
Dentin mit den Odontoblasten (SEM)



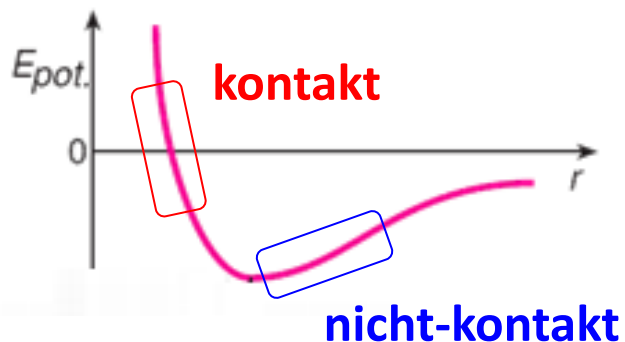
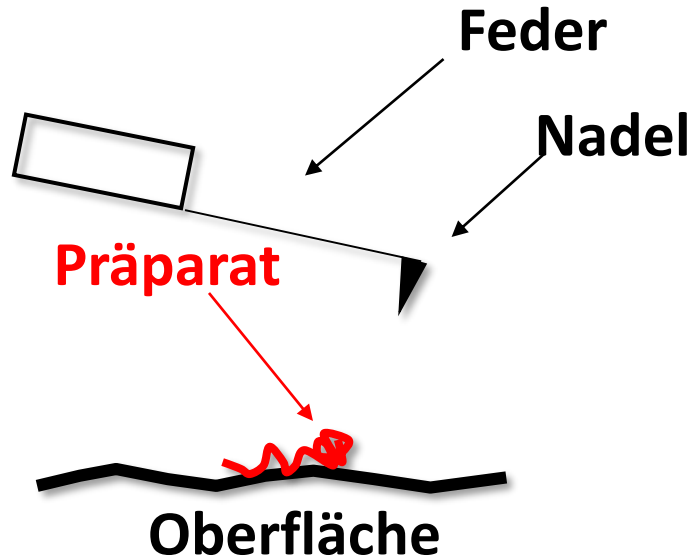
# Rastersondenmikroskopie

# Rasterkraftmikroskop

## (Atomic Force Microscope, AFM)



# AFM Betriebsarten



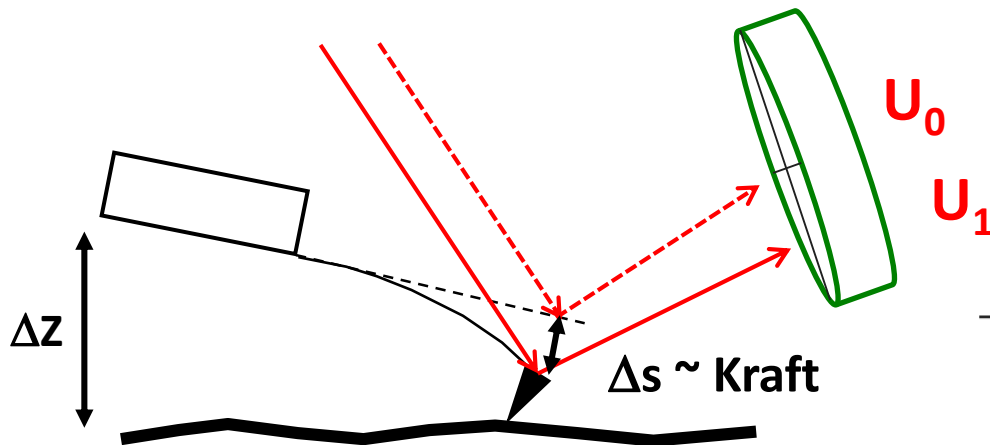
- **Kontakt:** die Messspitze steht in direktem mechanischem Kontakt mit dem Präparat, die **Auslenkung der Feder** liefert die topographische Information.
  - **Z-Rückkopplung:** die Auslenkung des Cantilevers und damit die Kraft zwischen Spitze und Probe wird mit dem „Setpoint“ verglichen. Die Regelung bewirkt dann eine Höhenänderung bis die Auslenkung dem Setpoint entspricht.
  - **Die topographische Information** (zB. Höhe) wird in jedem X-Y Bildpunkt aus der  $\Delta Z$  Höhenänderung des Cantilevers errechnet.
- **Nicht-Kontakt:** der Feder schwingt an seiner Resonanzfrequenz weiter von dem Präparat. Die **Amplitude und die Eigenfrequenz ( $f_0$ )** ändern sich mit der Topographie des Präparats.
  - **Z-Rückkopplung:** sorgt für eine **konstante Amplitude** mit der  $\Delta Z$  Höhenänderung des Cantilevers.

# AFM: Kontakt-Modus

eignet zur Untersuchung  
von weichen  
biologischen Strukturen  
(z.B. Zellen)

Laserstrahl

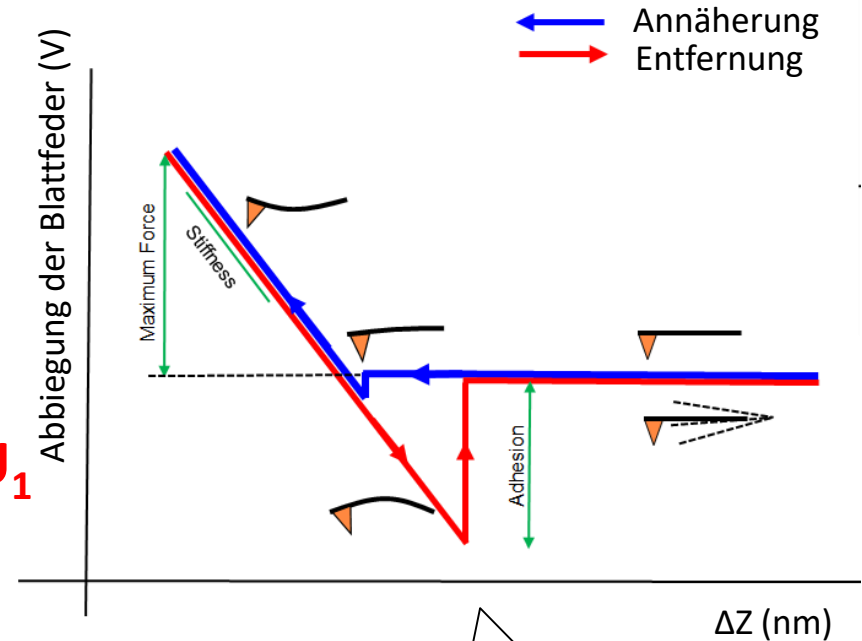
Detektor  
(Photodiode)



$$F = D \cdot \Delta s \text{ (Hookesches Gesetz)}$$

$\Delta s$ : Abbiegung der Blattfeder

D: Federkonstante



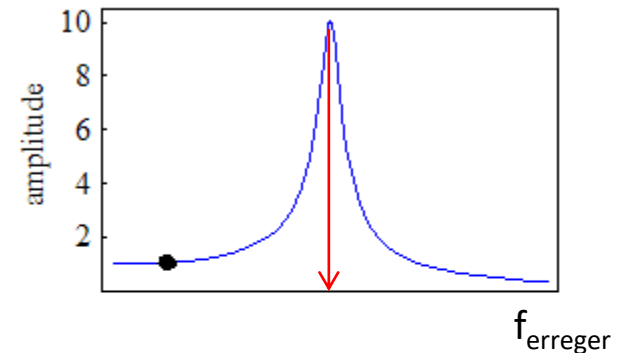
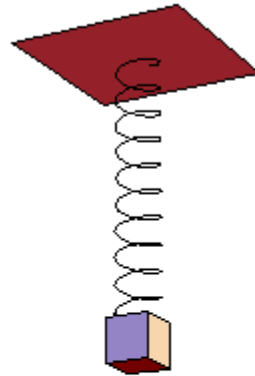
- Kraftmessung
  - Elastizitätsmessung (D)
  - Adhäsionsmessung
- an biologischen Präparaten



# AFM: Nicht-Kontakt-Modus

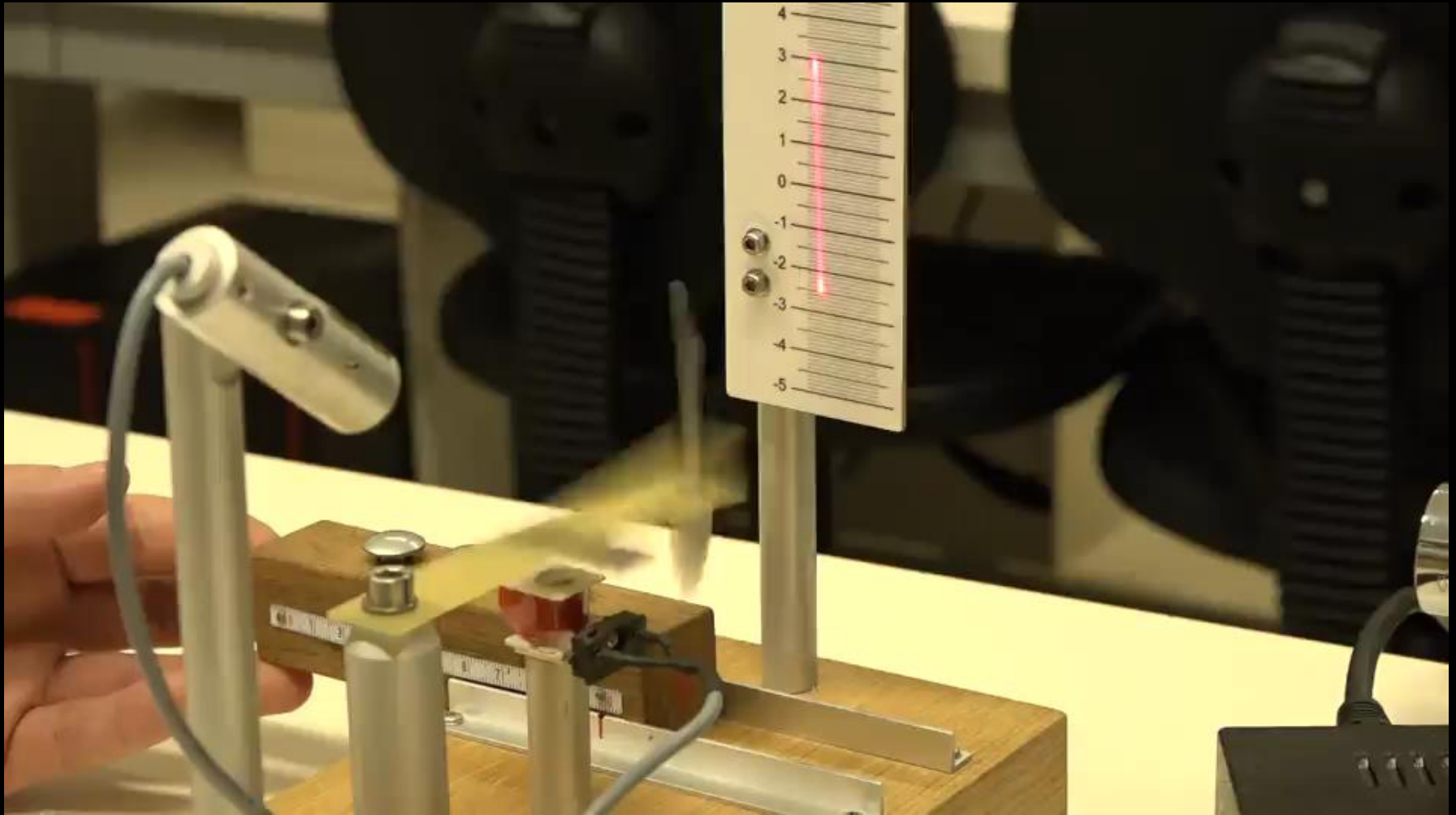
**Resonanz:** Eine erzwungene Schwingung, bei der die Frequenz der äußeren Krafteinwirkung nahe der Eigenfrequenz des Schwingungssystems liegt. In diesem Fall können sehr große Amplituden auftreten.

## Erzwungene Schwingung



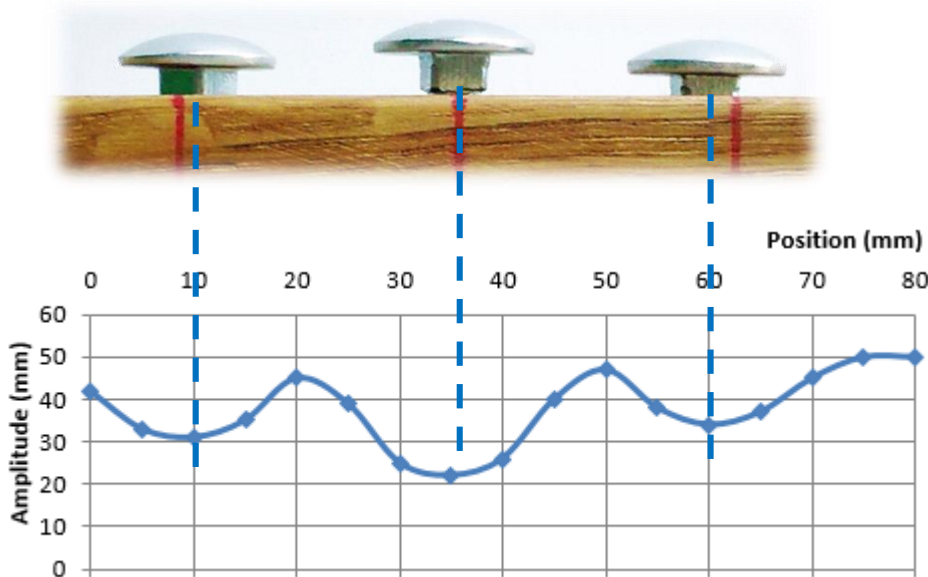
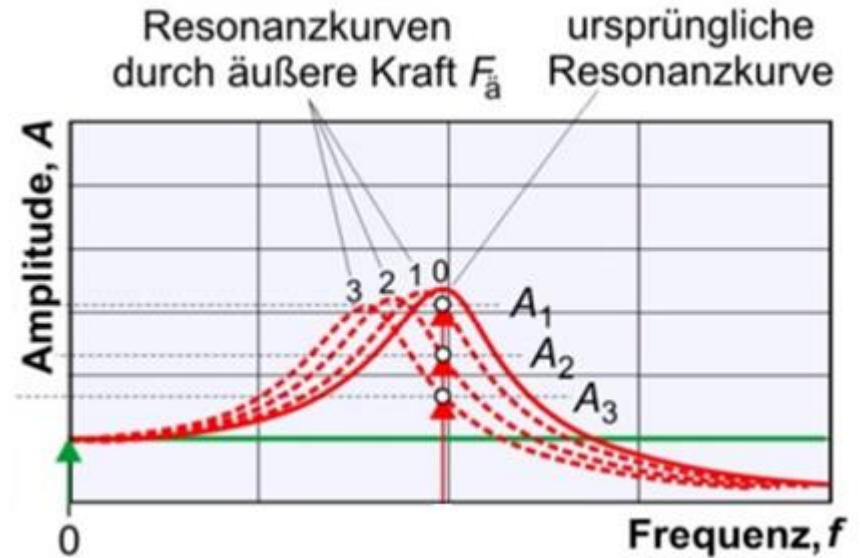
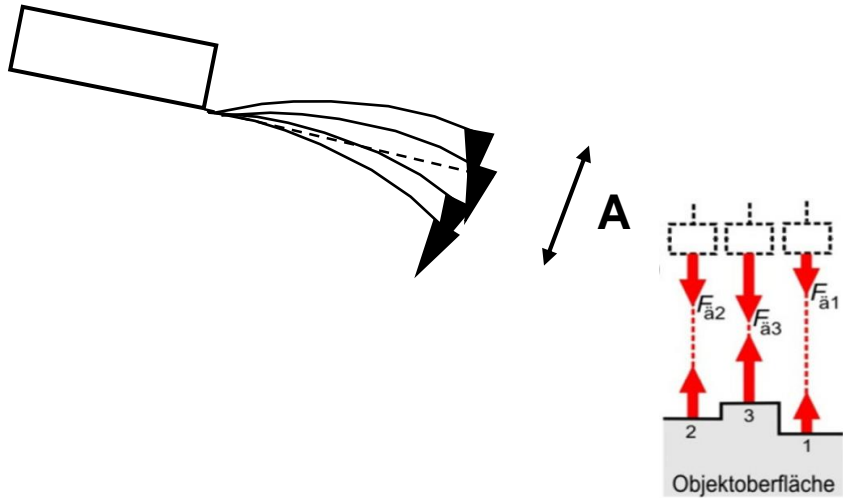
$$f_{\text{erreger}} = f_{\text{eigen}}$$

# AFM Modell: Nicht-Kontakt-Modus



Magnetische Wechselwirkung modelliert die Van der Waals Kräfte

# AFM: Nicht-Kontakt-Modus



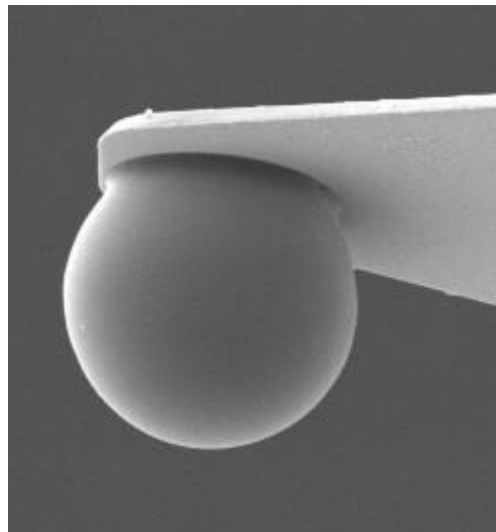
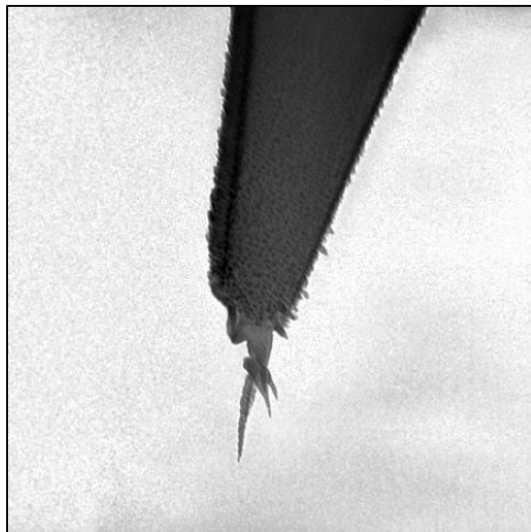
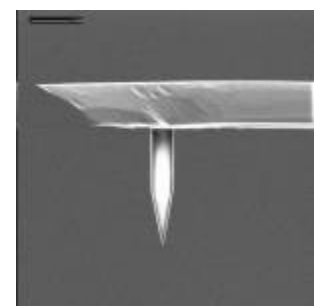
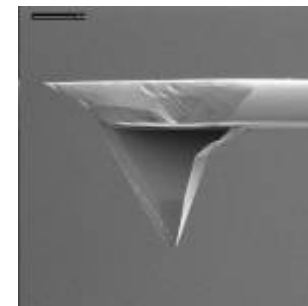
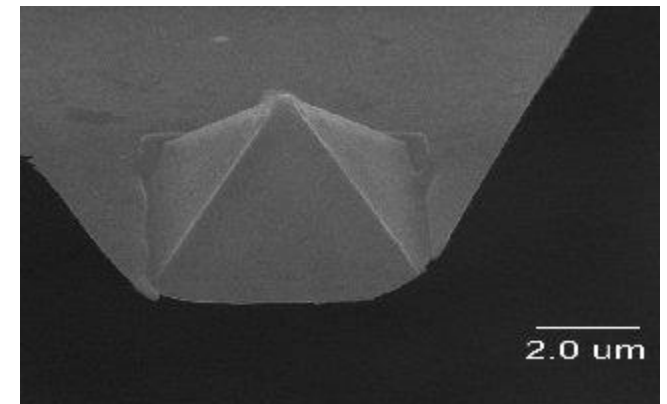
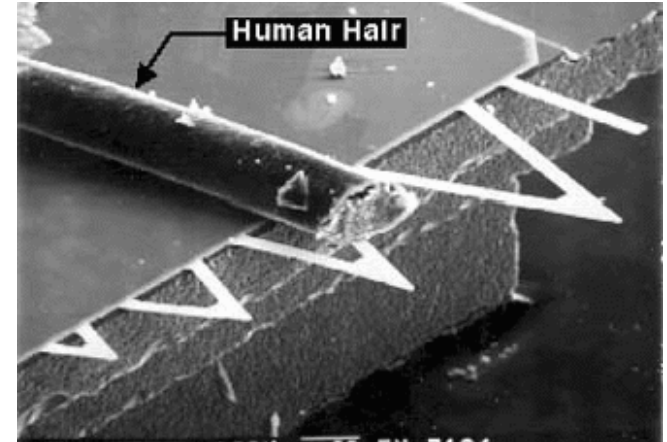
$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m}} \quad \downarrow$$

- **Objekthöhe** kann **präzis nur mit Rückkopplung** gemessen werden.

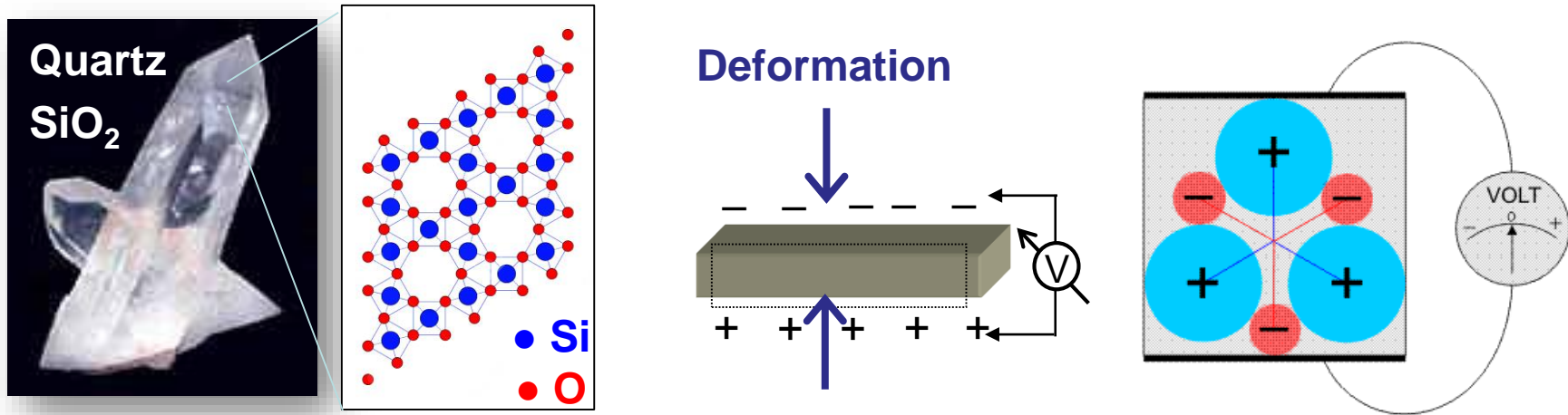


# Blattfeder / Cantilever

- Material: Siliciumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_2$ )
- Krümmungsradius: 0,1 nm- 100  $\mu\text{m}$
- Federkonstante  $\sim 0,1\text{-}10 \text{ N/m}$
- $f_0 \sim 50\text{-}500 \text{ kHz}$

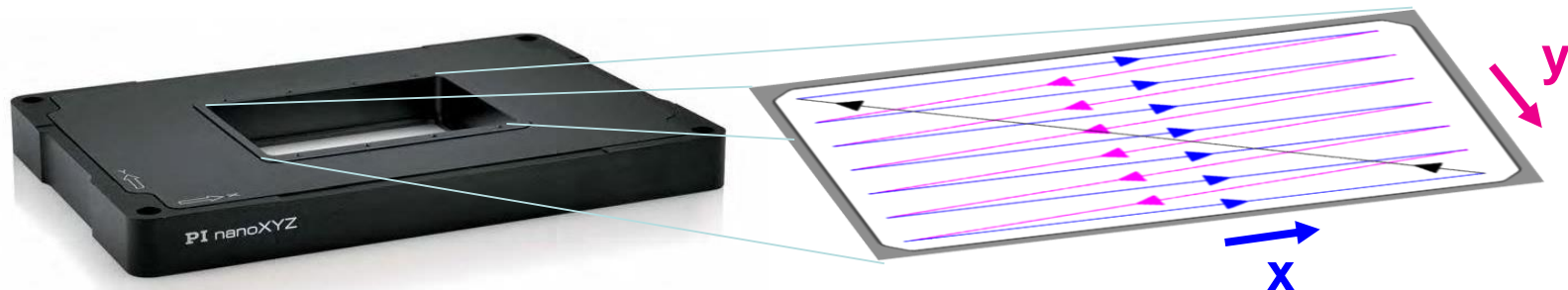


# Das Rasterprinzip: Piezoelektrizität



- **Inverser piezoelektrischer Effekt: Spannung → Deformation**
- X, Y, Z Piezotransducer: 150 V → 40 μm

präzise Schrittgröße:  
0,1 nm



# AFM - Eigenschaften

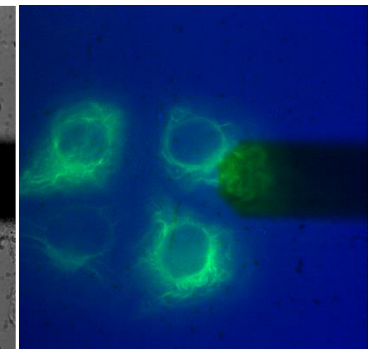
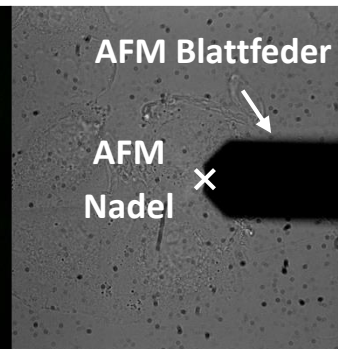
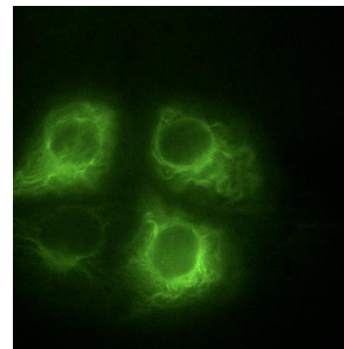
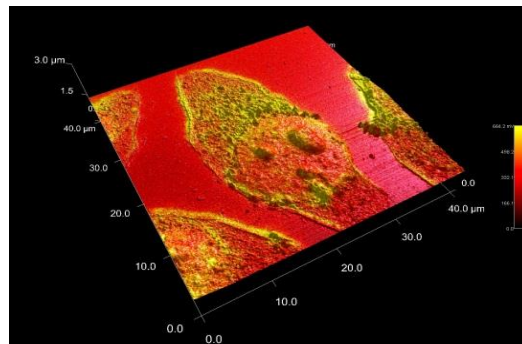
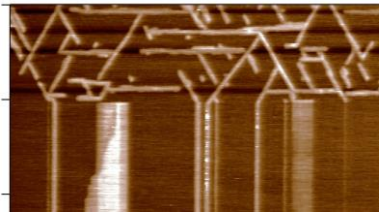
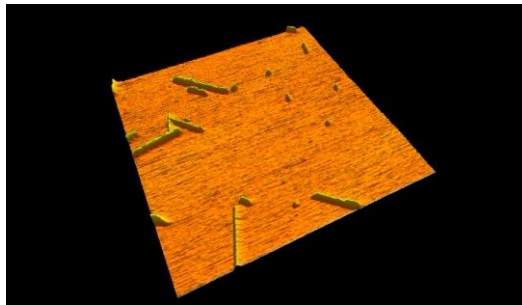
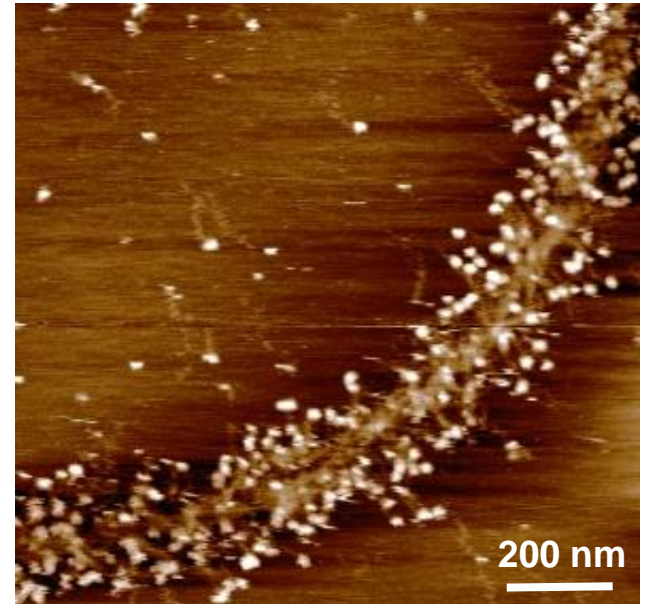
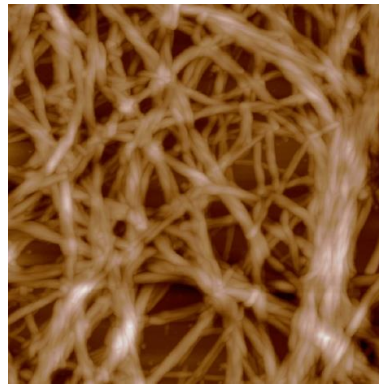
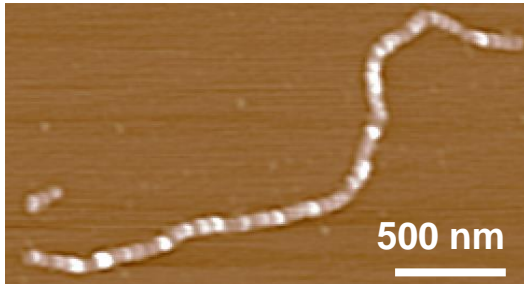
- **Vorteile:**

- 3D topographische Abbildung mit hoher Auflösung.
- **Vertikale Auflösung ist im ~10 pm-Bereich (laterale Auflösung: schlechter).**
- Elektrische Isolatoren oder lebendige Zellen können auch untersucht werden.
- **Messung auch in flüssigem Medium** möglich.
- **Natives Präparat** (Färbung oder Fixierung ist nicht notwendig).
- Biologische Strukturen können unter physiologischen Bedingungen untersucht werden (Temperatur, pH, Ionenstärke).

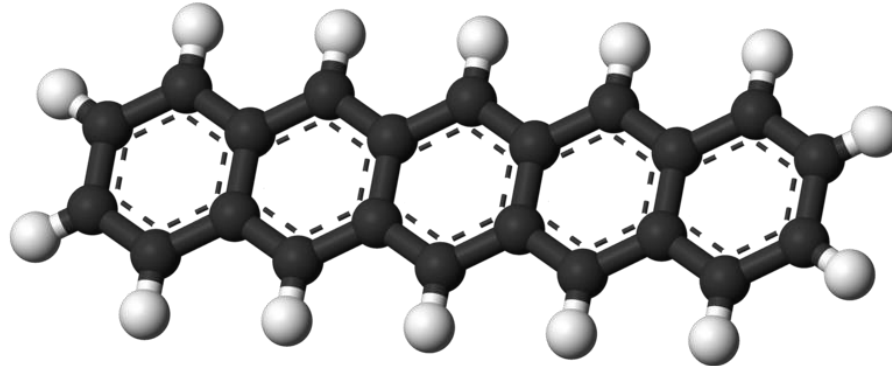
- **Nachteile:**

- Das Präparat soll zur Tragfläche konjugiert werden, dabei ändert sich eventuell seine Struktur.
- Langsame Abtastung.
- Maximale Abtasthöhe ist im  $\mu\text{m}$ -Bereich.
- Maximale abtastbare Oberfläche liegt im  $100 \mu\text{m}^2$ -Bereich ( $10 \times 10 \mu\text{m}$  Rechteck).
- Teuer (Instrument, Vorbereitung des Präparats, Cantilever, usw.).

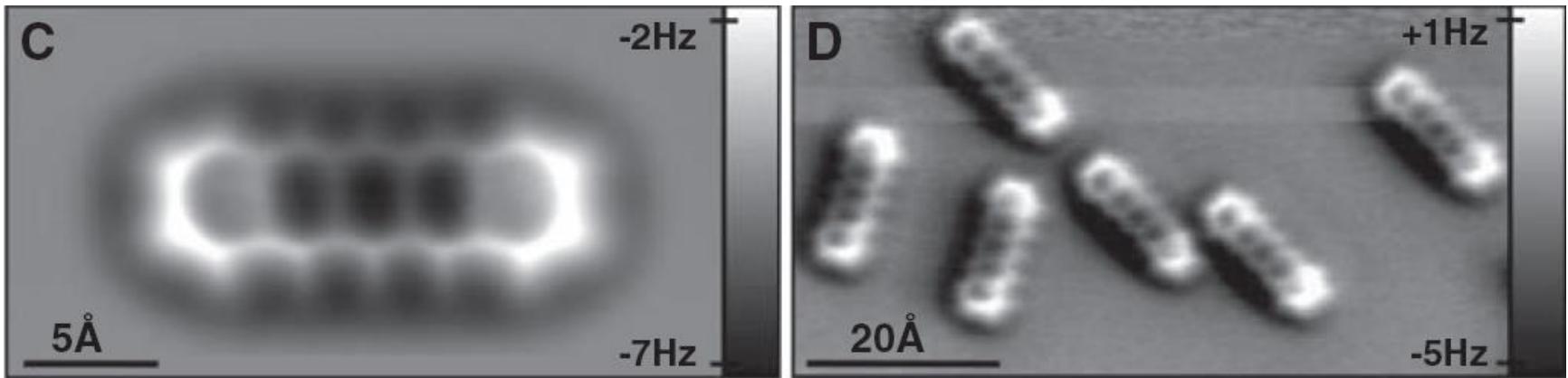
# AFM-Bilder aus unserem Institut



# Pentacen Molekül



Topographie (AFM, die Spitze der Nadel ist mit CO-bedeckt)

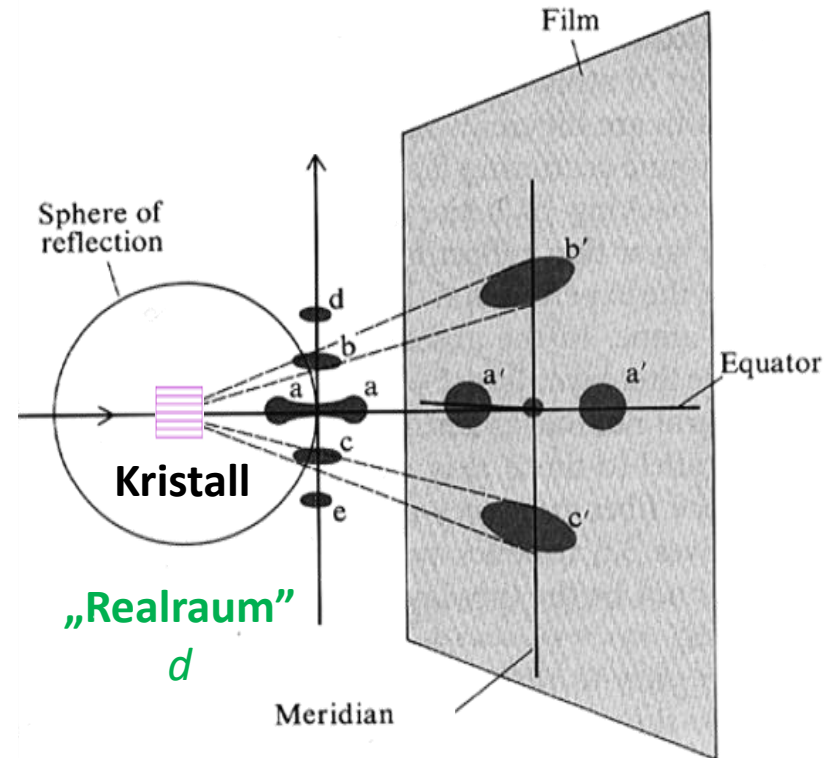
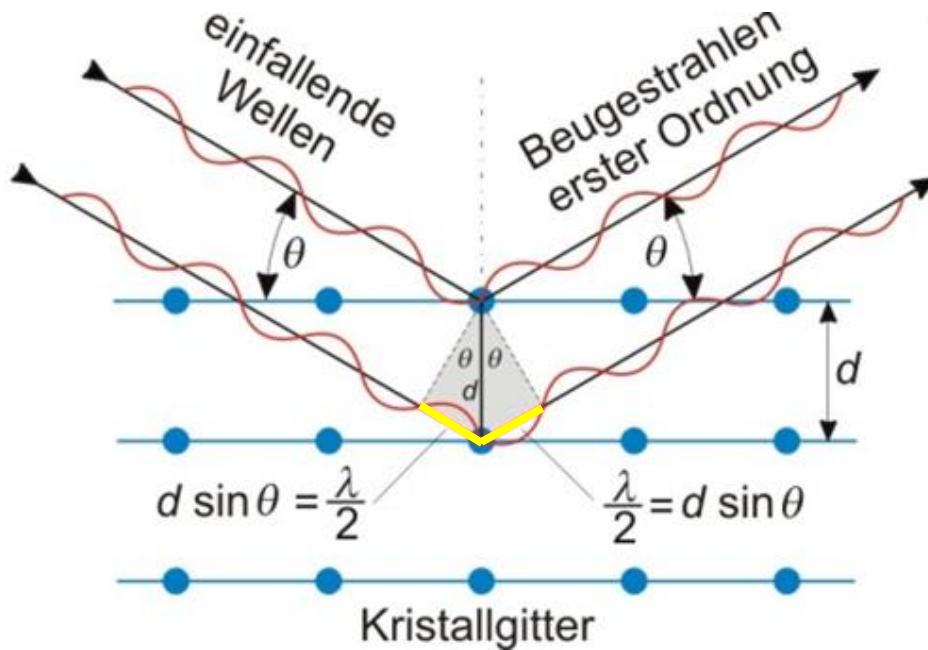


*Nature Chemistry* 1, 597 - 598 (2009)

# **Diffraktionsmethoden**



# Röntgendiffraktion - Grundlagen



## Bragg-Gleichung:

$$2d \cdot \sin \theta = k \cdot \lambda$$

$d$ : Gitterabstand

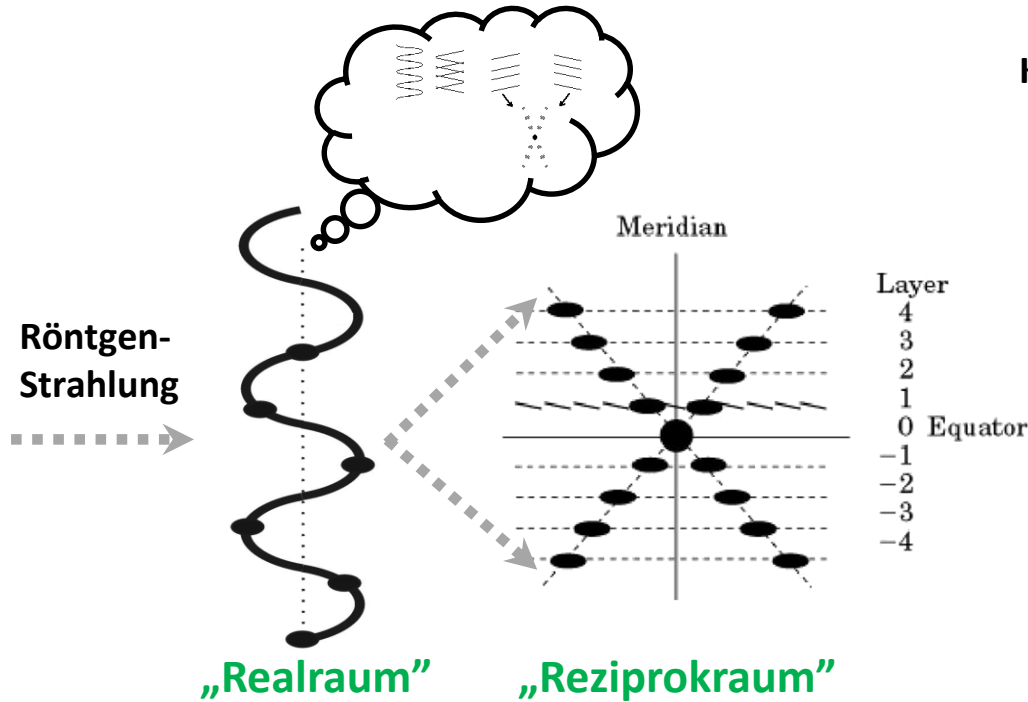
$\theta$ : Beugungswinkel

$\lambda$ : Wellenlänge

$d \sim \frac{1}{\theta}$  strukturspezifische Information  
(im Bereich von 0,01-0,1 nm)

„Reziprokraum“  
 $\frac{1}{\theta}$

# Röntgendiffraktion an DNS

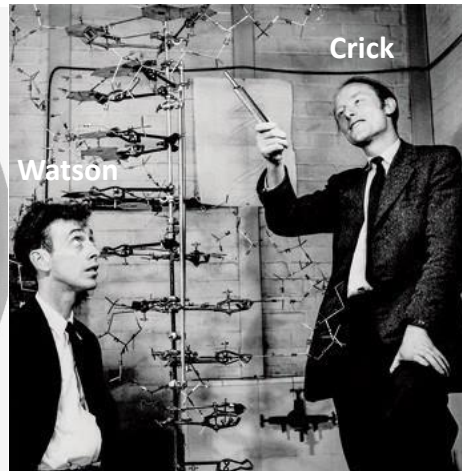
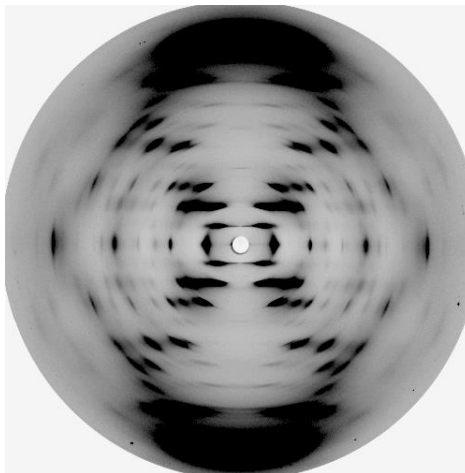
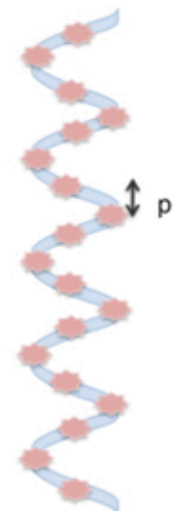


Kontinuierliche  
Helix



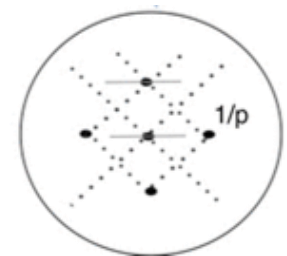
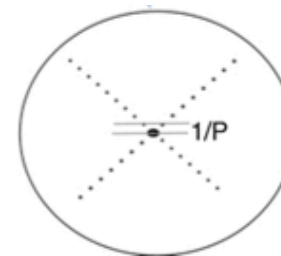
„Realraum“

Diskontinuierliche  
Helix



Diffraktionsbilder

„Reziprokraum“





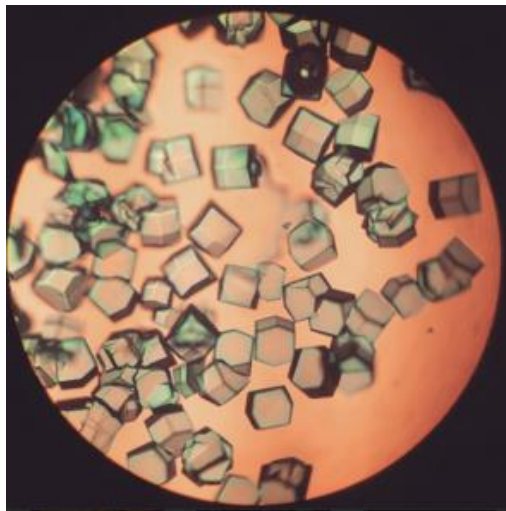
# Röntgendiffraktion – weitere Beispiele

<https://www.rcsb.org/>

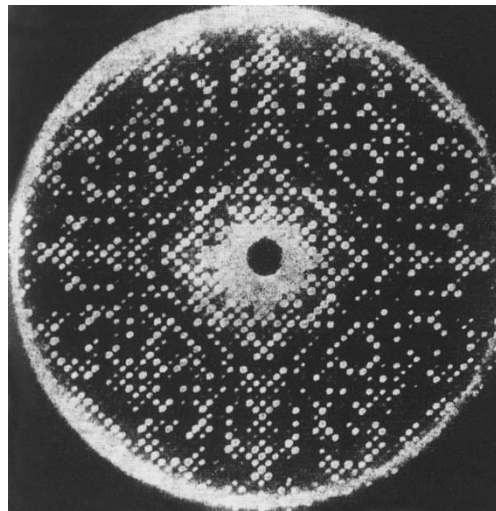


The screenshot shows the top navigation bar of the RCSB Protein Data Bank website. On the left, the logo 'RCSB PDB PROTEIN DATA BANK' is displayed. To its right, a red box highlights two statistics: '212,061 Structures from the PDB' and '1,068,577 Computed Structure Models (CSM)'. Further right is a search bar with the placeholder text 'Enter search term(s), Entry ID(s), or sequence'. Below the search bar are links for 'Advanced Search' and 'Browse Annotations'. On the far right, there is a toggle for 'Include CSM' and a 'Help' link. The bottom of the header features a row of logos for 'PDB-101', 'PDB', 'EMDataResource', 'NAKB', 'wwPDB Foundation', and 'PDB-Dev', followed by social media icons for Facebook, Twitter, YouTube, and LinkedIn.

**Lysozym  
Kristalle**



**Diffraktionsbild**



**3D-Struktur**

