

Strukturuntersuchungsmethoden in der Medizin und in der zahnärztlichen Materialwissenschaft.

Balázs Kiss

kissb3@gmail.com



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

04. November 2024.

Überblick: Strukturuntersuchungsmethoden in der zahnmedizinischen Forschung

1. Spektroskopische Verfahren

- a) Fluoreszenzspektroskopie
- b) Absorptionsspektroskopie
- 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)

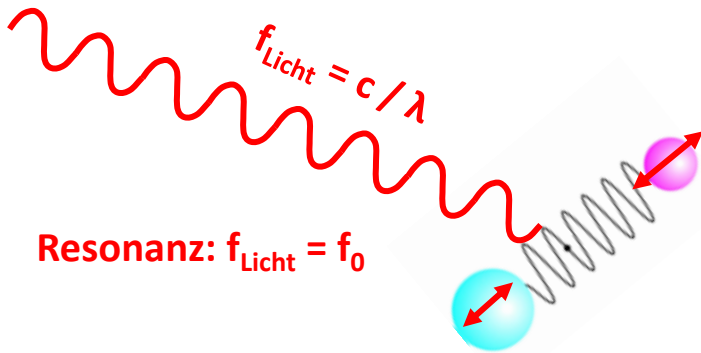
3. Diffraktionsmethoden

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

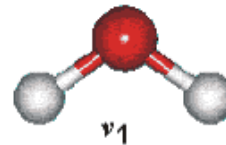
Infrarotspektroskopie

- Infrarotes Licht (IR): $\lambda = 800 \text{ nm} - 1000 \text{ }\mu\text{m}$
- Ein Typ der Absorptionsspektroskopie
- IR-Lichtabsorption induziert **Molekülschwingungen** \longrightarrow **Molekülstruktur**

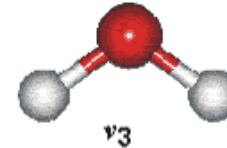
Nahe IR (NIR oder IR-A): 800 nm – 2,5 μm
Mittleres IR (MIR oder IR-B): 2,5-50 μm
 Ferne IR (FIR oder IR-C): 50 μm – 1000 μm



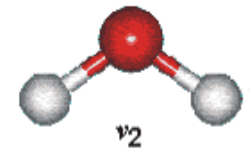
Beispiel:
 H_2O
 Molekül



Symmetrische Valenzschwingung

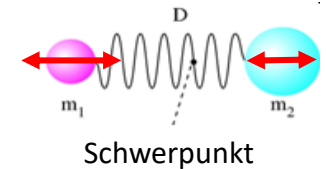
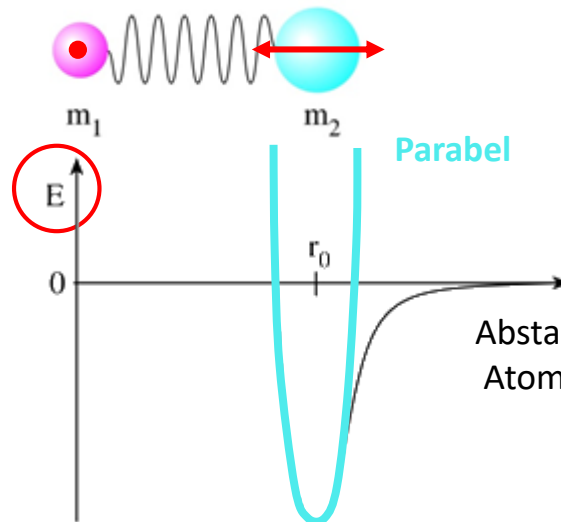


Antisymmetrische Valenzschwingung



Deformations-schwingung

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



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

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

$$D \sim 1000 \text{ N/m}$$

$$f_0 \sim 5 \cdot 10^{13} \text{ Hz}$$

- 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

Anwendung: Identifizierung der Moleküle, Beweis des Raumstrukturs

Statt Wellenlänge verwendet man die **Wellenzahl** (ν , Reziprok der Wellenlänge):

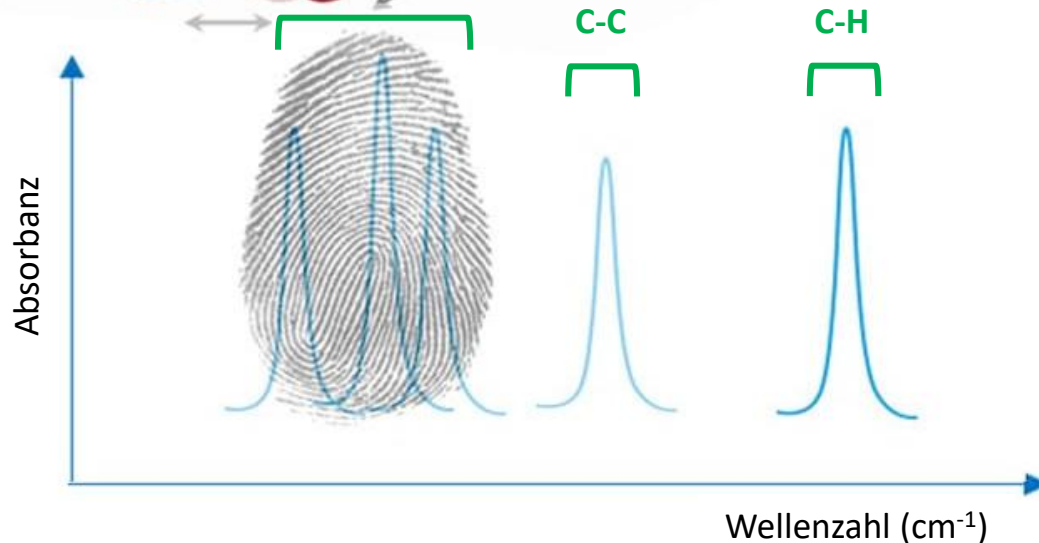
$$\nu = \frac{1}{\lambda}$$

ν : [m^{-1} , cm^{-1}]

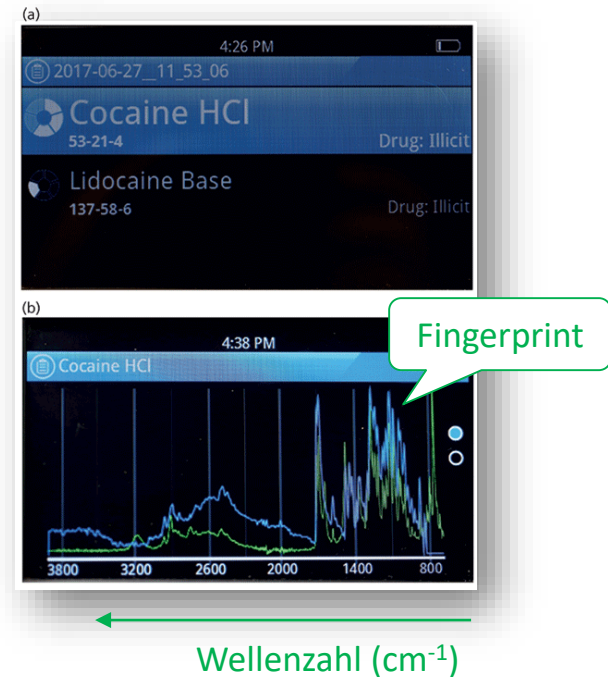
direkt proportional zur Photonenenergie

molekül-
spezifisch

Fingerprint
Region

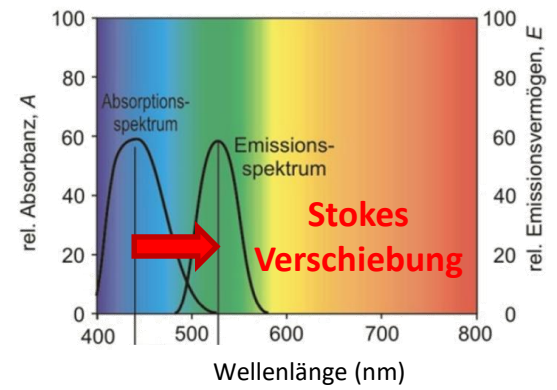
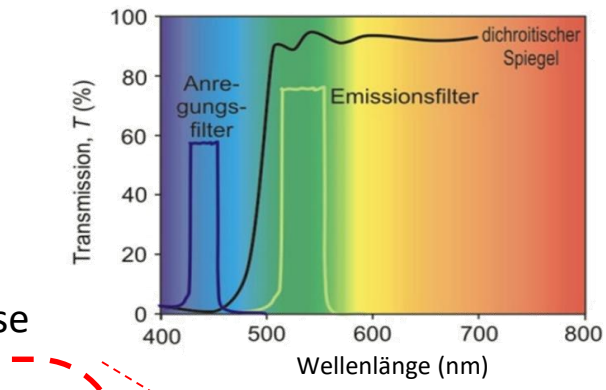
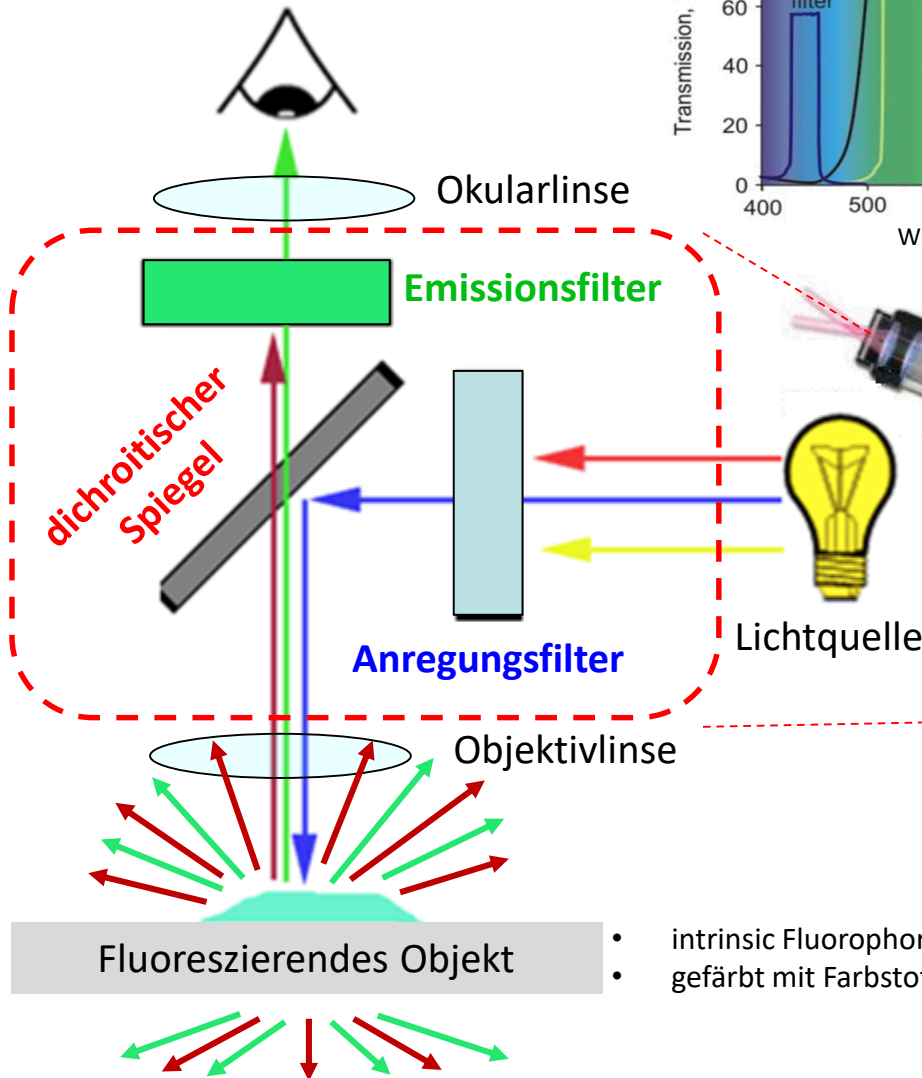


Identifizierung der Moleküle
mithilfe einer Spektrumbibliothek

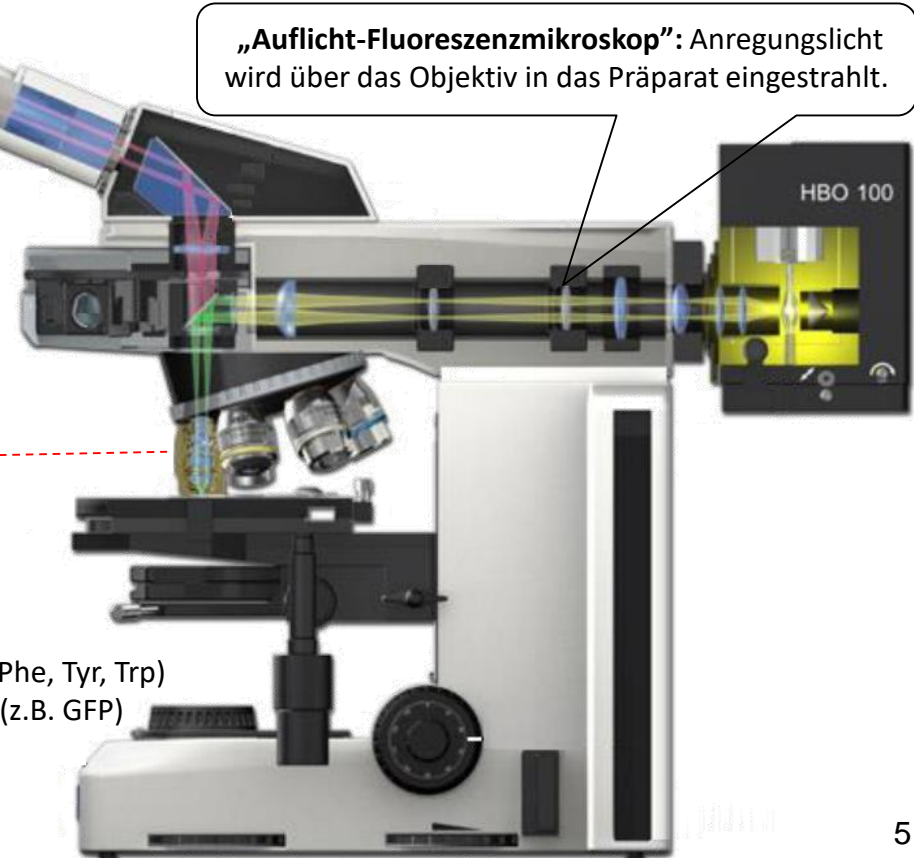


Fluoreszenzmikroskop

Epifluoreszenz-Anordnung

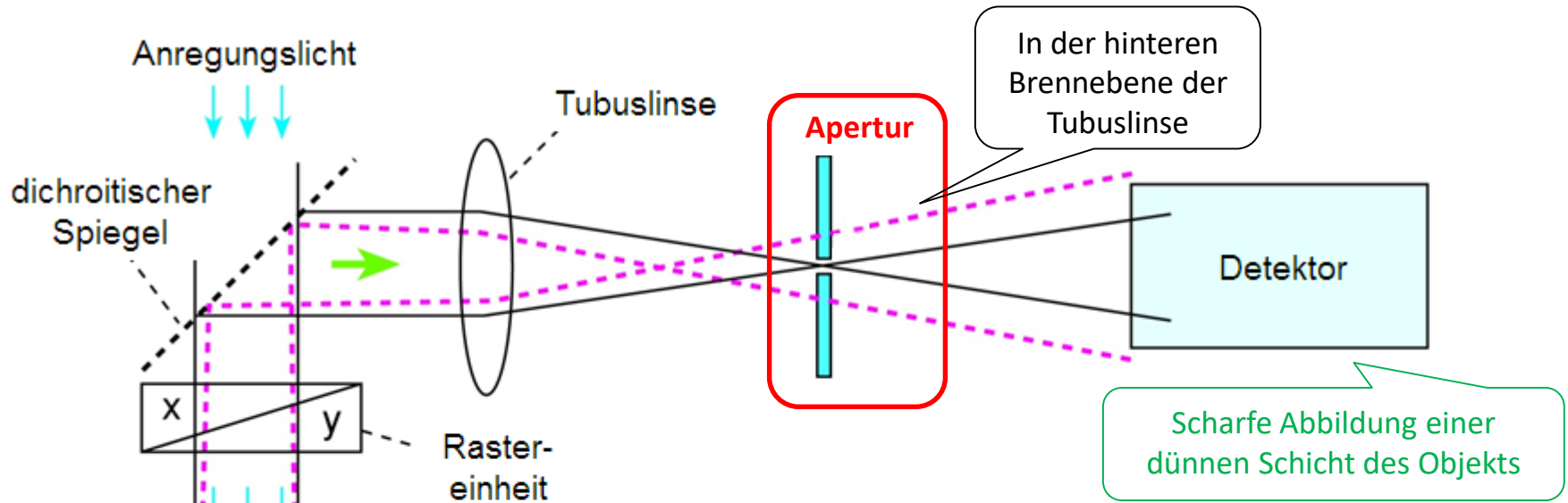


„Auflicht-Fluoreszenzmikroskop“: Anregungslicht wird über das Objektiv in das Präparat eingestrahlt.

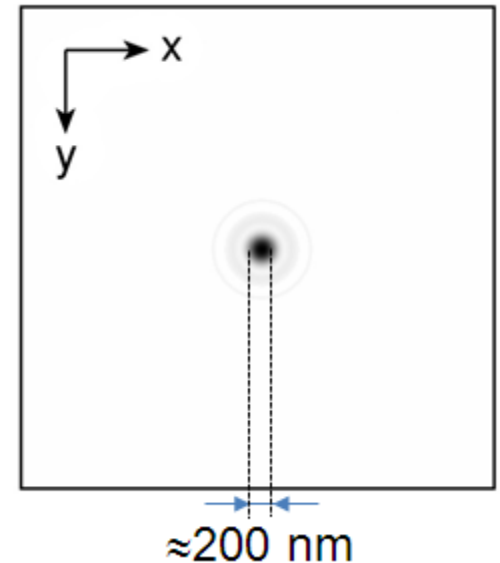
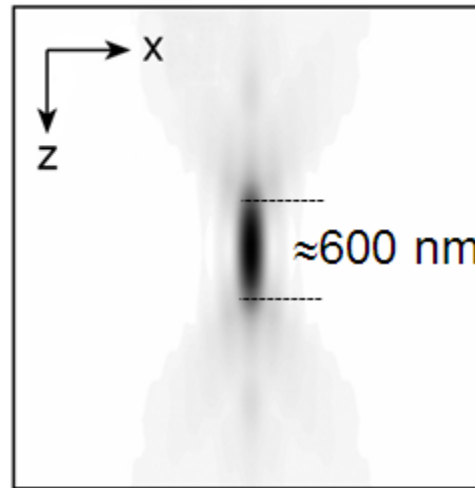


- intrinsic Fluorophor (Phe, Tyr, Trp)
- gefärbt mit Farbstoff (z.B. GFP)

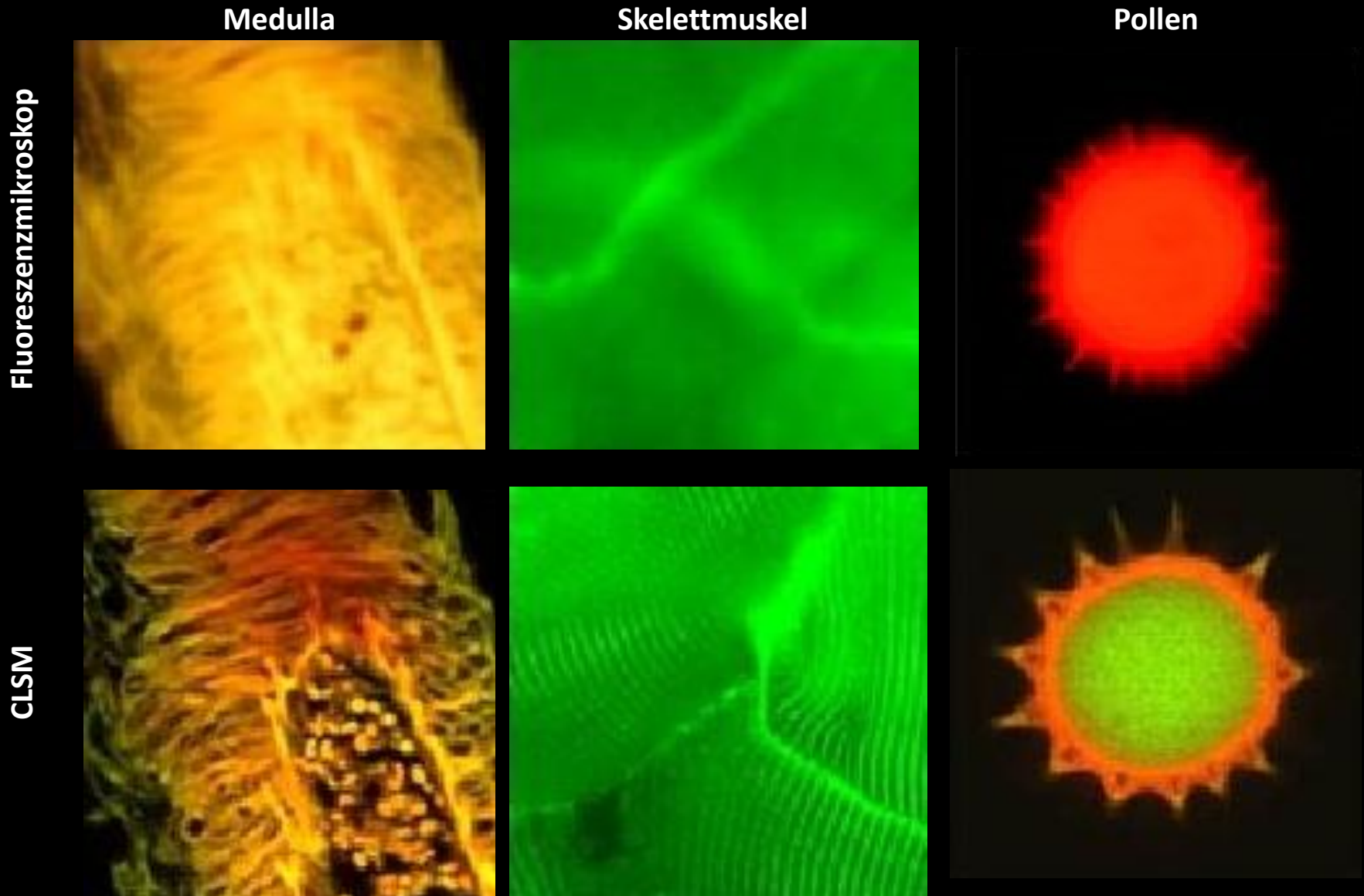
Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)



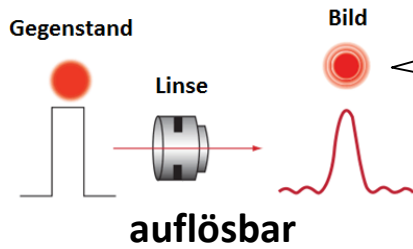
Größe des konfokalen Volumenelements



Vergleichung von CLSM und Fluoreszenzmikroskop



Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops

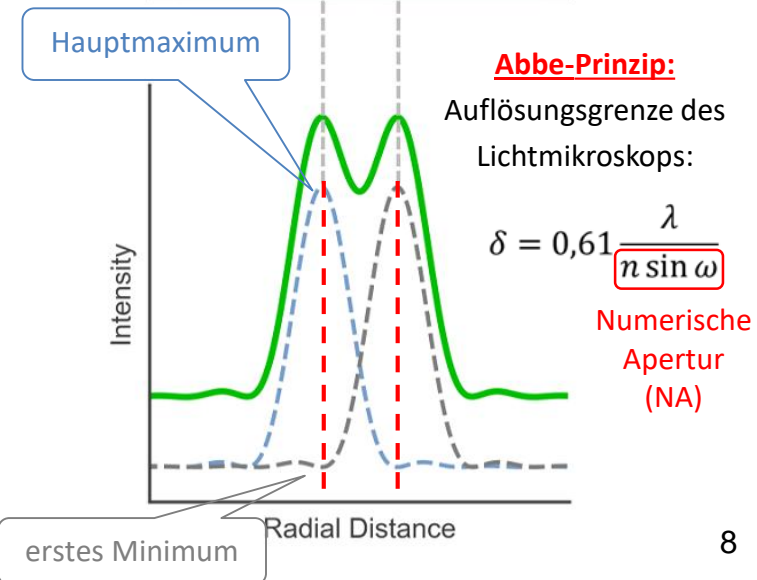
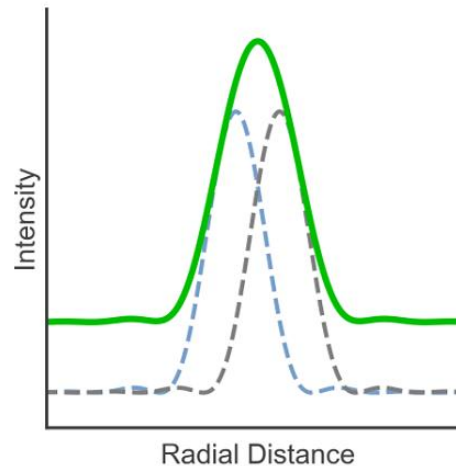
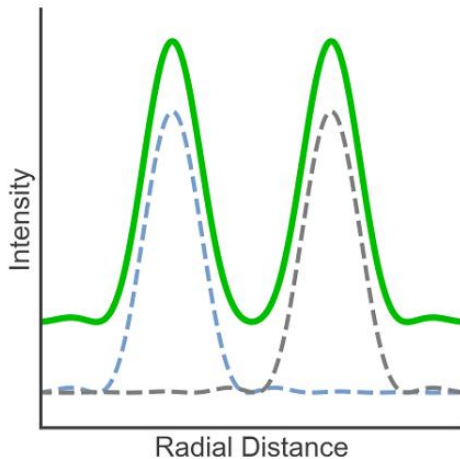
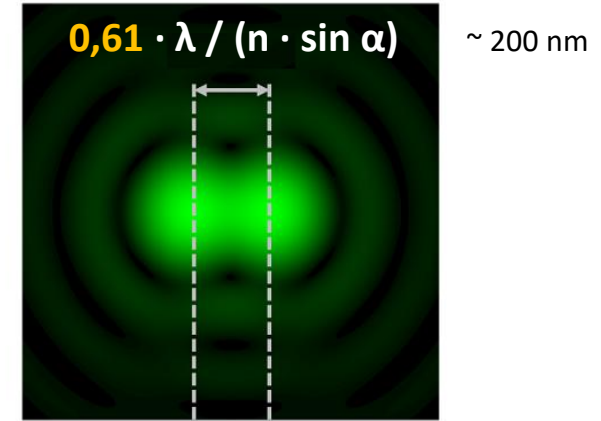
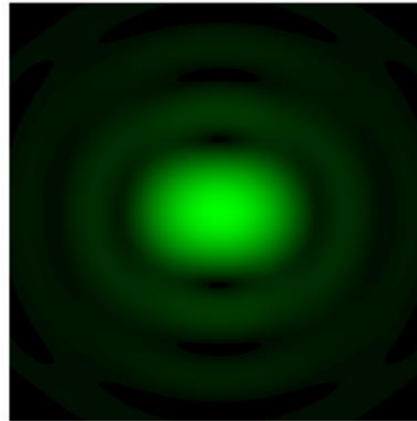
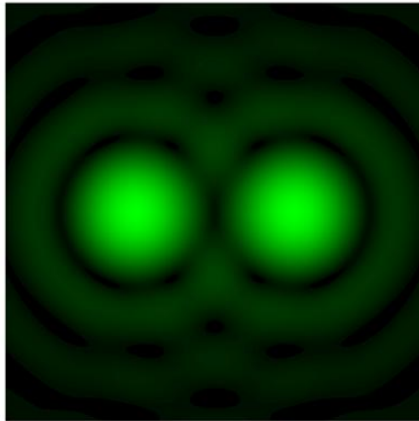


Airy-Scheibe:
zentrales Maximum, umgeben von
Ringen abnehmender Intensität
wegen der Beugung des Lichtes

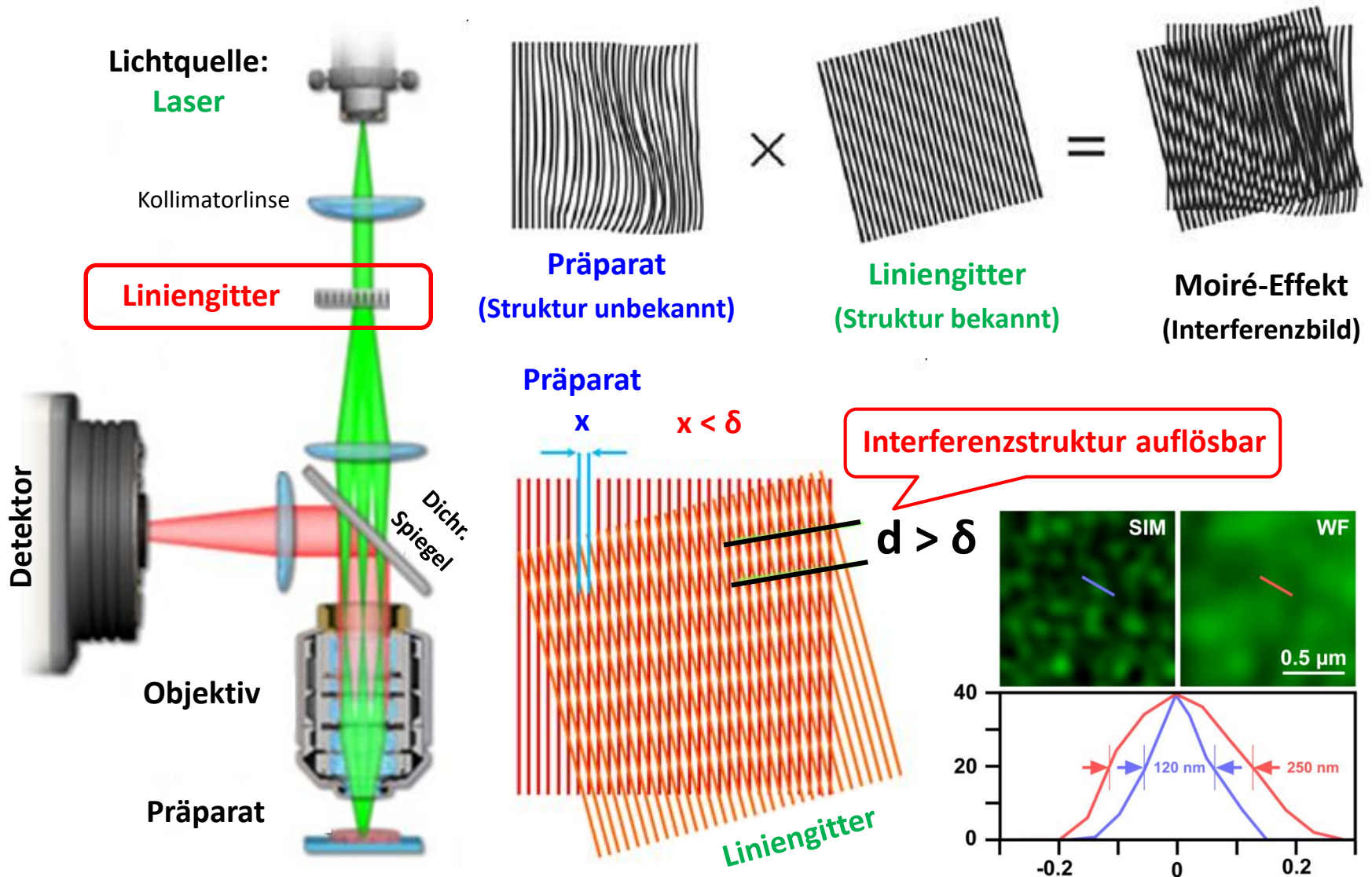
nicht mehr auflösbar

Rayleigh-Grenzfall:

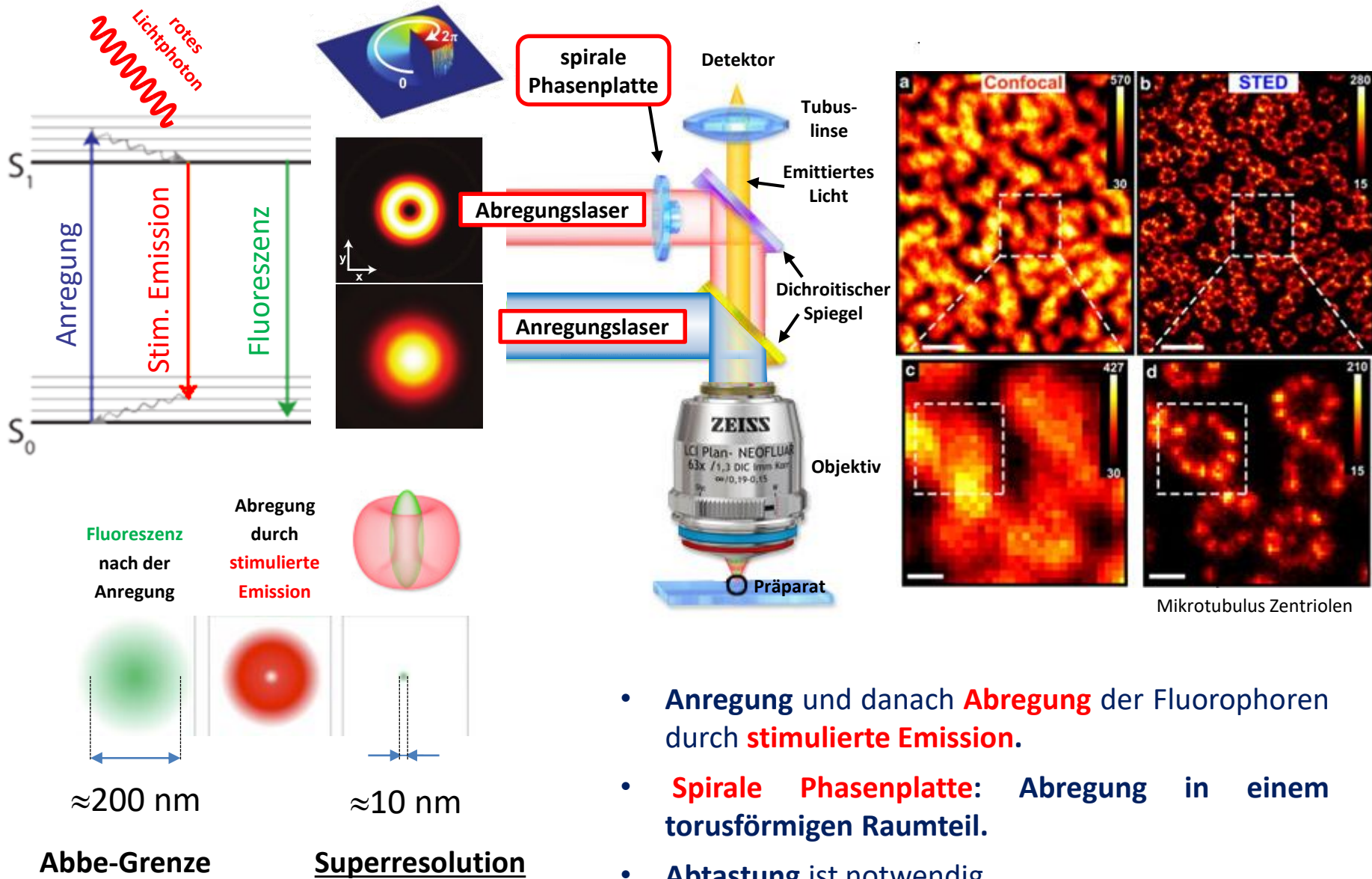
Hauptmaximum stimmt mit dem
ersten Minimum der
benachbarten Beugungsscheibe



Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung, Structured Illumination Microscopy (SIM)



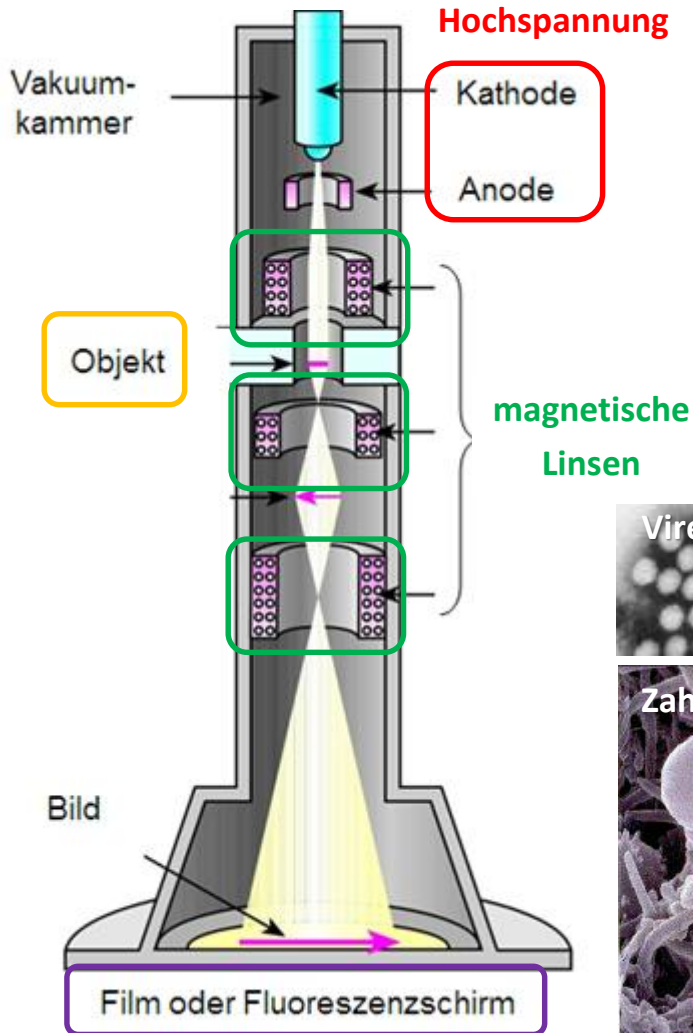
Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)



- **Anregung** und danach **Abregung** der Fluorophoren durch **stimulierte Emission**.
- **Spirale Phasenplatte**: Abregung in einem torusförmigen Raumteil.
- **Abtastung** ist notwendig.

Elektronenmikroskope

Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM)



Auflösungsgrenze (δ):

$$\delta \approx \frac{\lambda}{NA}$$

$$NA \approx 0,03$$

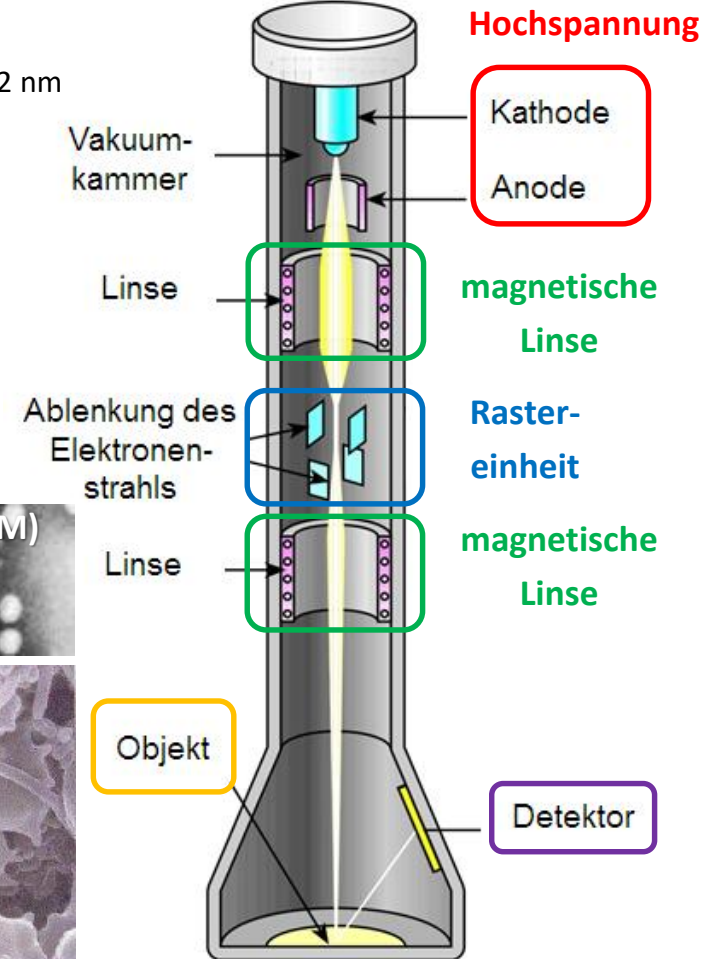
$$\lambda \approx 0,005 \text{ nm}$$

$$\delta \approx 0,2 \text{ nm}$$

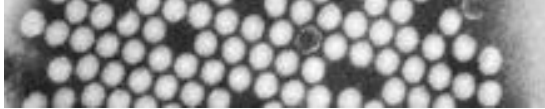
de Broglie
Wellenlänge von
Materiewellen

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

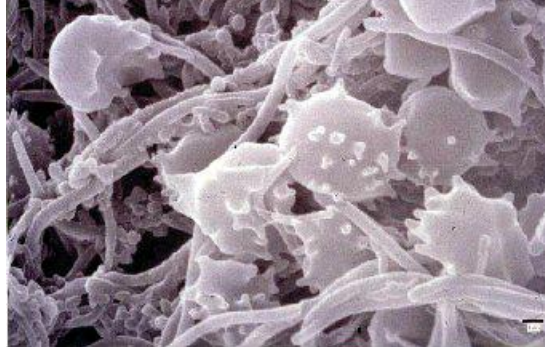
Raster-Elektronenmikroskop (SEM)



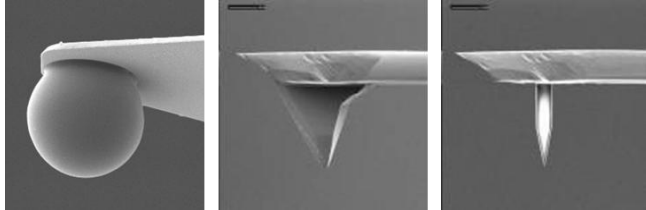
Viren der Kinderlähmung (TEM)



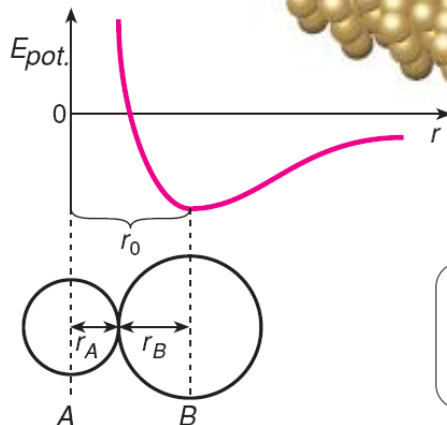
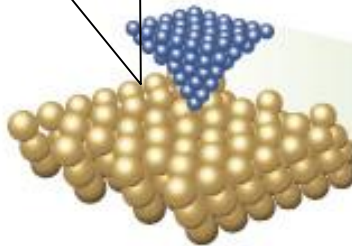
Zahnplaque (SEM)



Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM)

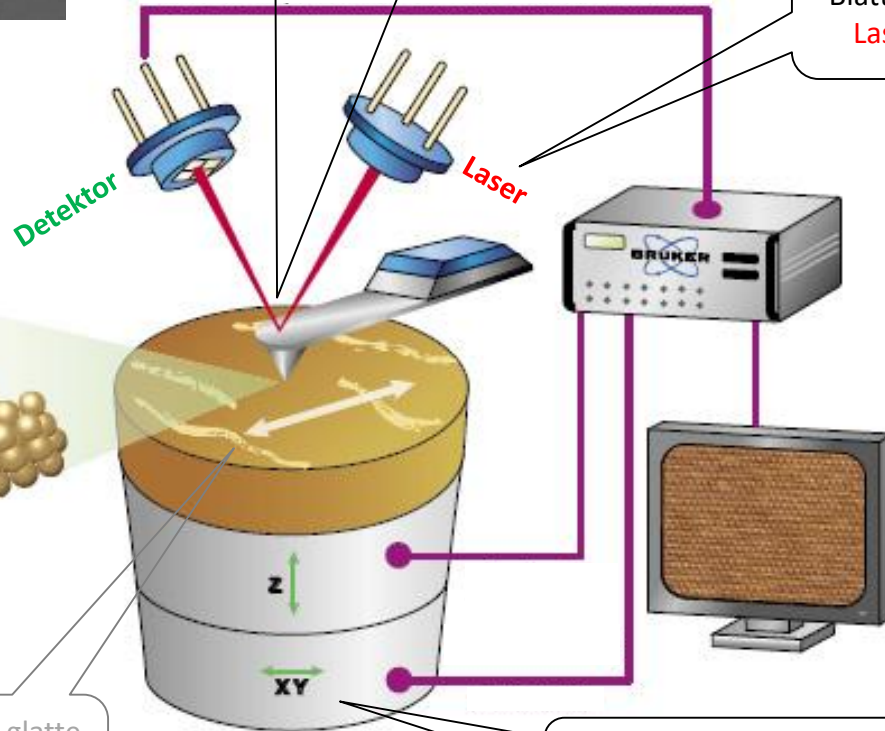


1. Van der Waals Wechselwirkung zwischen der Atome der Nadel und des Präparats.

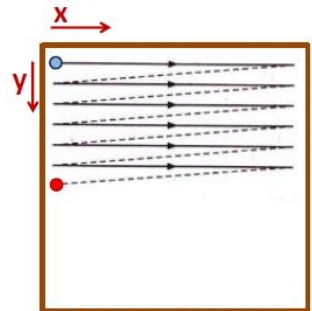


2. Die Blattfeder wird wegen der Van der Waals Kräfte verbogen.

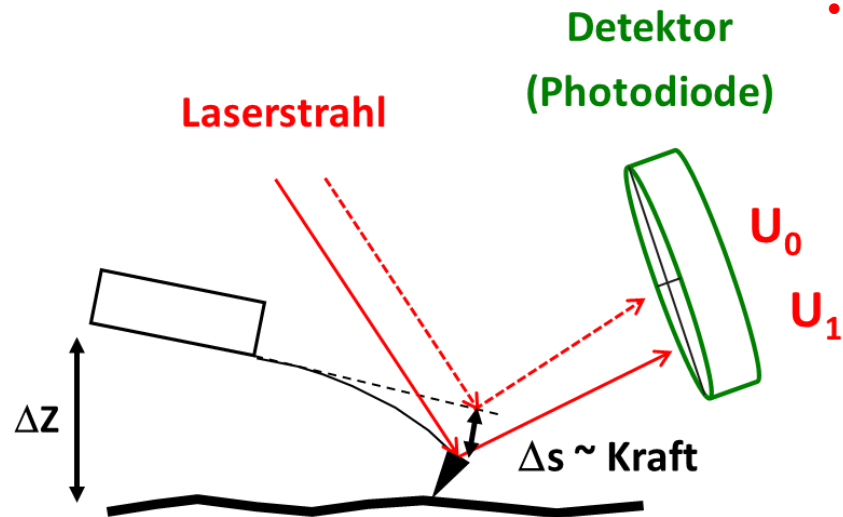
3. Die Verbiegung einer Blattfeder wird mit einem Laserstrahl gemessen.



4. Rasterprinzip: die Probe (oder das Präparat) wird in X-Y-Z Richtungen bewegt.



AFM Betriebsarten



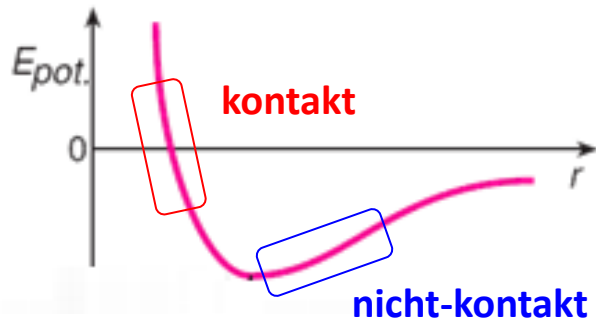
Van der Waals Kraft

$F = D \cdot \Delta s$ (Hookesches Gesetz)
 Δs : Abbiegung der Blattfeder
 D: Federkonstante

- **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.

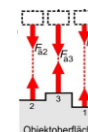
- **Die topographische Information** (zB. Höhe) wird in jedem X-Y Bildpunkt aus der ΔZ Höhenänderung des Cantilevers errechnet.



- **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.

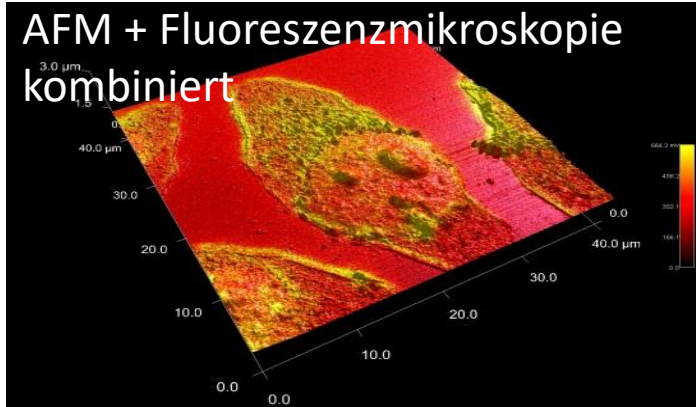
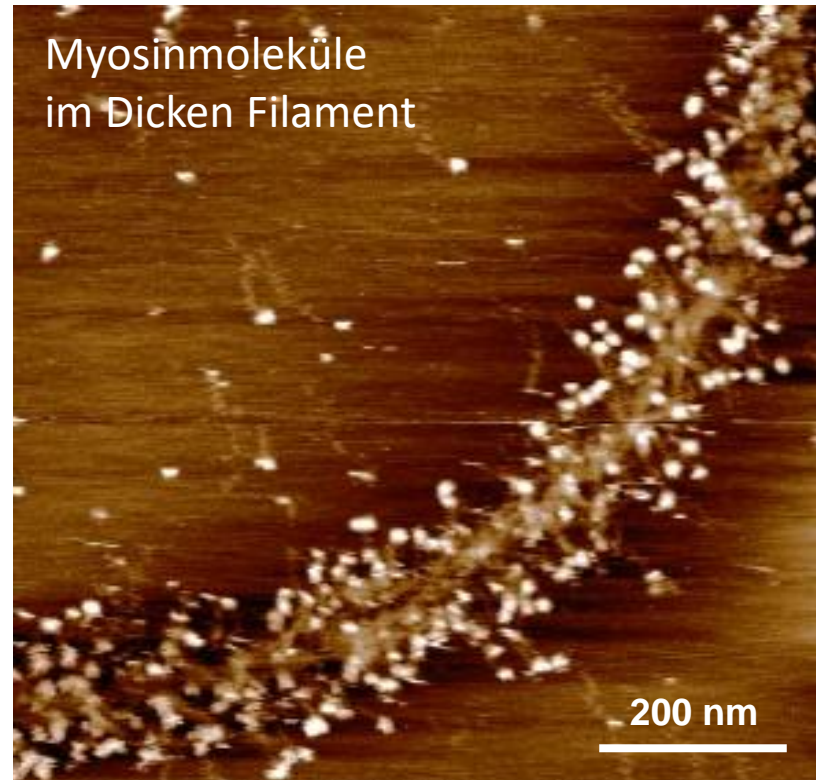
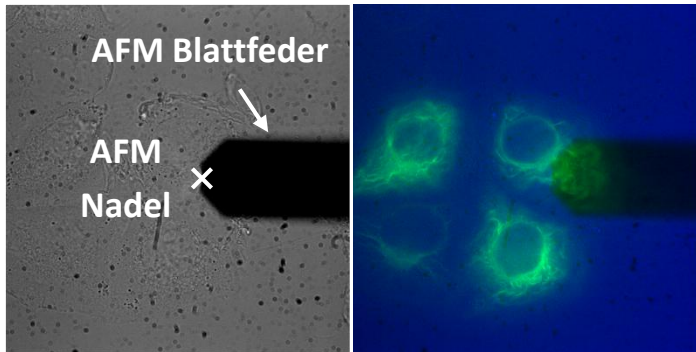
- **Z-Rückkopplung:** sorgt für eine **konstante Amplitude** mit der ΔZ Höhenänderung des Cantilevers.

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

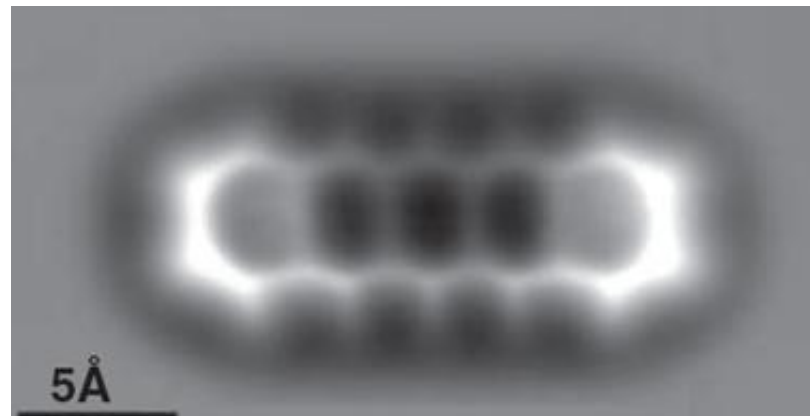
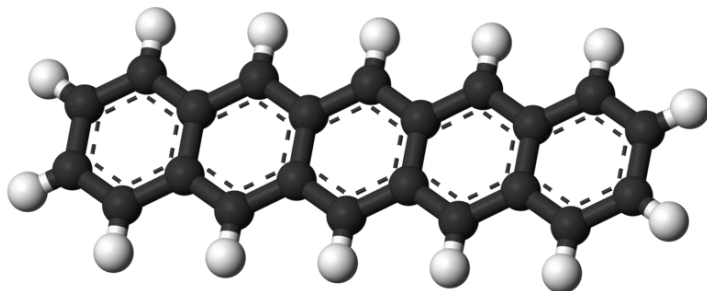


s. Praktikum
 „Resonanz“

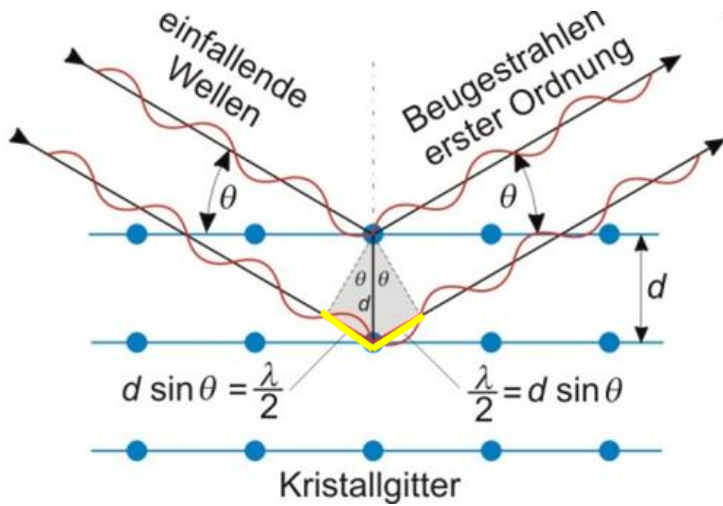
AFM-Bilder



Pentacen Molekül



Röntgendiffraktion



Bragg-Gleichung:

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

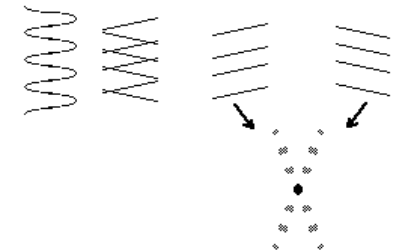
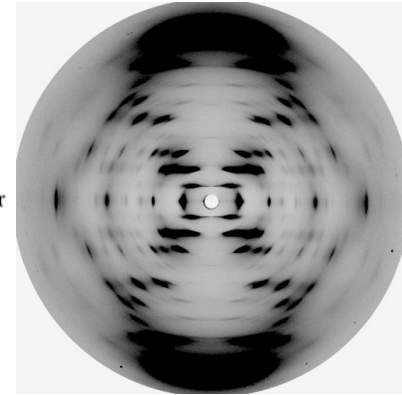
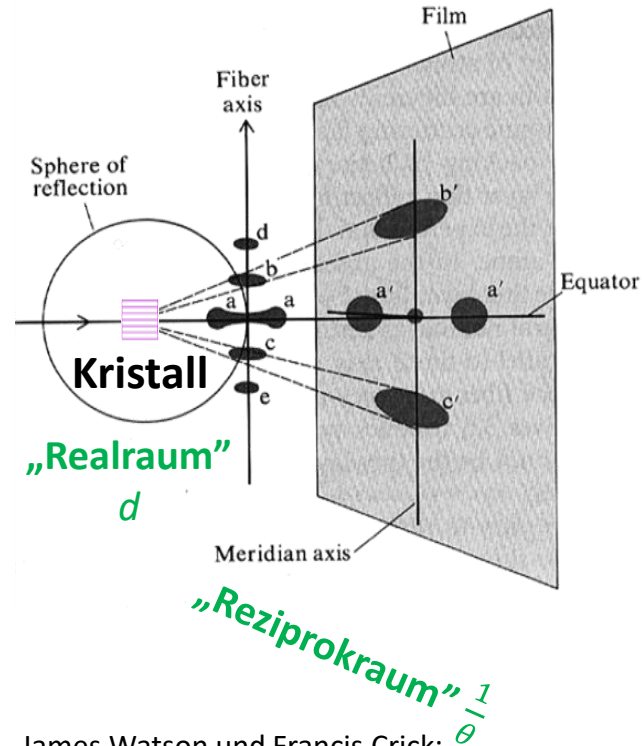
d : Gitterabstand

θ : Beugungswinkel

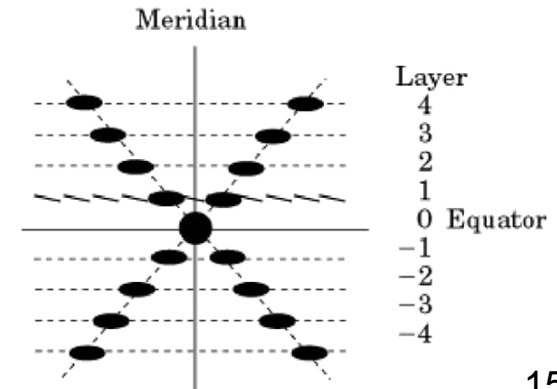
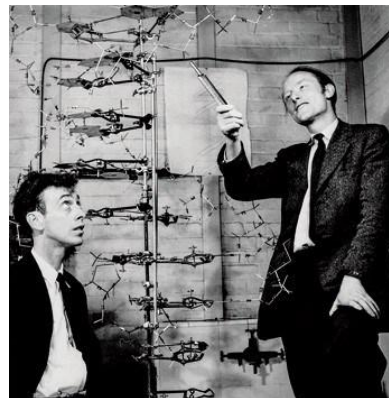
λ : Wellenlänge

$$d \sim \frac{1}{\theta}$$

**strukturspezifische Information
im Bereich von 0,01-0,1 nm**



James Watson und Francis Crick:
Doppelhelix-Struktur der DNA



Hausaufgaben

Aufgabensammlung

10.1-3, 10.9, 10.10

Feedback