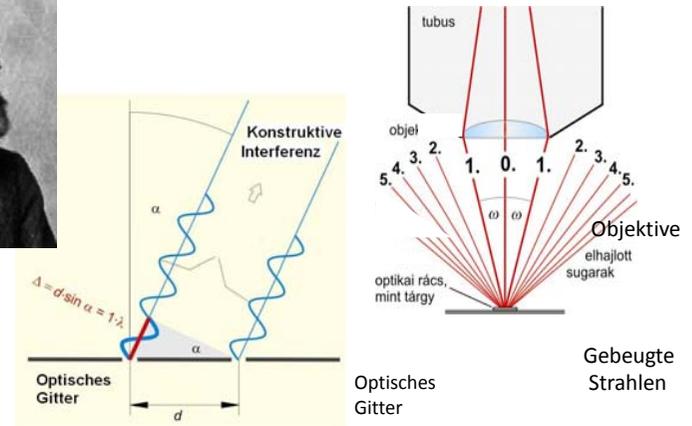
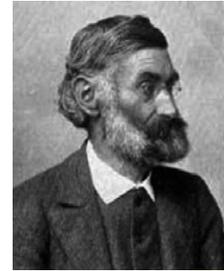


Methoden der Strukturenuntersuchung

Lichtmikroskopische Techniken
 Rastermikroskope
 Elektronmikroskope
 Diffraktionsmethode

Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops



Auflösungsgrenze: $\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin\omega)$

Mit $\lambda=400 \text{ nm}$, $n=1,6$ und $\omega \approx 90^\circ$ ist $d \approx 150 \text{ nm}$

Typische Größen

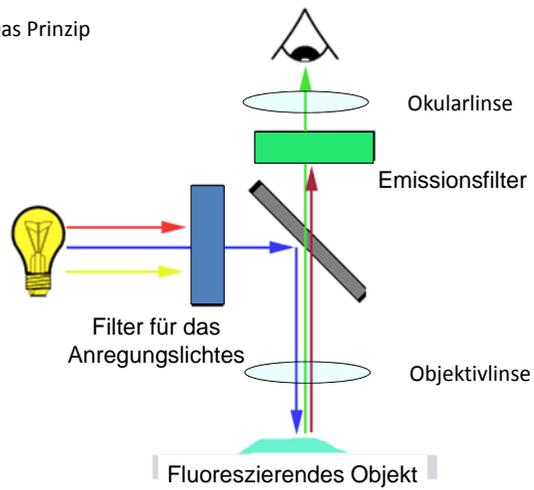
m			
10^0	meter	Mann	
10^{-3}	millimeter	Abstand der man mit Auge sehen kann	
10^{-6}	mikrometer	Zelle (z.B. Blutkörpern)	
10^{-9}	nanometer	Protein	
10^{-10}	– Angström	Durchmesser des Atoms, H Atom $\varnothing \approx 1 \text{ Angström } (\text{Å})$	
10^{-12}	pikometer	Wellenlänge der Röntgenstrahlung	
10^{-15}	fentométer	Atomkern	

Spezielle Lichtmikroskopische Techniken

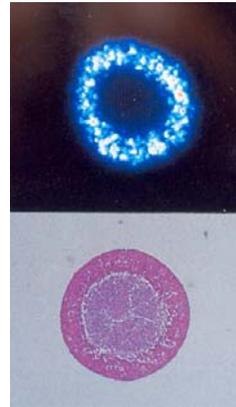
- Siehe Praktikum
- Konfokale Mikroskopie
- Zweiphotonenmikroskop
- Fluoreszenzkorrelationsmethode

Fluoreszenzmikroskop

Das Prinzip

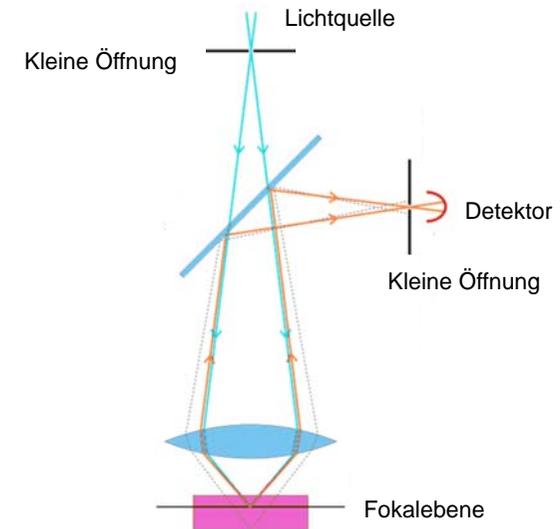


ATP-Verteilung
visualisiert mit Luciferin



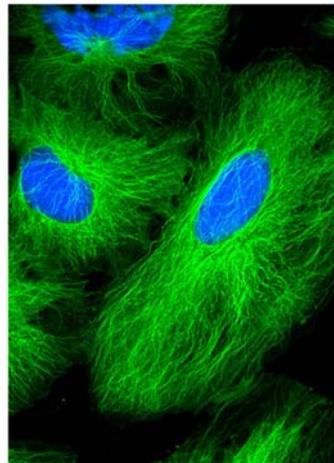
Konventionelle mikroskopische Aufnahme

Konfokales Mikroskop



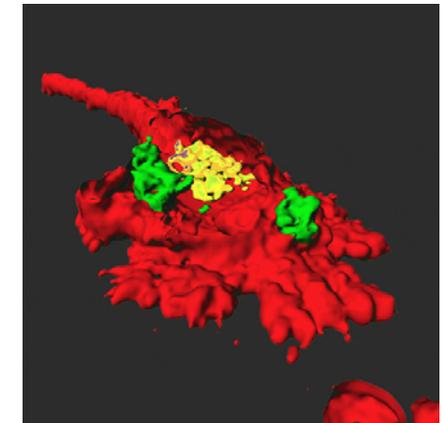
Konfokales Mikroskop

Aus Tubulin bestehende
Mikrotubuli in Zellen



Konfokales Mikroskop

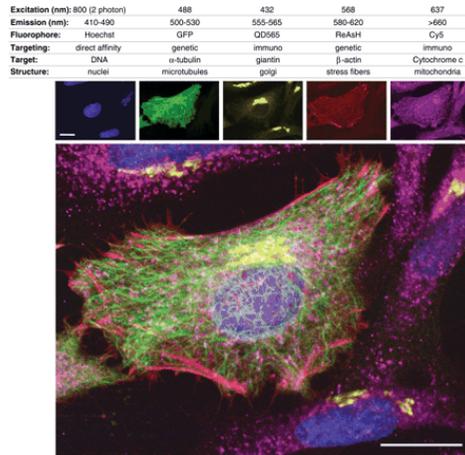
Dendritische Zelle mit
Pollenteilchen.
3D Aufnahme mit konfokalem
Mikroskop.



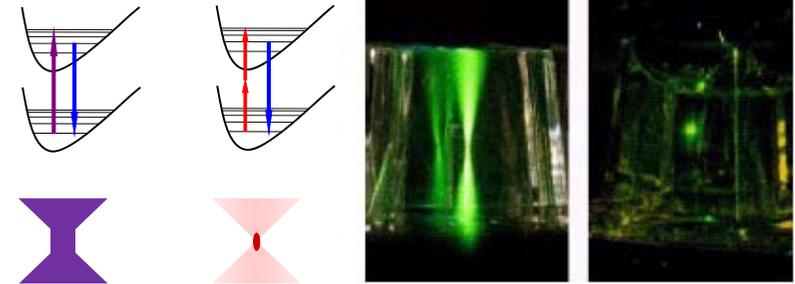
Gleichzeitige Anwendung von mehreren fluoreszierenden Markierungen

He-La Zellen markiert mit fünf unterschiedlichen Fluoreszenzmethoden.

Der Masstab ist 20 μm .



Fluoreszenzanregung mit zwei Photonen Zweiphotonenmikroskop

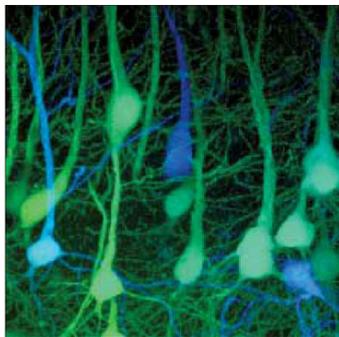


IR Laser

Fluoreszenzemission bei Einphoton- und Zweiphotonenanregung.

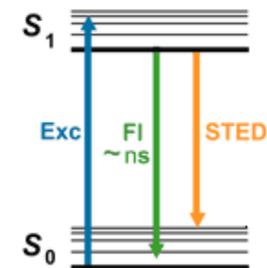
Auflösung!

Zweiphotonenmikroskopie

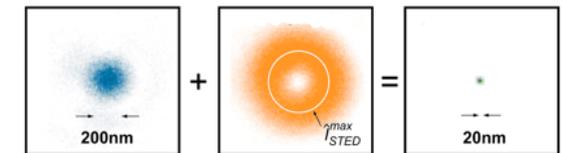


Visual Cortex von genetisch manipulierten Mause die GFP produzieren.

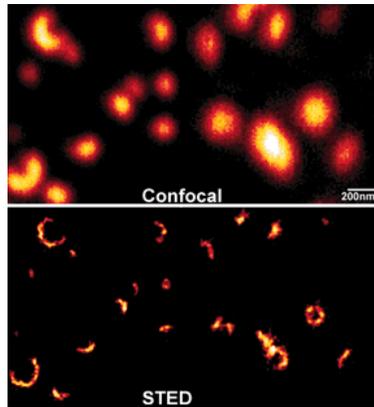
STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop



Stefan Hell (Nobelpreis 2014)

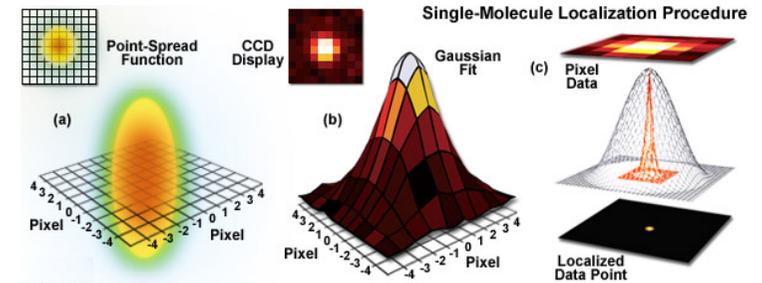


STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop

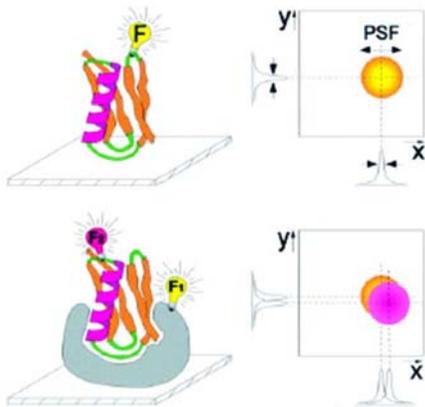


Reorganization des Synaptophysins in synaptischen Vesikeln

STED: Lokalisation



STED: Lokalisation und Kolokalisation

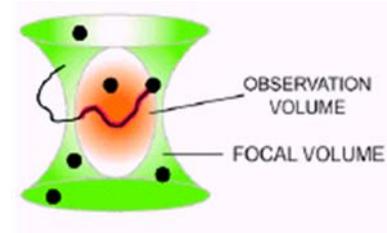


Die Position des Eiweisses kann mit nm Genauigkeit angenommen werden.

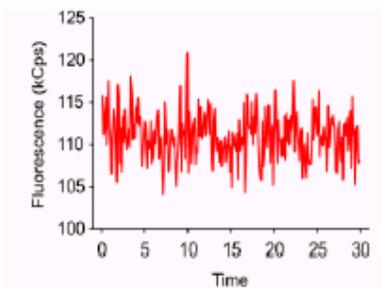
Kolokalisation bedeutet nicht unbedingt eine Wechselwirkung!

Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)

Fluktuation der Moleküle in einem sehr kleinen Volumen:
 Konzentration: 10 nM
 Anzahl der Moleküle in Beobachtungsvolumen beträgt durchschnittlich: 6



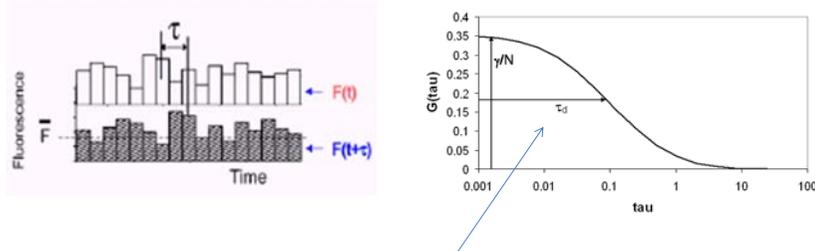
Fluktuationen des Fluoreszenzlichtes:



Ähnlich zur dynamischen Lichtstreuung, aber mit Fluoreszenz

FCS: Autokorrelationsfunktion

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1$$



τ_d – charakteristische Zeit der Diffusion eines Moleküls

Diffusionskonstante ist abhängig von der Molekülgröße!

FCS: Welche Information kann man erhalten?

Ligandenbindung

Kleines Ligandmolekül mit Fluoreszenzmarkierung + großes Eiweißmolekül: **Diffusionskonstante** ändert sich

Aggregation

Markierte Proteine: **Lichtintensität** von Dimere, Tetramere... ist höher

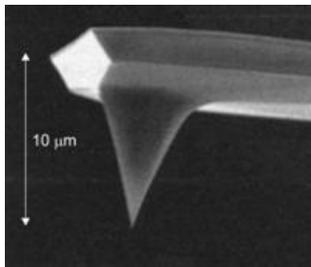
Konzentration

Reaktionsgeschwindigkeit

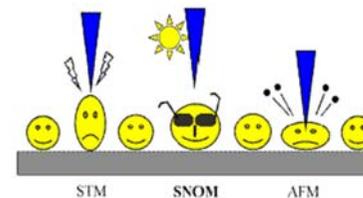
Diffusion in der Inneren der Zellen

Die Autokorrelationsfunktion muss zu einer Modellfunktion angepasst werden um diese Informationen aus der Parametern der angepasste Funktion zu erhalten.

RASTERSONDENMIKROSKOPE



Rastermikroskope (Scanning Probe Microscopes)



STM:

Scanning Tunneling Microscope
Rastertunnelmikroskop

SNOM:

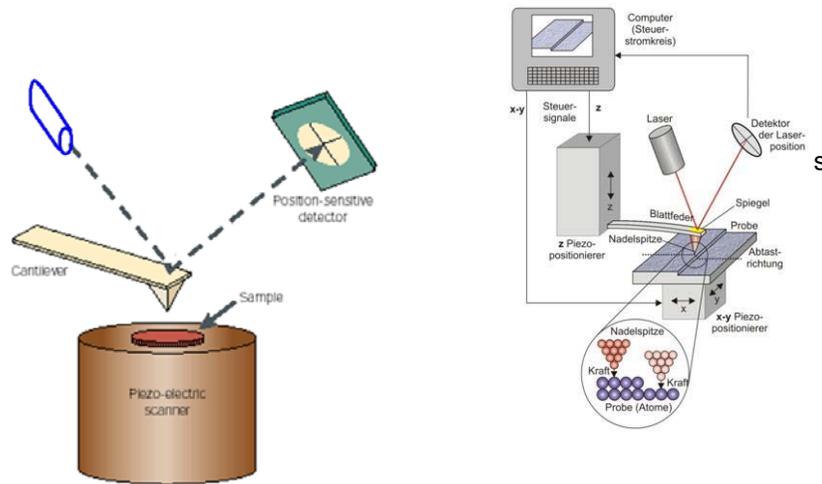
Scanning Nearfield Optical Microscope

AFM:

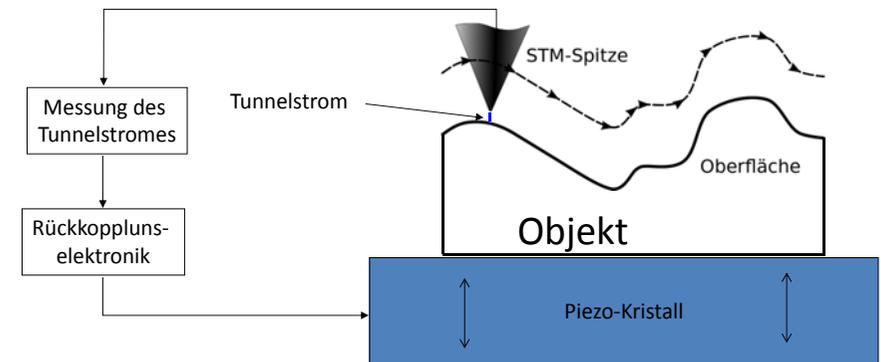
Atomic Force Microscope
Rasterkraftmikroskop
(Atomkraftmikroskop)

Das Rastertunnelmikroskop wurde in 1981 von Heinrich Rohrer és Gerd K. Binnig entwickelt. Fünf Jahre später sie erhalten den Nobel-Preis.

Rasterkraftmikroskop (Atomkraftmikroskop) (Atomic Force Microscope-AFM)



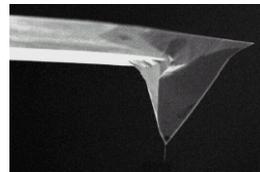
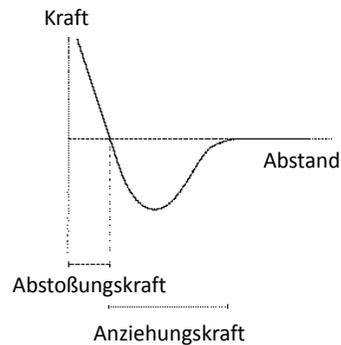
Rastertunnelmikroskop



Der Tunnelstrom ist konstant gehalten mit der vertikalen Bewegung des Objektes.

Die Kraft zwischen der Nadel und dem Objekt

- eine sehr spitze, nadelartige Sonde
- Krümmungsradius bei der Spitze $\approx 10\text{-}20\text{ nm}$ \Rightarrow x-y Auflösung!



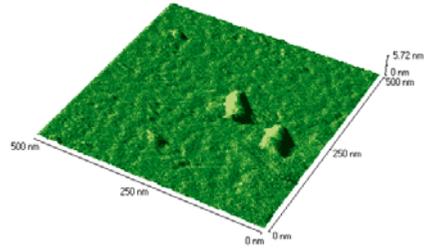
AFM Messmethoden



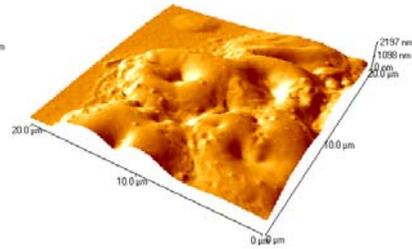
- Kontakt-Modus
- Der intermittierende Modus
(engl.: *intermittent contact mode*, oder *tapping mode* genannt)

AFM Aufnahmen

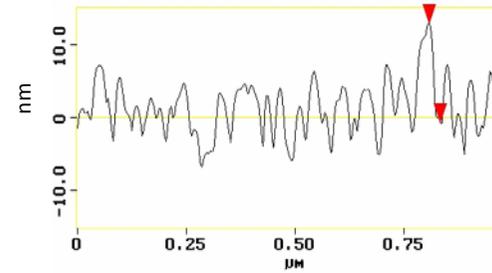
Hitzeschockproteine



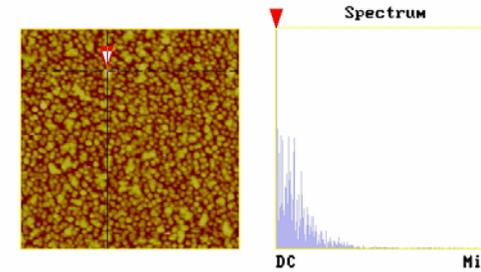
Rote blutzellen



AFM Aufnahmen

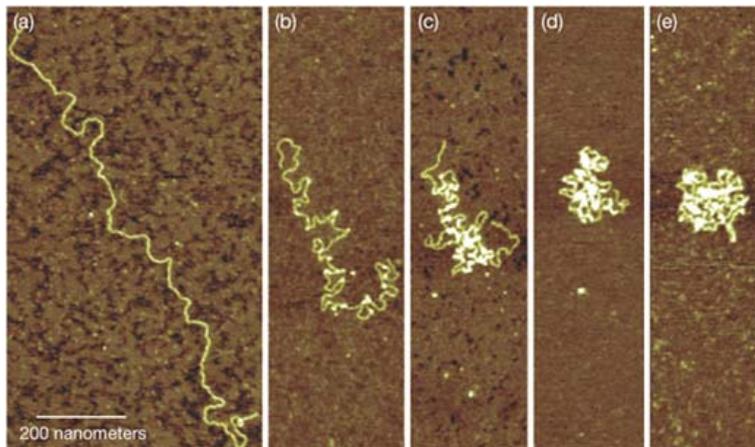


Alpha-Crystallin
Aggregate



acryins1.004

DNS

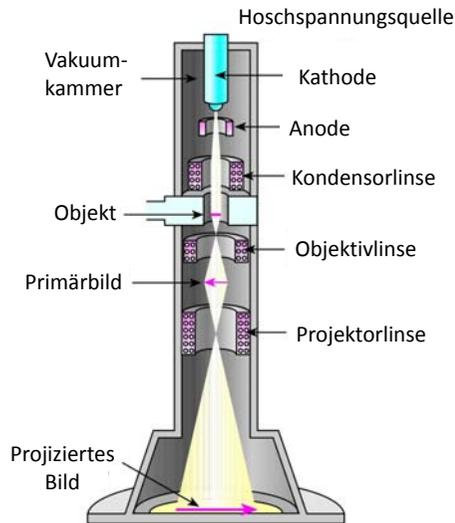


Progressive images from atomic force microscopy show the compaction of DNA caused by a protein called AbF2. (<https://www.llnl.gov/str/May04/DeYoreo.html>)

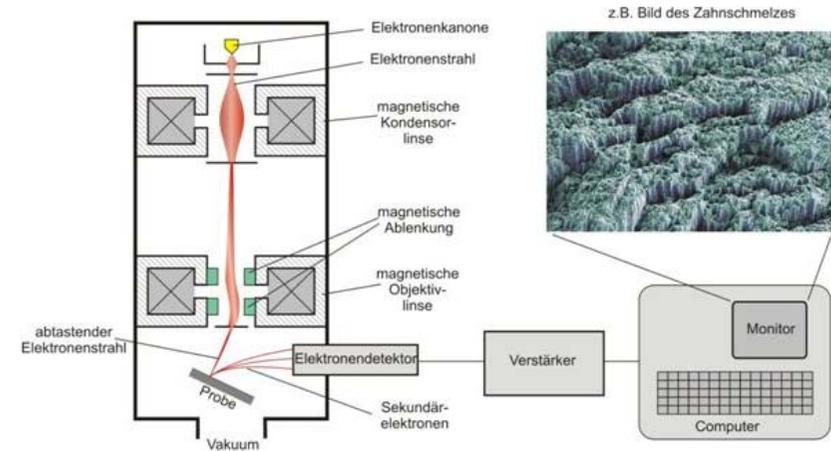
ELEKTRONENMIKROSKOPE

Transmissionselektronenmikroskop
Rasterelektronenmikroskop

Transmissionselektronenmikroskop



Rasterelektronenmikroskop



Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops Abbe'sches Prinzip und Materialwellen

Materialwelle: Zu einem Teilchen mit m Masse und v Geschwindigkeit, kann man eine Welle (Materiewelle)

zuordnen, die eine Wellenlänge von $\lambda = \frac{h}{mv}$ hat.

Die Geschwindigkeit des Elektrons nach einer Beschleunigung mit U Spannung beträgt:

$$v = \sqrt{\frac{2eU}{m}} \quad \text{womit:} \quad \lambda = \frac{h}{\sqrt{2emU}}$$

Typisch kann λ 5 pm sein. Aber ω ist sehr klein! $NA \approx 0,002$

$$\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin\omega) \approx \text{nm}$$

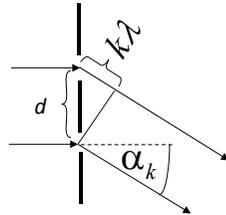
DIFFRAKTIONSMETHODE

Röntgendiffraktion

Anwendung der Röntgenstrahlung in Strukturanalyse der Materie.

Zur Erinnerung:
Diffraction des Lichtes

$$\sin \alpha_k = \frac{k\lambda}{d}$$



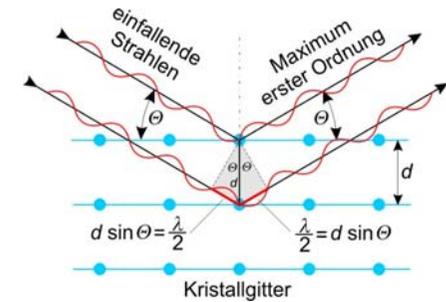
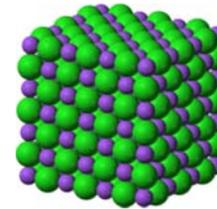
Röntgendiffraktion

Was für ein Gitter passt zur Röntgenstrahlung?

$$\lambda < d$$

λ_{Rtg} 10-100 pm

H ≈ 100 pm



$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Atomgitter → Kristall → auch DNS o. Proteinkristall!

Aufbau des Röntgendiffraktionsgerätes

