


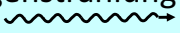



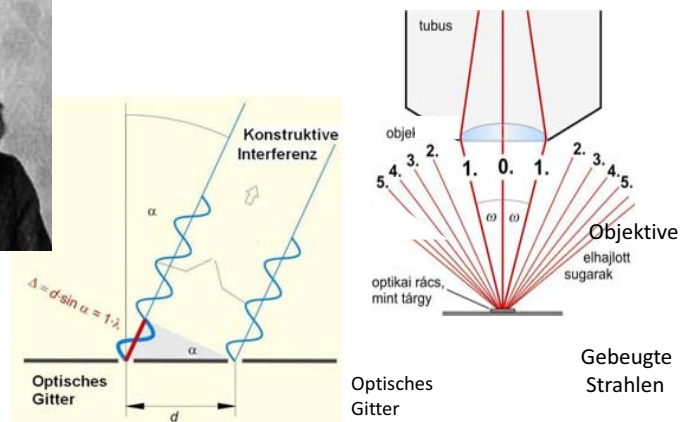
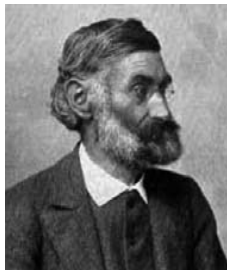
Methoden der Strukturenuntersuchung

Lichtmikroskopische Techniken
Rastermikroskope
Elektronmikroskope
Diffraktionsmethode

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 Ø ≈ 1 Angström (Å)	
10 ⁻¹²	pikometer	Wellenlänge der Röntgenstrahlung	
10 ⁻¹⁵	femtométer	Atomkern	

Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops



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

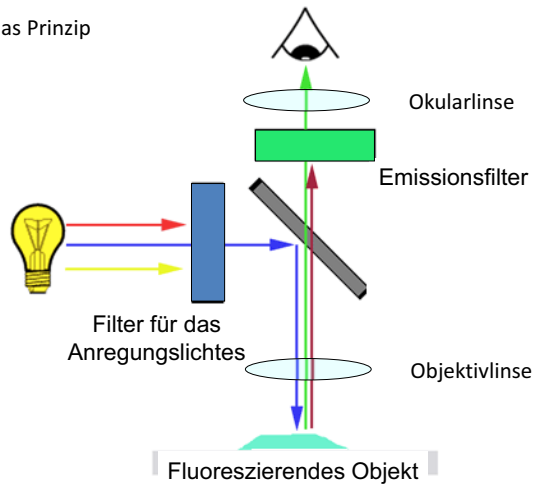
Mit $\lambda=400$ nm, $n=1,6$ und $\omega \approx 90^\circ$ ist $d \approx 150$ nm

Spezielle Lichtmikroskopische Techniken

- Siehe Praktikum
- Konfokale Mikroskopie
- Zweiphotonenmikroskop
- Fluoreszenzkorrelationsmethode

Fluoreszenzmikroskop

Das Prinzip

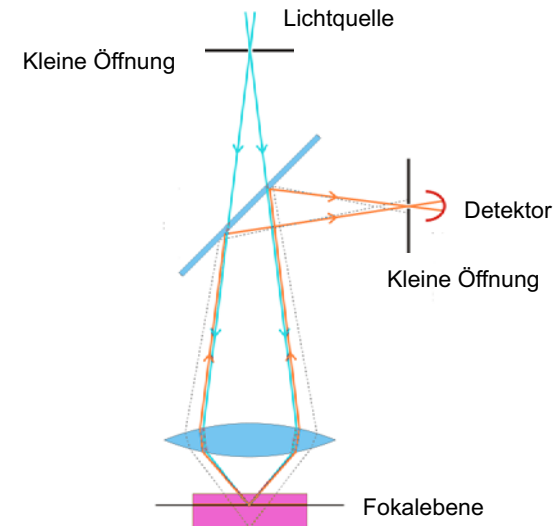


ATP-Verteilung
visualisiert mit Luciferin



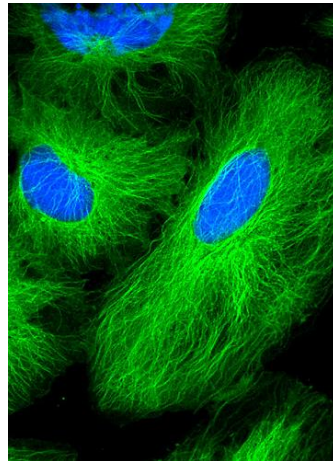
Konventionelle mikroskopische Aufnahme

Konfokales Mikroskop



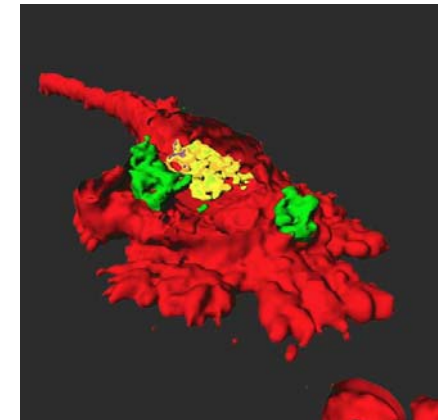
Konfokales Mikroskop

Aus Tubulin bestehende
Mikrotubuli in Zellen



Konfokales Mikroskop

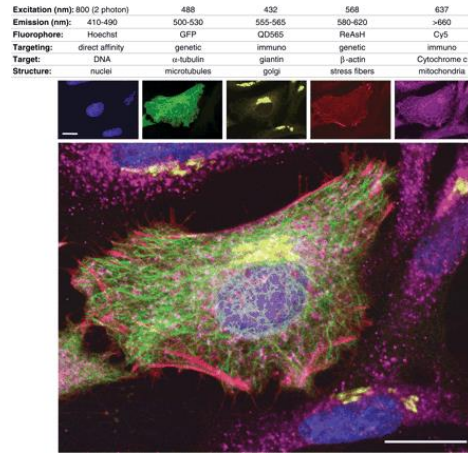
Dendritische Zelle mit
Pollenteilchen.
3D Aufnahme mit konfokalem
Mikroskop.



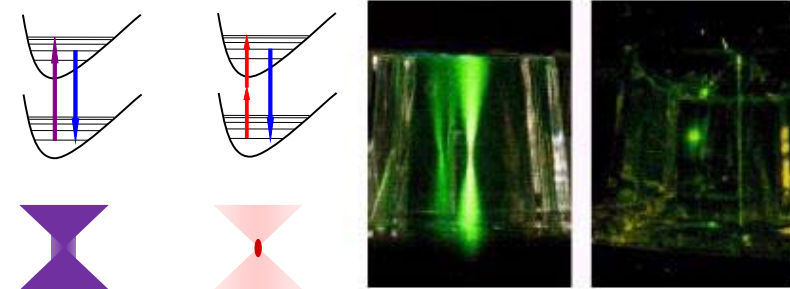
Gleichzeitige Anwendung von mehreren fluoreszierenden Markierungen

He-La Zellen markiert mit fünf unterschiedlichen Fluoreszenzmethoden.

Der Masstab ist 20 μm .



Fluoreszenzanregung mit zwei Photonen Zweiphotonenmikroskop

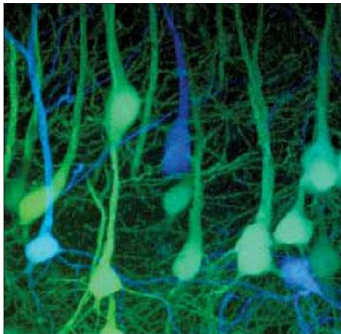


Fluoreszenzemission bei Einphoton- und Zweiphotonenanregung.

IR Laser

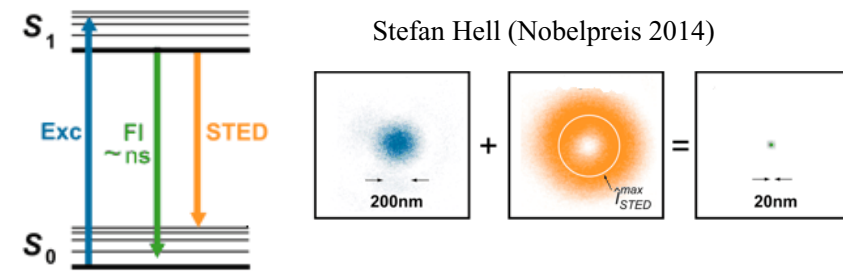
Auflösung!

Zweiphotonenmikroskopie

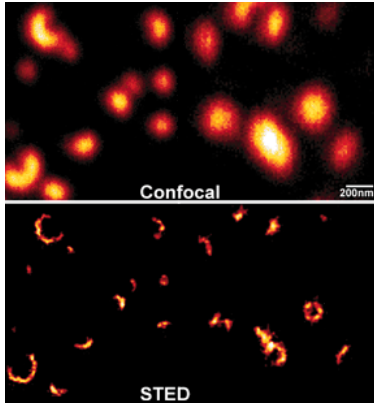


Visual Cortex von genetisch manipulierten Mause die GFP produzieren.

STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop

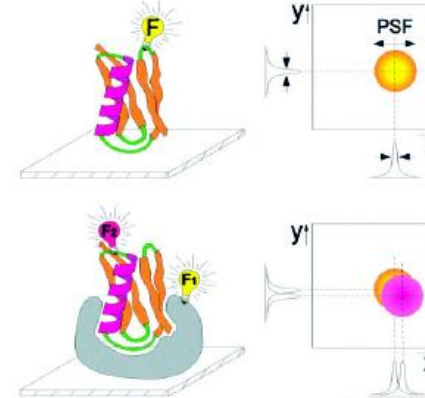


STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop



Reorganization des
Synaptophysins in
synaptischen Vesikeln

STED: Lokalisation und Kolokalisation

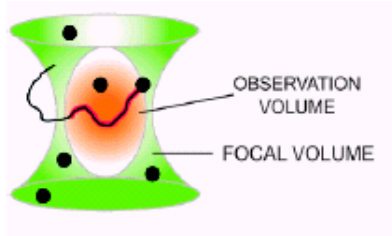


Die Position des
Eiweisses kann mit nm
genauigkeit
angenommen werden.

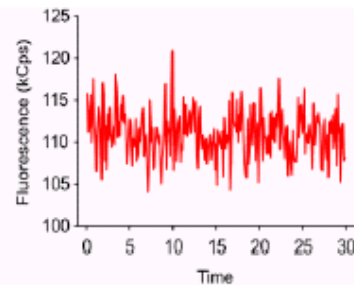
Kolokalisation
bedeutet nicht
unbedingt eine
Wechselwirkung!

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

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



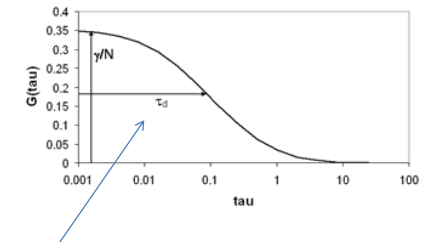
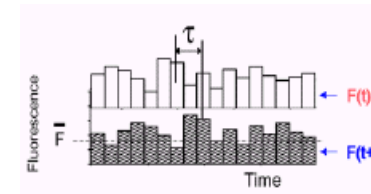
Fluktuationen des
Fluoreszenzlichtes:



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 Molekülengröße!

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

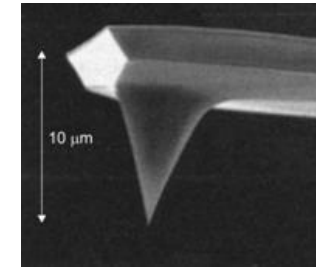
Konzentration

Reaktionsgeschwindigkeit

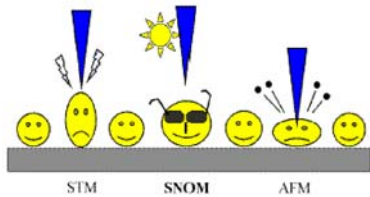
Diffusion in der Inneren der Zellen

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

RASTERSONDENMIKROSKOPE



Rastermikroskope (Scanning Probe Microscopes)



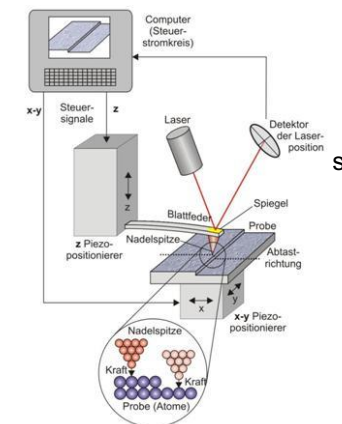
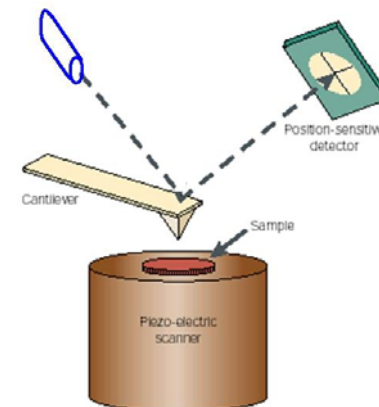
STM:
Scanning Tunneling Microscope
Rastertunnelmikroskop

SNOM:
Scanning Nearfield Optical Microscope

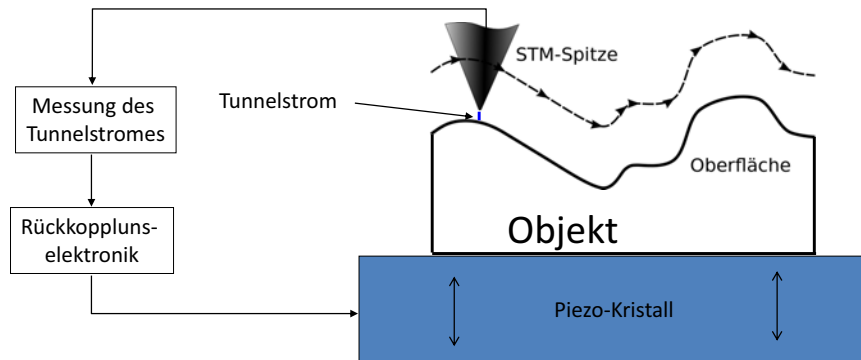
AFM:
Atomic Force Microscope
Rasterkraftmikroskop
(Atomkraftmikroskop)

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

Rasterkraftmikroskop (Atomkraftmikroskop) (Atomic Force Microscope-AFM)



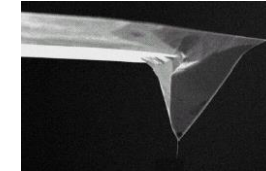
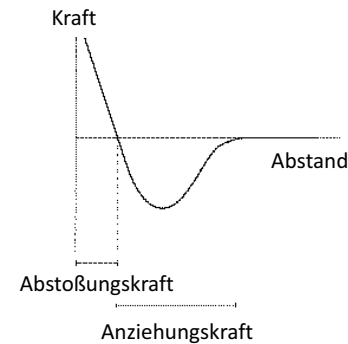
Rastertunnelmikroskop



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!



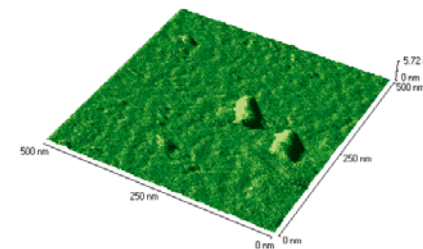
AFM Messmethoden



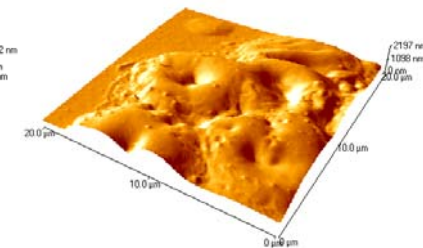
- Kontakt-Modus
- Der intermittierende Modus (engl.: *intermittent contact mode*, oder *tapping mode* genannt)

AFM Aufnahmen

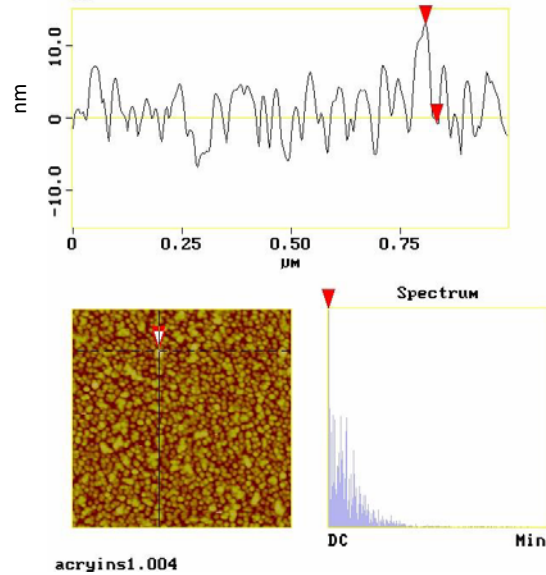
Hitzeschockproteine



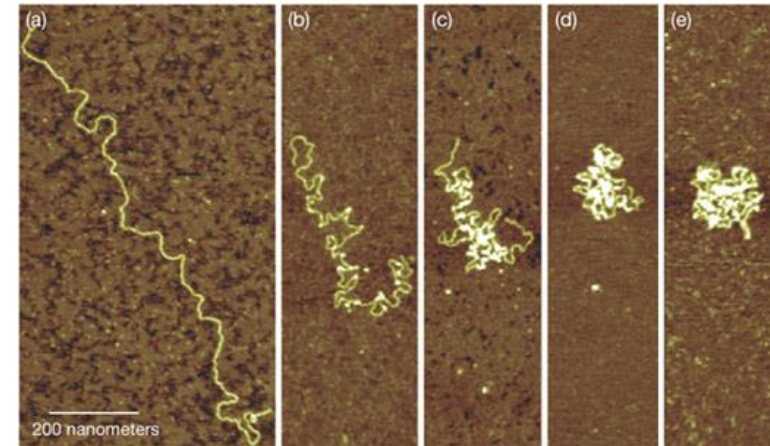
Rote blutzellen



AFM Aufnahmen



DNS

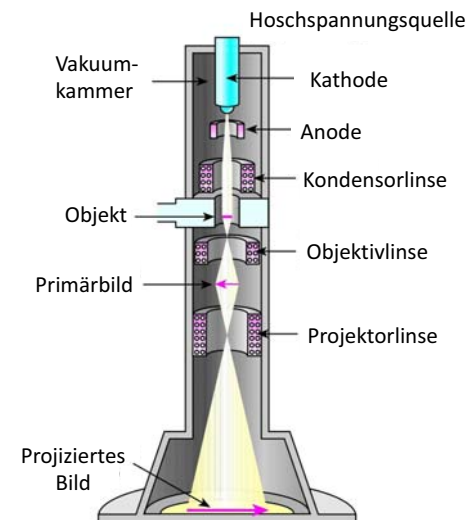


Progressive images from atomic force microscopy show the compaction of DNA caused by a protein called AbF2. (<https://www.llnl.gov/str/May04/DeYoreo.html>)

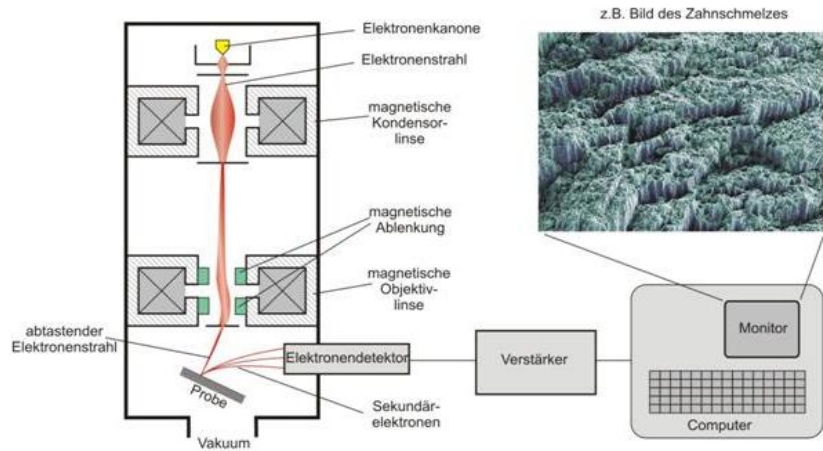
ELEKTRONENMIKROSKOPE

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! $NA \approx 0,002$

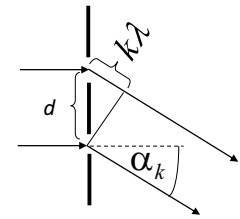
$$\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin \omega) \approx \text{nm}$$

Röntgendiffraktion

Anwendung der Röntgenstrahlung in Strukturanalyse der Materie.

Zur Erinnerung:
Diffraction des Lichtes

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



DIFFRAKTIONSMETHODE

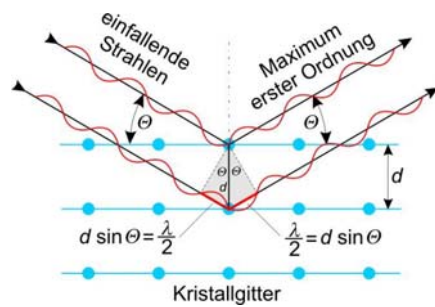
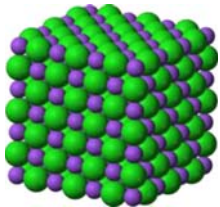
Röntgendiffraktion

Was für ein Gitter passt zur Röntgenstrahlung?

$$\lambda \lesssim d$$

$$\lambda_{\text{Rtg}} \text{ 10-100 pm}$$

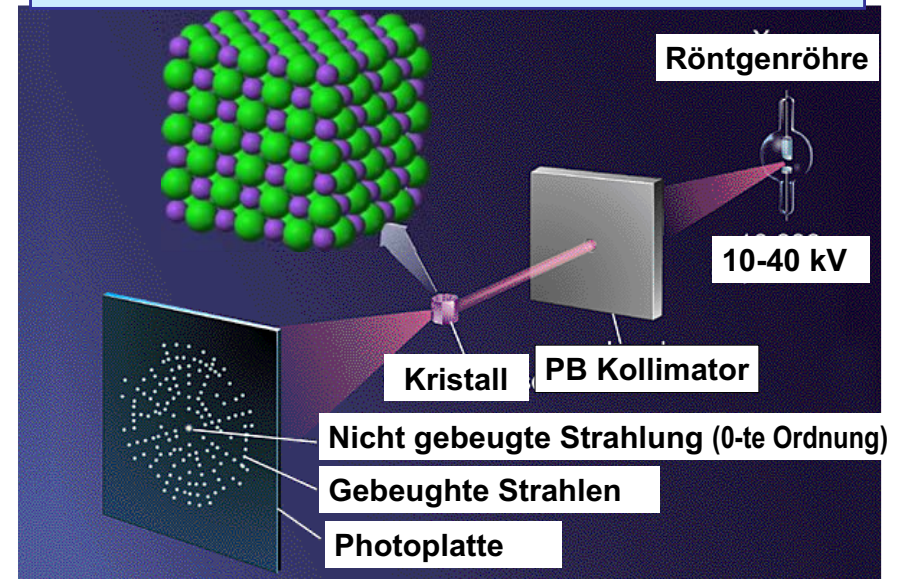
$$\text{H} \approx 100 \text{ pm}$$



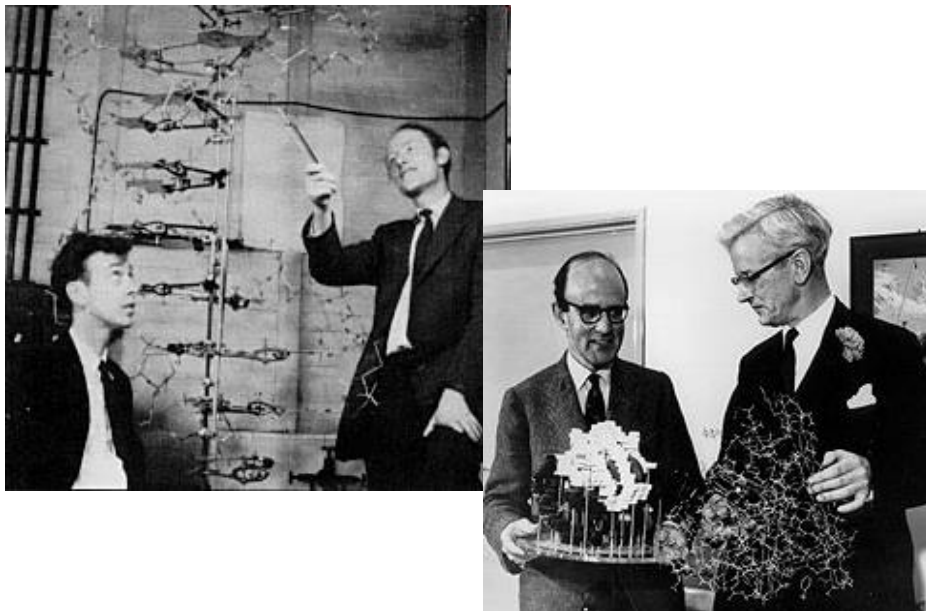
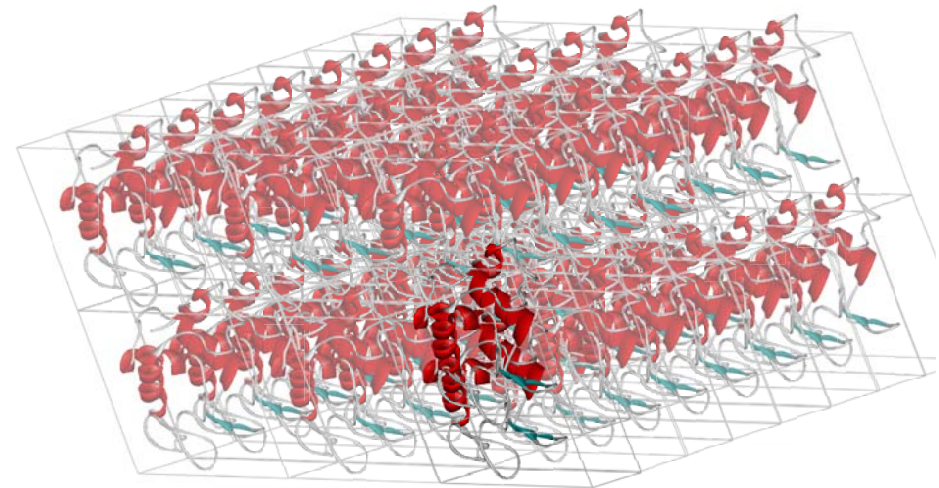
$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

Atomgitter → Kristall → auch DNS o. Proteinkristall!

Aufbau des Röntgendiffraktionsgerätes



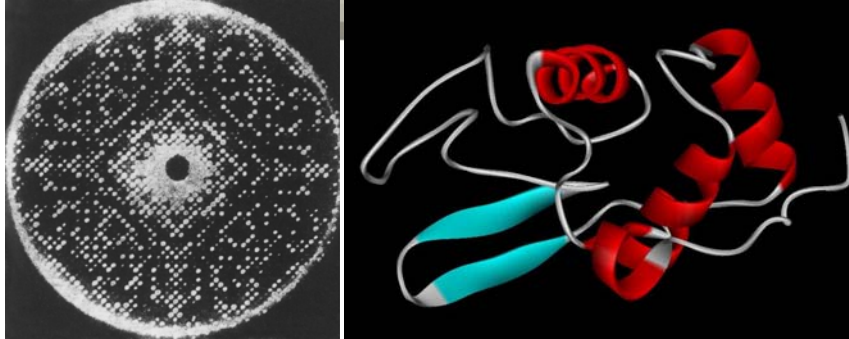
Eiweißkristalle



Bestimmung der Raumstruktur der Eiweiße



Lysozyme



Elektronen und Neutronendiffraktion

λ : Materialwellen

Elektronen: Kleine Eindringtiefe: Oberflächen

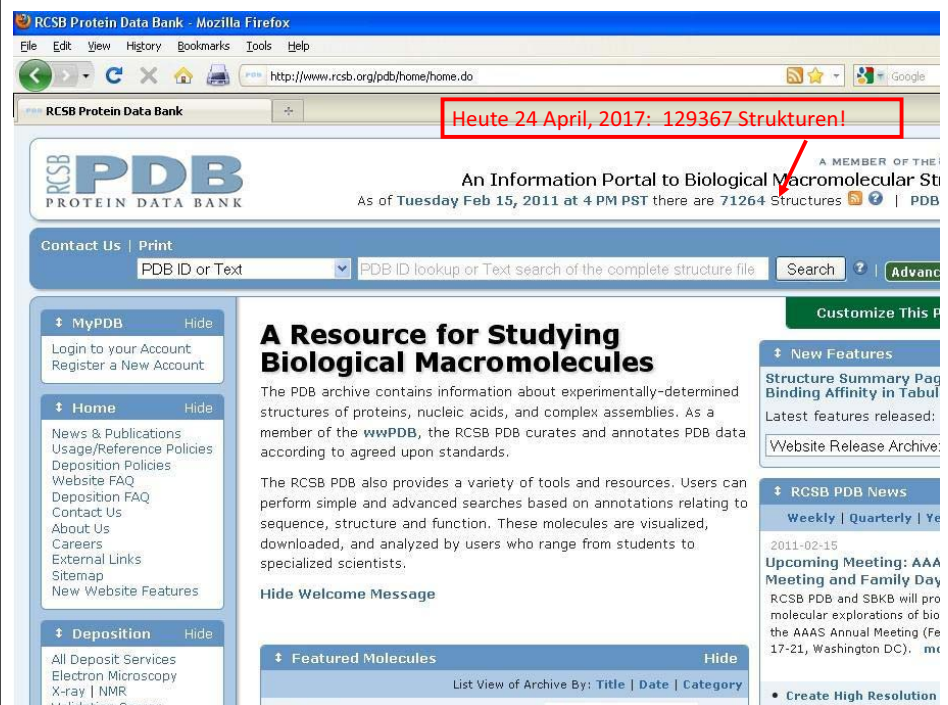
Elektronen und Neutronen werden an den Atomkernen gestreut.

(Rtg wird durch Elektronenwolken gestreut.)

Elektronen werden an den schwereren Kernen gestreut

Neutronen auch an den Protonen, =>

Neutronendiffraktion gut zur Strukturuntersuchung von wasserstoffhaltigem Material.

A screenshot of the RCSB Protein Data Bank (PDB) website. The browser is Mozilla Firefox. The URL is http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do. A red box highlights the text "Heute 24 April, 2017: 129367 Strukturen!". The page features the PDB logo, a search bar, and various navigation links. The main content area is titled "A Resource for Studying Biological Macromolecules" and provides information about the PDB archive and its resources. The right sidebar contains links to "New Features", "RCSB PDB News", and "Featured Molecules".