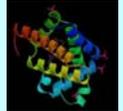
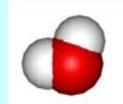


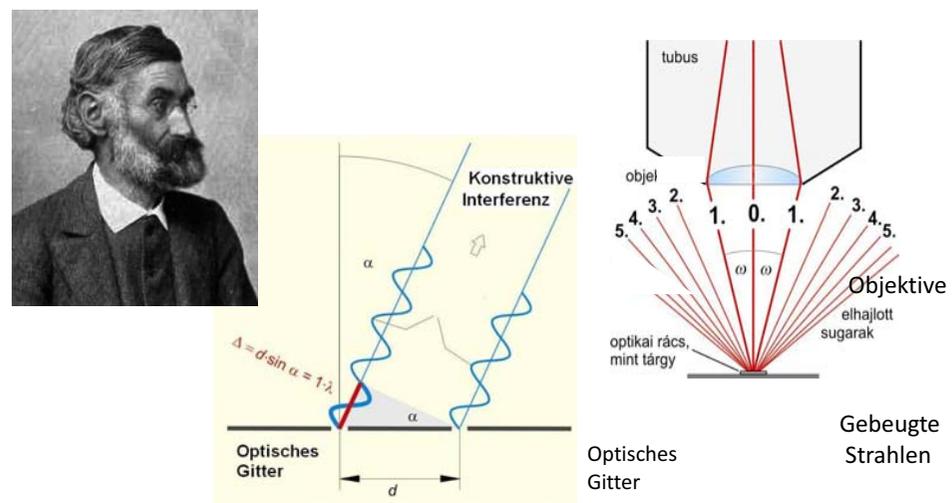
# Methoden der Strukturenuntersuchung

Lichtmikroskopische Techniken  
 Rastermikroskope  
 Elektronmikroskope  
 Diffraktionsmethode

## Typische Größen

m		
10 <sup>0</sup>	meter	Mann
10 <sup>-3</sup>	millimeter	Abstand der man mit Auge sehen kann
10 <sup>-6</sup>	mikrometer	Zelle (z.B. Blutkörpern)
		Ø 7µm 
10 <sup>-9</sup>	nanometer	Protein 
10 <sup>-10</sup>	– Angström	Durchmesser des Atoms, H Atom Ø ≈ 1 Angström (Å) 
10 <sup>-12</sup>	pikometer	Wellenlänge der Röntgenstrahlung 
10 <sup>-15</sup>	femtométer	Atomkern 

## Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops



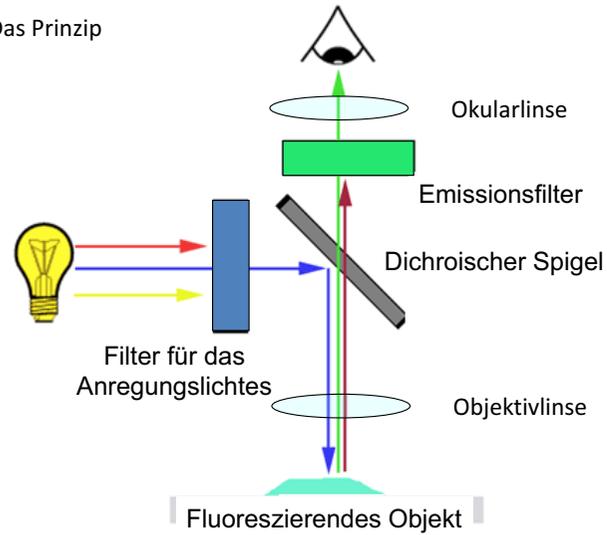
Auflösungsgrenze:  $\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin\omega)$   
 Mit  $\lambda=400$  nm,  $n=1,6$  und  $\omega \approx 90^\circ$  ist  $d \approx 150$  nm

## Spezielle Lichtmikroskopische Techniken

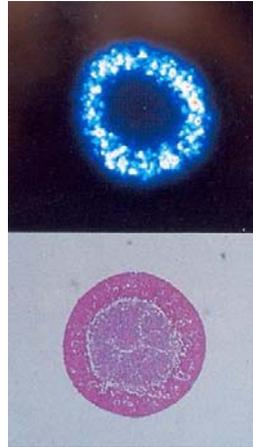
- Schon gelernt beim Praktikum:
  - Stereomikroskop
  - Phasenkontrast Mikroskop
  - Immersionsmikroskop
  - Dunkelfeldmikroskop
- Konfokales Mikroskop
- Zweiphotonenmikroskop
- Fluoreszenzkorrelationsmethode

## Fluoreszenzmikroskop

Das Prinzip

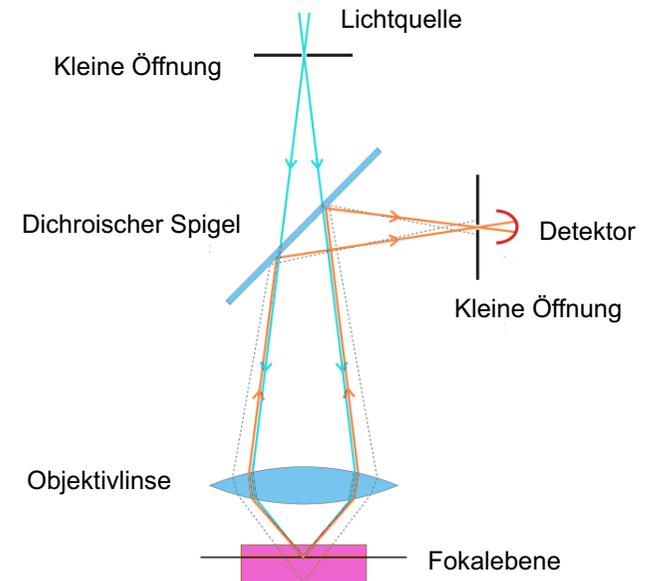


ATP-Verteilung  
visualisiert mit Luciferin



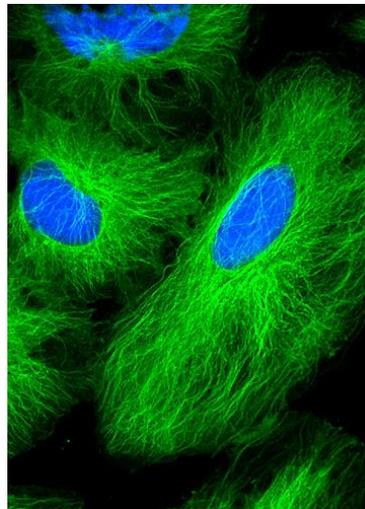
Konventionelle mikros-  
kopische Aufnahme

## Konfokales Mikroskop



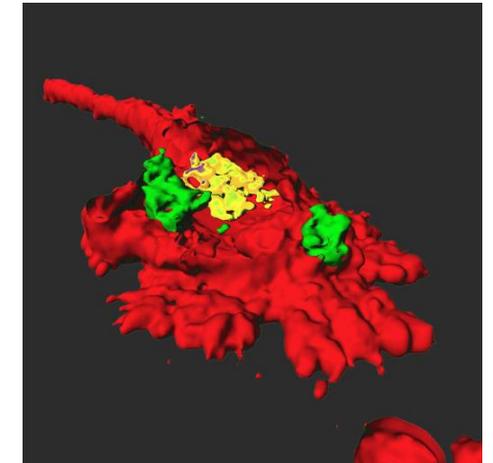
## Konfokales Mikroskop

Aus Tubulin bestehende  
Mikrotubuli in Zellen



## Konfokales Mikroskop

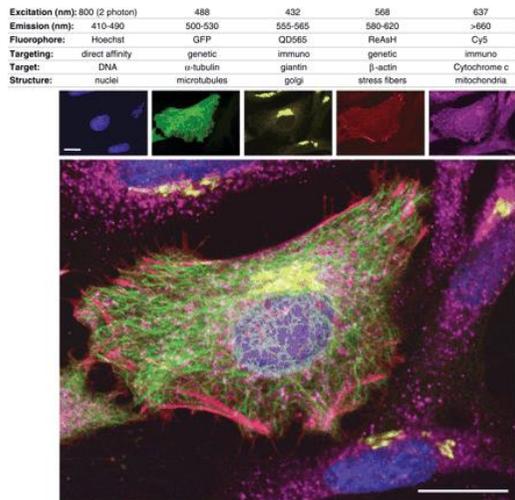
Dendritische Zelle mit  
Pollenteilchen.  
3D Aufnahme mit konfokalem  
Mikroskop.



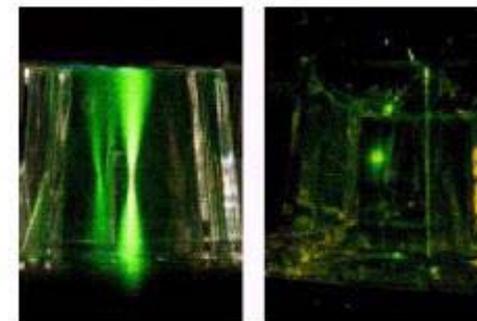
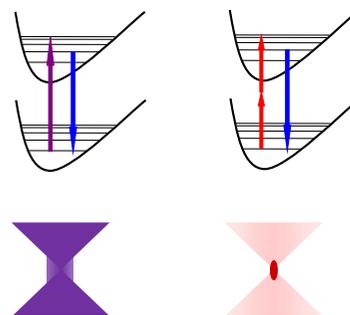
## Gleichzeitige Anwendung von mehreren fluoreszierenden Markierungen

He-La Zellen markiert mit fünf unterschiedlichen Fluoreszenzmethoden.

Der Masstab ist 20  $\mu\text{m}$ .



## Fluoreszenzanregung mit zwei Photonen Zweiphotonenmikroskop

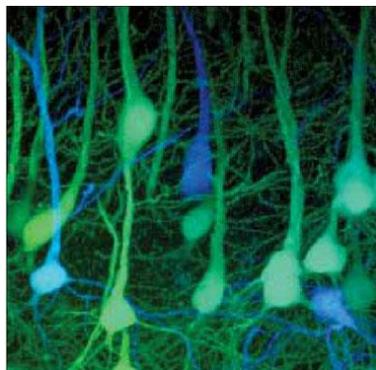


Fluoreszenzemission bei Einphoton- und Zweiphotonenanregung.

IR Laser

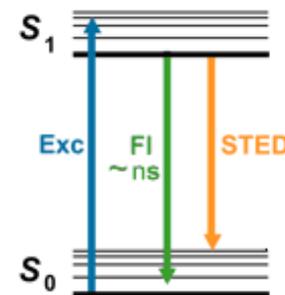
Auflösung!

## Zweiphotonenmikroskopie

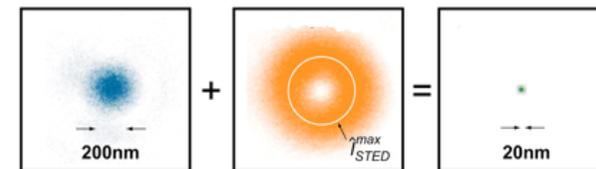


Visual Cortex von genetisch manipulierten Mause die GFP produzieren.

## STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop



Stefan Hell (Nobelpreis 2014)

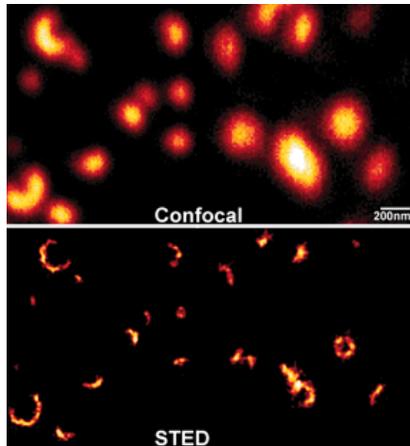


Anregung

Auslöschung

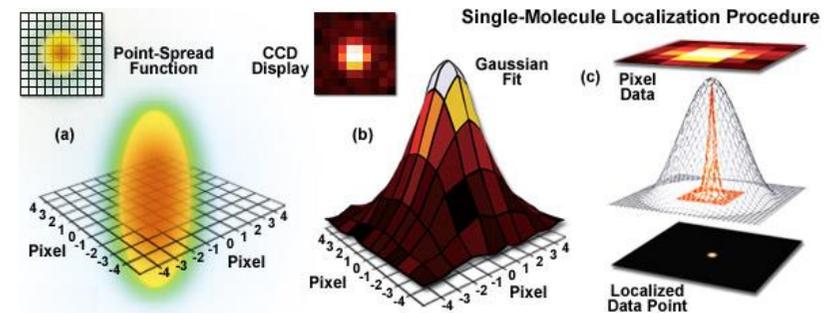
Lumineszenz nach dem Auslöschung

## STIMULATED EMISSION DEPLETION (STED) MIKROSKOP

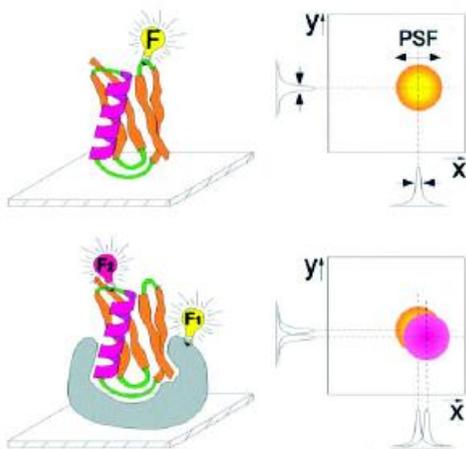


Reorganization des Synaptophysins in synaptischen Vesikeln

## STED: Lokalisierung



## STED: Lokalisierung und Kolokalisierung

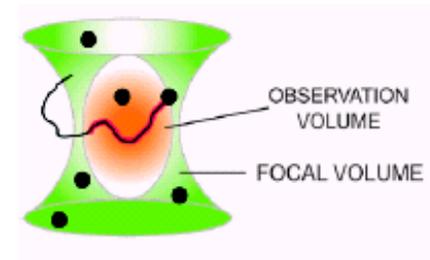


Die Position des Eiweisses kann mit nm Genauigkeit angenommen werden.

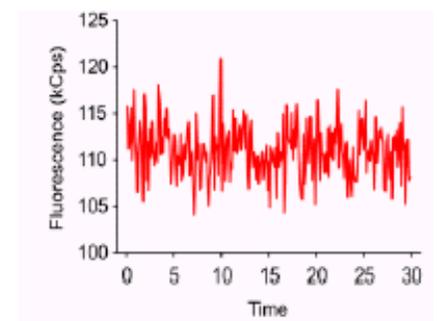
Kolokalisierung bedeutet nicht unbedingt eine Wechselwirkung!

## Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)

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



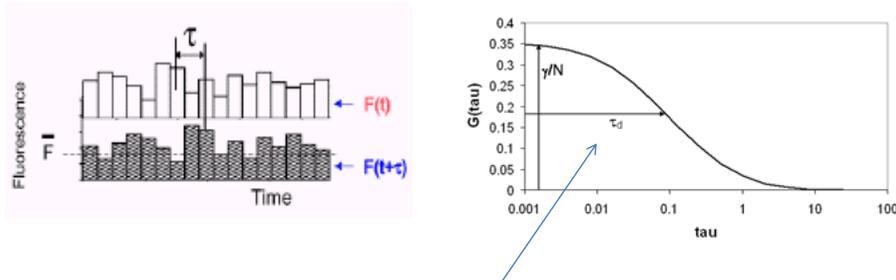
Fluktuationen des Fluoreszenzlichtes:



Ähnlich zur dynamischen Lichtstreuung, aber mit Fluoreszenz

## FCS: Autokorrelationsfunktion

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



$\tau_d$  – 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

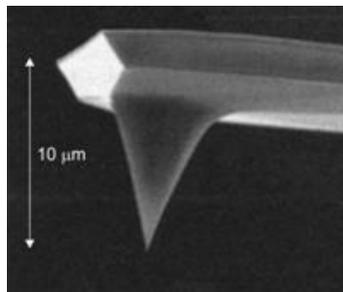
### Konzentration

### 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.

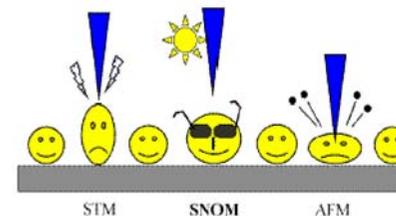
## RASTERSONDENMIKROSKOPE



## Rastermikroskope (Scanning Probe Microscopes)

STM:

Scanning Tunneling Microscope  
Rastertunnelmikroskop



SNOM:

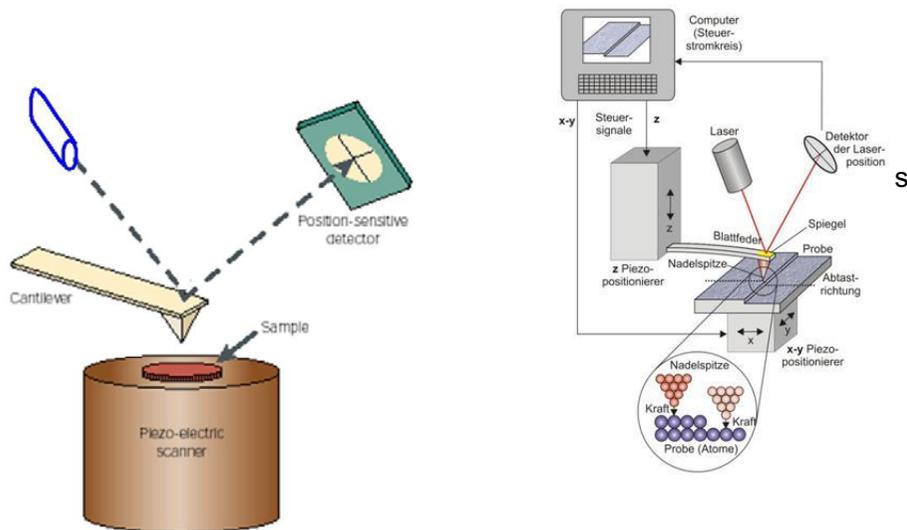
Scanning Nearfield Optical Microscope

AFM:

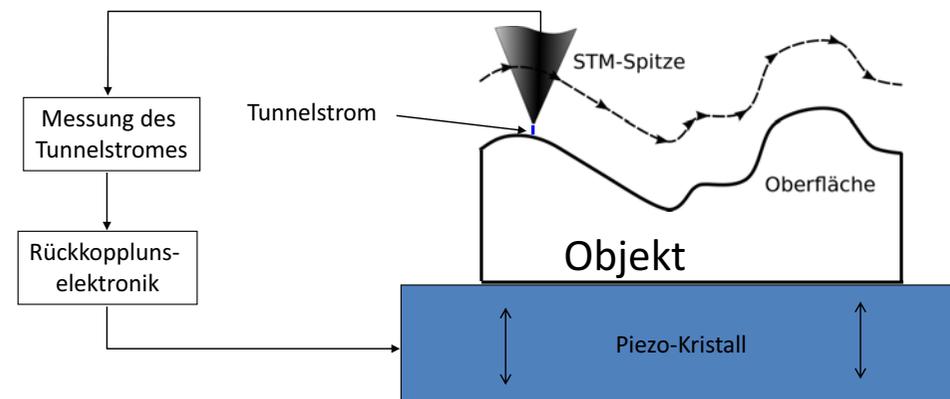
Atomic Force Microscope  
Rasterkraftmikroskop  
(Atomkraftmikroskop)

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

## Rasterkraftmikroskop (Atomkraftmikroskop) (Atomic Force Microscope-AFM)



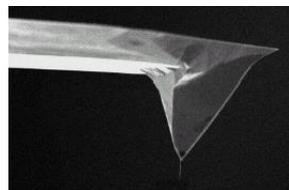
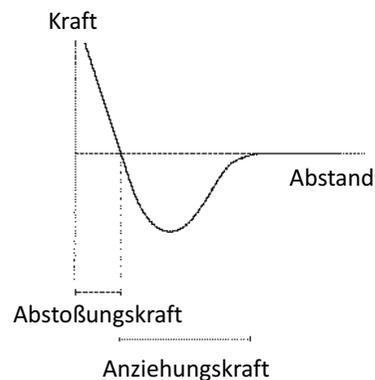
## Rastertunnelmikroskop



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!



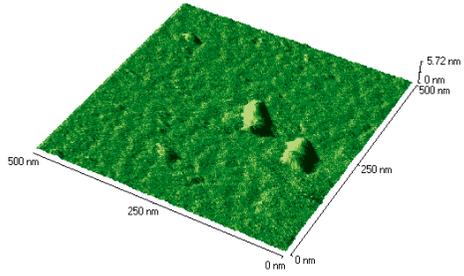
## AFM Messmethoden



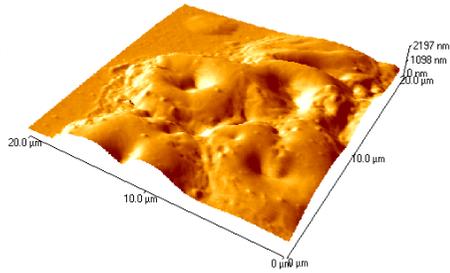
- Kontakt-Modus
- Der intermittierende Modus (engl.: *intermittent contact mode*, oder *tapping mode* genannt)

## AFM Aufnahmen

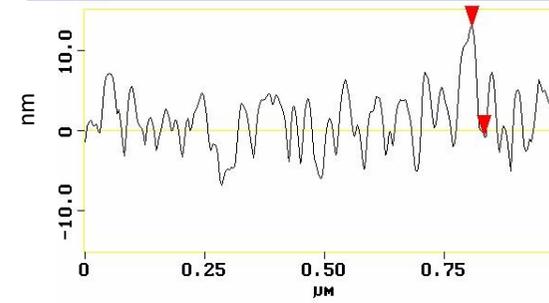
Hitzeschockproteine



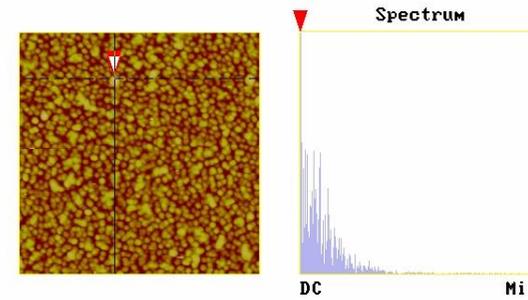
Rote blutzellen



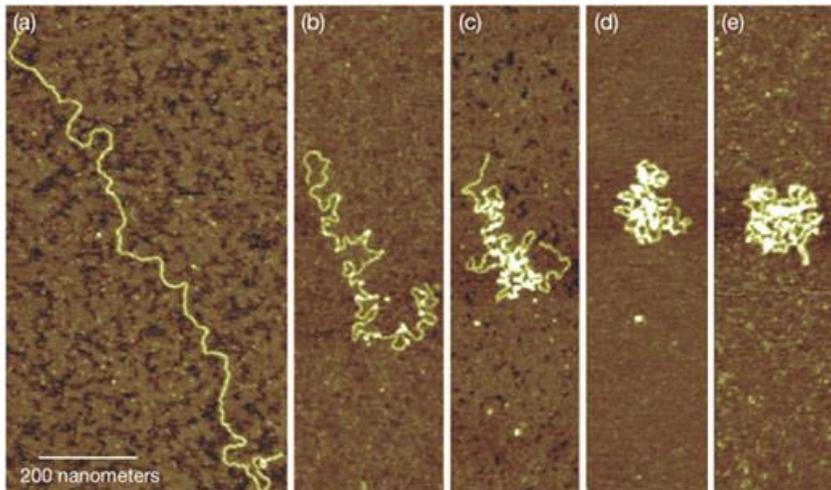
## AFM Aufnahmen



Alpha-Crystallin  
Aggregate



## DNS

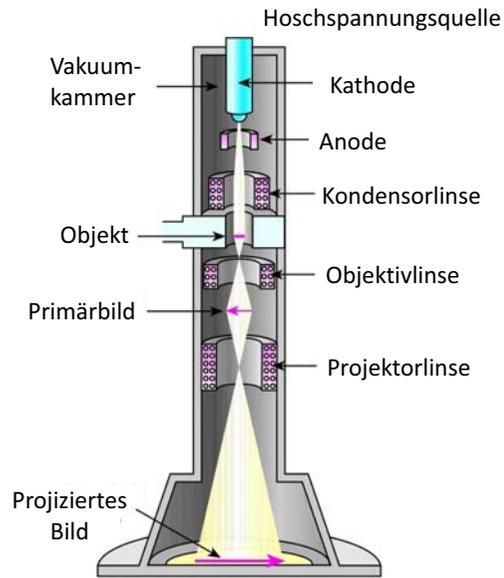


Progressive images from atomic force microscopy show the compaction of DNA caused by a protein called AbF2. (<https://www.llnl.gov/str/May04/DeYoreo.html>)

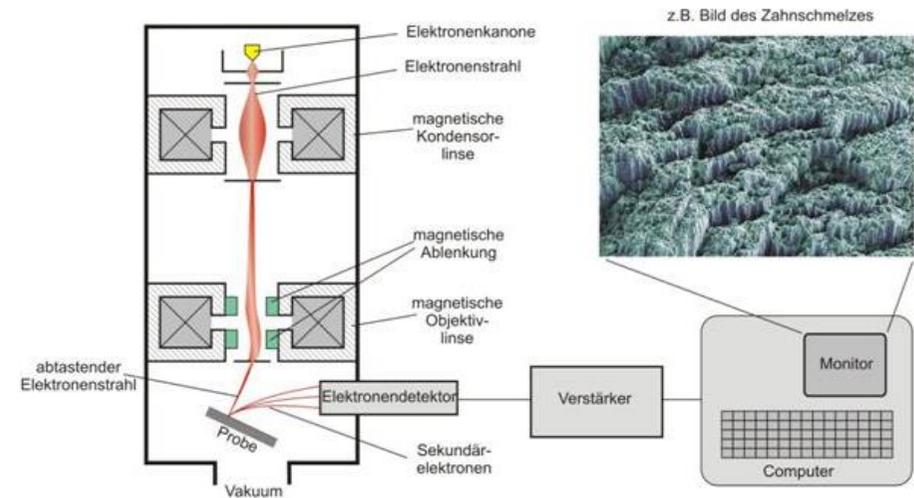
## ELEKTRONENMIKROSKOPE

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  $\lambda$  5 pm sein. Aber  $\omega$  ist sehr klein!  $NA \approx 0,002$

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

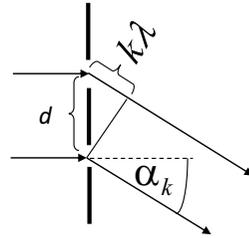
## DIFFRAKTIONSMETHODE

## Röntgendiffraktion

Anwendung der Röntgenstrahlung in Strukturanalyse der Materie.

Zur Erinnerung:  
Diffraktion des Lichtes

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



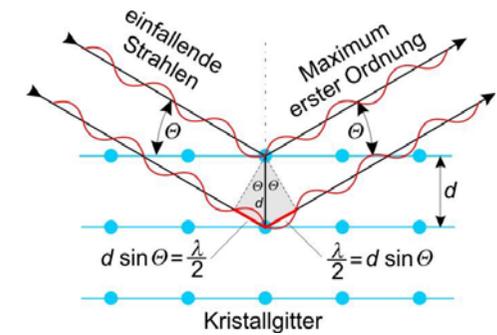
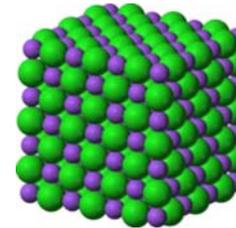
## Röntgendiffraktion

Was für ein Gitter passt zur Röntgenstrahlung?

$$\lambda \lesssim d$$

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

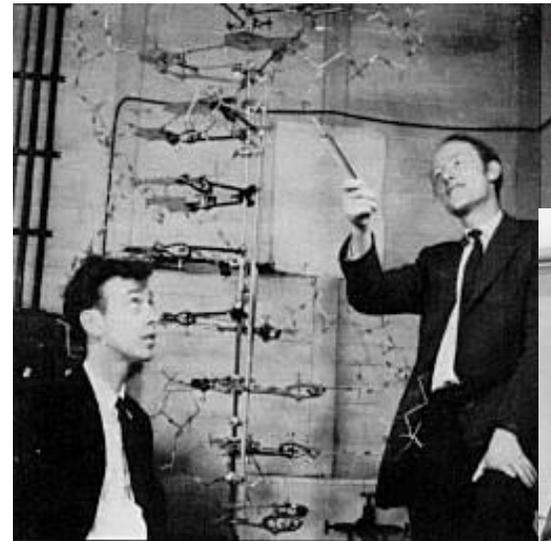
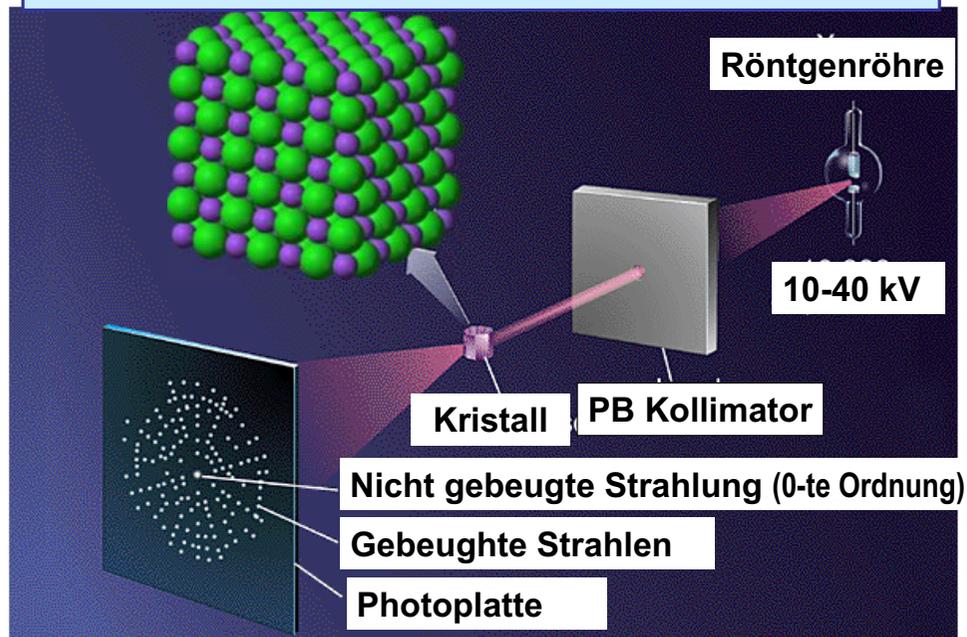
$$H \approx 100 \text{ pm}$$



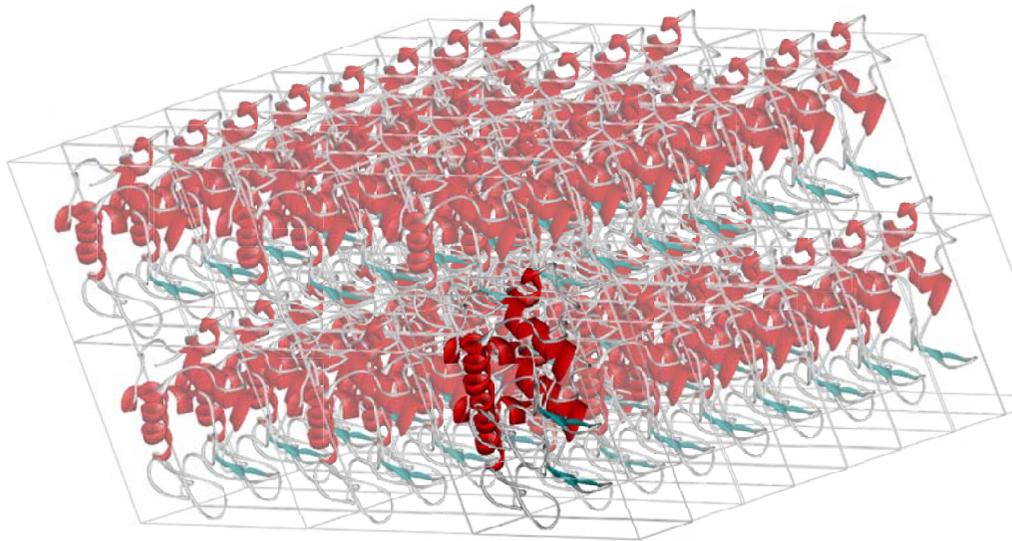
$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Atomgitter → Kristall → auch DNS o. Proteinkristall!

## Aufbau des Röntgendiffraktionsgerätes



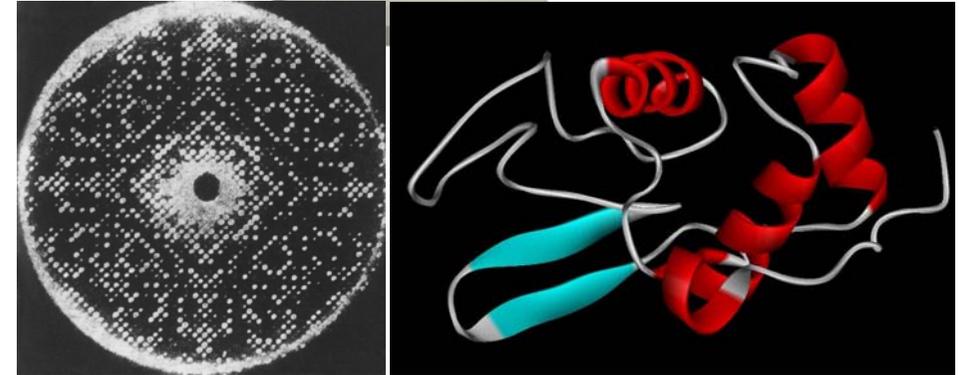
## Eiweißkristalle



## Bestimmung der Raumstruktur der Eiweiße



Lysozyme



RCSB Protein Data Bank - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do

RCSB Protein Data Bank

Heute 24 April, 2017: 129367 Strukturen!

**PDB**  
PROTEIN DATA BANK

A MEMBER OF THE IUCR

An Information Portal to Biological Macromolecular Structures

As of Tuesday Feb 15, 2011 at 4 PM PST there are 71264 Structures

Contact Us | Print

PDB ID or Text PDB ID lookup or Text search of the complete structure file Search ? | Advance

Customize This Page

### A Resource for Studying Biological Macromolecules

The PDB archive contains information about experimentally-determined structures of proteins, nucleic acids, and complex assemblies. As a member of the wwPDB, the RCSB PDB curates and annotates PDB data according to agreed upon standards.

The RCSB PDB also provides a variety of tools and resources. Users can perform simple and advanced searches based on annotations relating to sequence, structure and function. These molecules are visualized, downloaded, and analyzed by users who range from students to specialized scientists.

Hide Welcome Message

MyPDB Home

Login to your Account  
Register a New Account

Home Home

News & Publications  
Usage/Reference Policies  
Deposition Policies  
Website FAQ  
Deposition FAQ  
Contact Us  
About Us  
Careers  
External Links  
Sitemap  
New Website Features

Deposition Hide

All Deposit Services  
Electron Microscopy  
X-ray | NMR  
Validation Service

Featured Molecules Hide

List View of Archive By: Title | Date | Category

New Features

Structure Summary Page  
Binding Affinity in Tabular Format

Latest features released:

Website Release Archive:

RCSB PDB News

Weekly | Quarterly | Yearly

2011-02-15

Upcoming Meeting: AAA Meeting and Family Day

RCSB PDB and SBKB will promote molecular explorations of bio at the AAAS Annual Meeting (Feb 17-21, Washington DC).

Create High Resolution

## Elektronen und Neutronendiffraktion

$\lambda$ : 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.