

Methoden der Strukturenuntersuchung




Lichtmikroskopische Techniken

Rastermikroskope

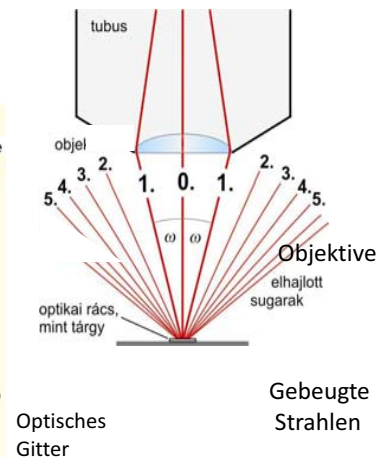
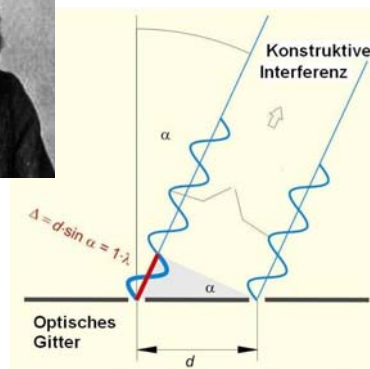
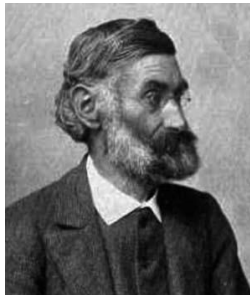
Elektronmikroskope

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) |
| | |  $\varnothing 7\mu\text{m}$ |
| 10^{-9} | nanometer | Protein |
| 10^{-10} | – Angström | Durchmesser des Atoms, H Atom $\varnothing \approx 1$ Angström (Å) |
| | |  |
| 10^{-12} | pikometer | Wellenlänge der Röntgenstrahlung |
| 10^{-15} | femtométer | Atomkern |
| | |  |

Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops



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

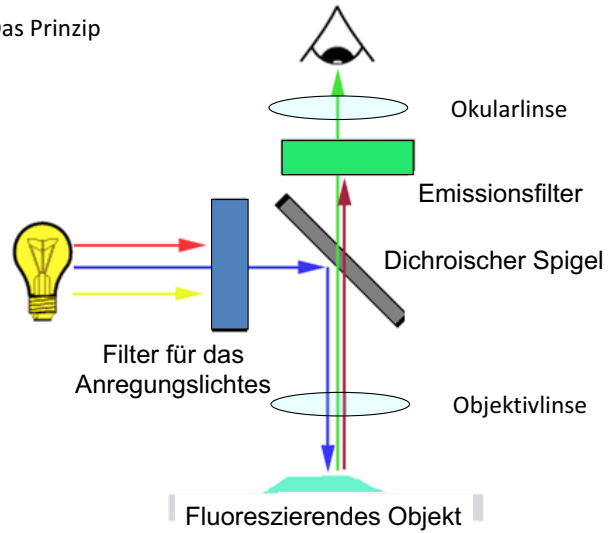
Mit $\lambda=400$ nm, $n=1,6$ und $\omega \approx 90^\circ$ ist $d \approx 150$ nm

Spezielle Lichtmikroskopische Techniken

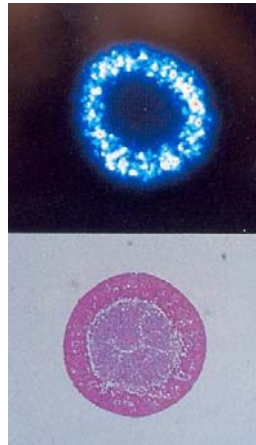
- Schon gelernt beim Praktikum:
 - Stereomikroskop
 - Phasenkontrast Mikroskop
 - Immersionsmikroskop
 - Dunkelfeldmikroskop
- Konfokales Mikroskop
- Zweiphotonenmikroskop
- Fluoreszenzkorrelationsmethode

Fluoreszenzmikroskop

Das Prinzip

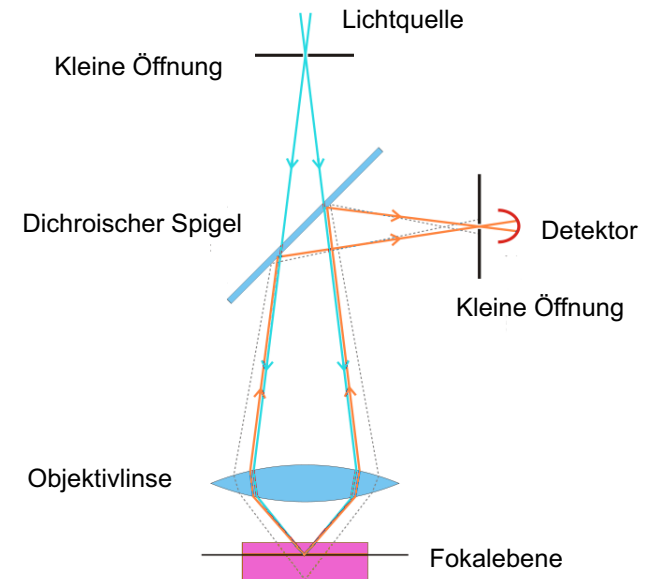


ATP-Verteilung
visualisiert mit Luciferin



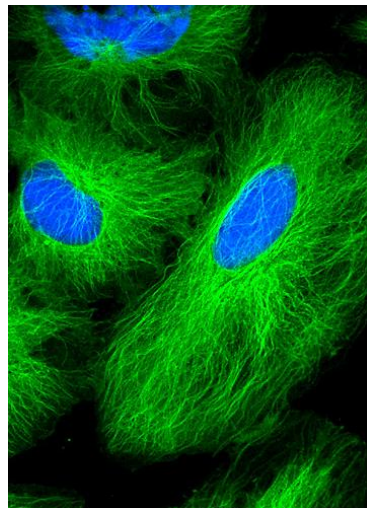
Konventionelle mikros-
kopische Aufnahme

Konfokales Mikroskop



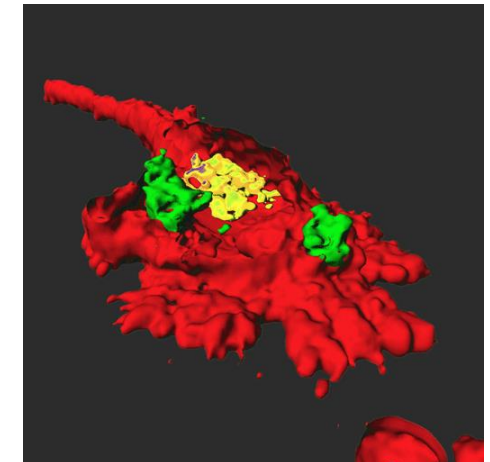
Konfokales Mikroskop

Aus Tubulin bestehende
Mikrotubuli in Zellen



Konfokales Mikroskop

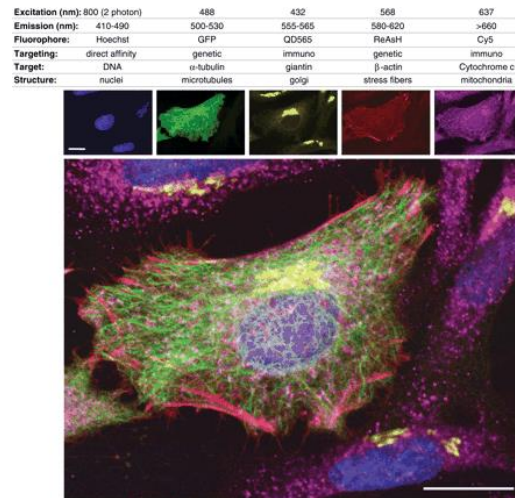
Dendritische Zelle mit
Pollenteilchen.
3D Aufnahme mit konfokalem
Mikroskop.



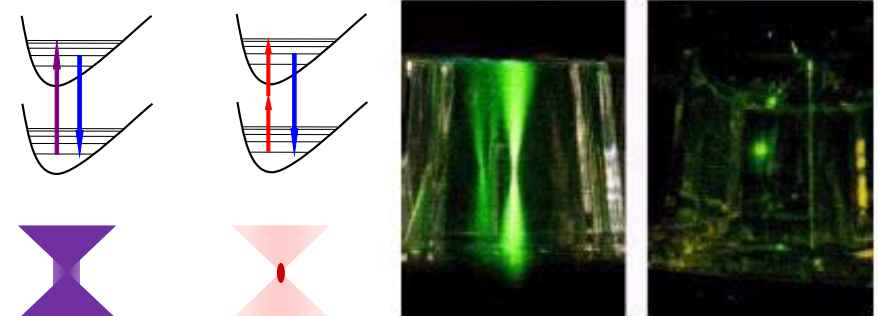
Gleichzeitige Anwendung von mehreren fluoreszierenden Markierungen

He-La Zellen markiert mit fünf unterschiedlichen Fluoreszenzmethoden.

Der Masstab ist 20 μm .



Fluoreszenzanregung mit zwei Photonen Zweiphotonenmikroskop

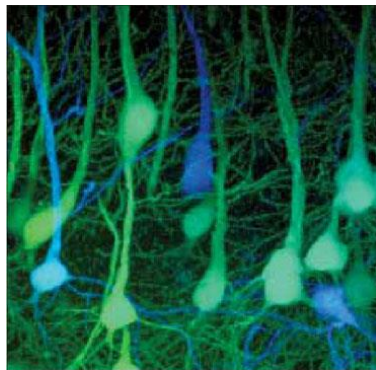


IR Laser

Fluoreszenzemission bei Einphoton- und Zweiphotonenanregung.

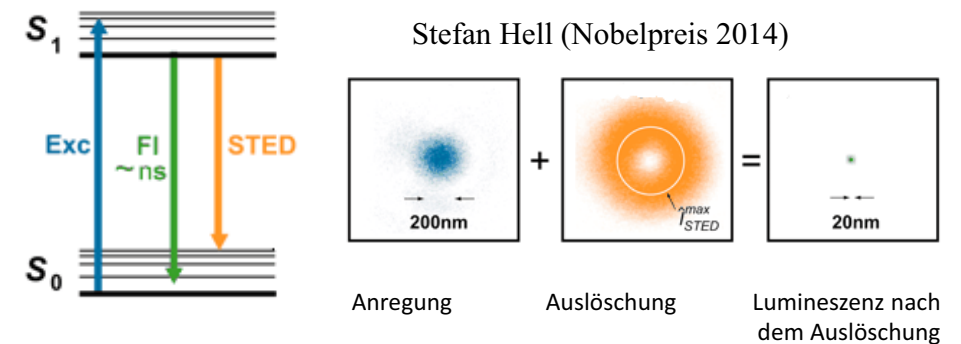
Auflösung!

Zweiphotonenmikroskopie

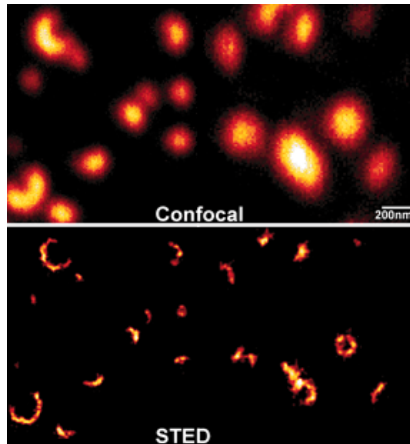


Visual Cortex von genetisch manipulierten Mause die GFP produzieren.

STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop

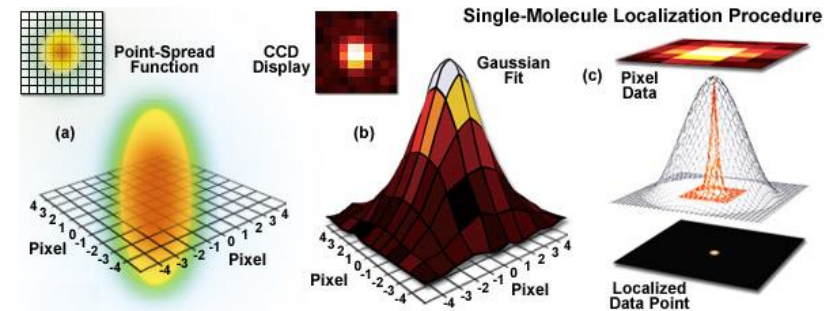


STIMULATED EMISSION DEPLETION (STED) Mikroskop

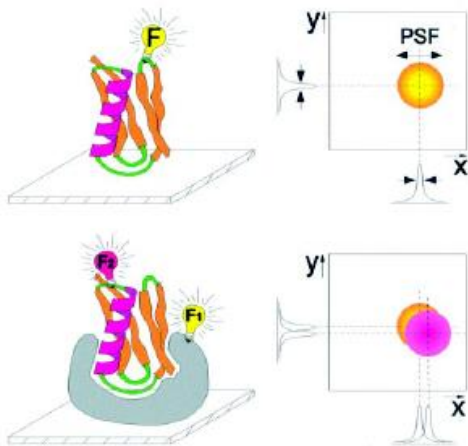


Reorganization des
Synaptophysins in
synaptischen Vesikeln

STED: Lokalization



STED: Lokalization und Kolokalization

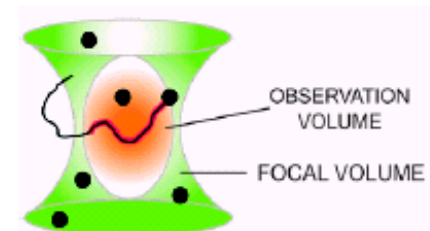


Die Position des
Eiweisses kann mit nm
genauigkeit
angenommen werden.

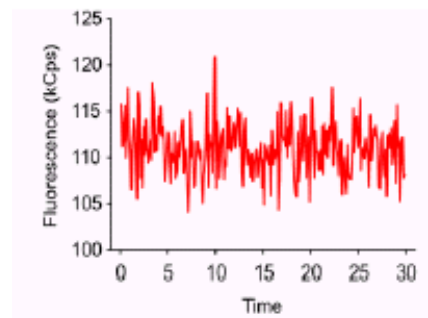
Kolokalization
bedeutet nicht
unbedingt eine
Wechselwirkung!

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

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



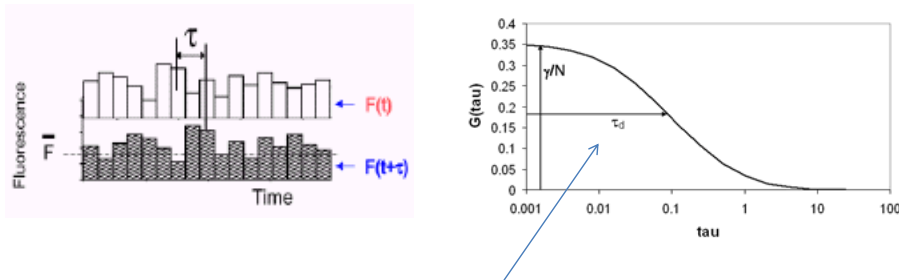
Fluktuationen des
Fluoreszenzlichtes:



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

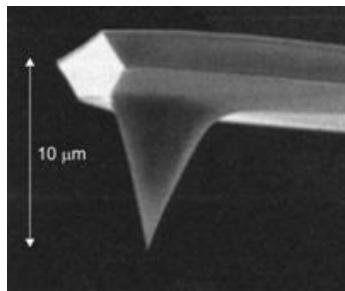
Konzentration

Reaktionsgeschwindigkeit

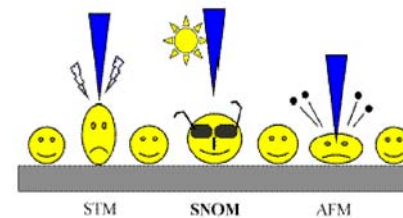
Diffusion in der Inneren der Zellen

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:

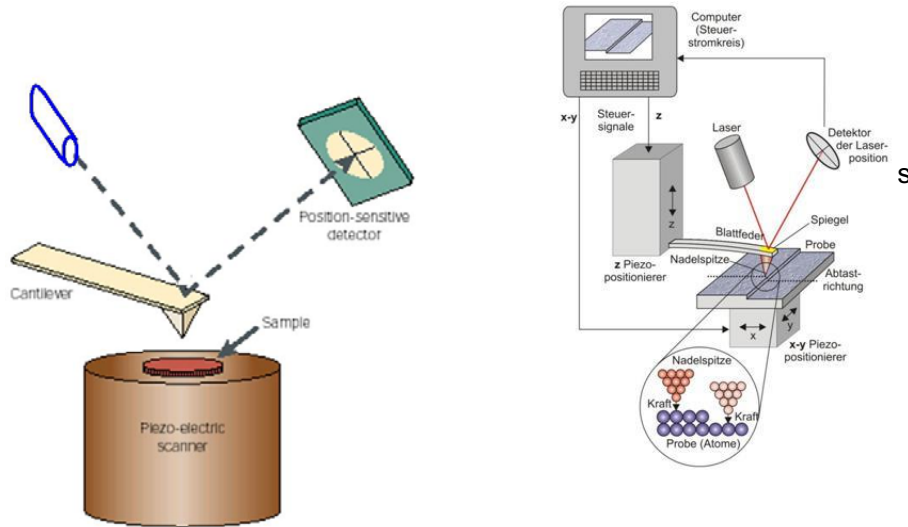
Scanning Nearfield Optical Microscope

AFM:

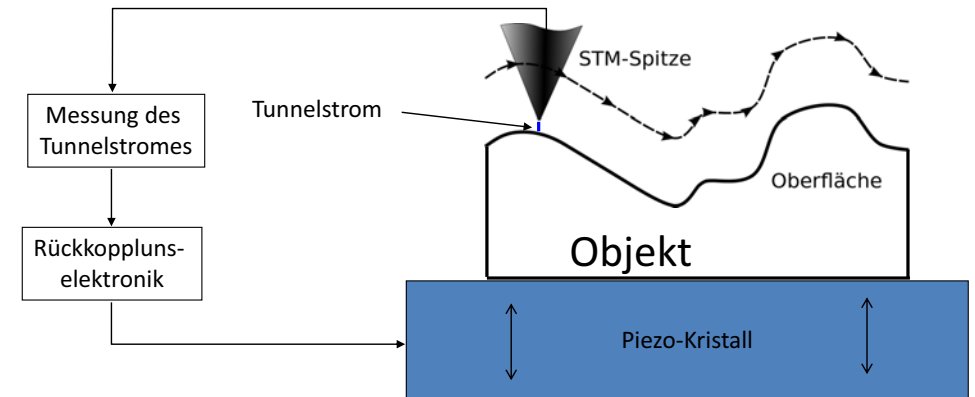
Atomic Force Microscope
Rasterkraftmikroskop
(Atomkraftmikroskop)

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)



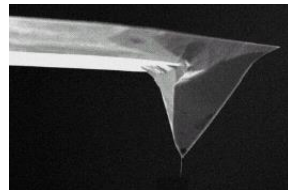
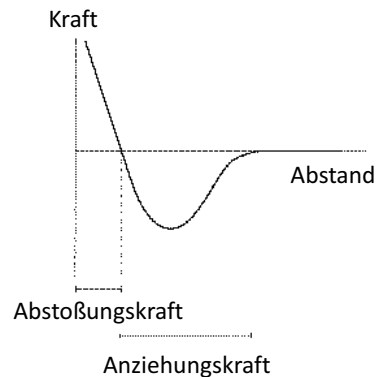
Rastertunnelmikroskop



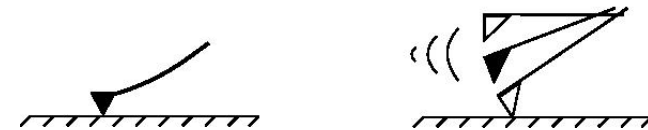
Der Tunnelstrom ist konstant gehalten mit der vertikalen Bewegung des Objektes.

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!



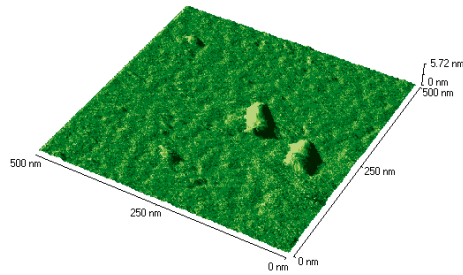
AFM Messmethoden



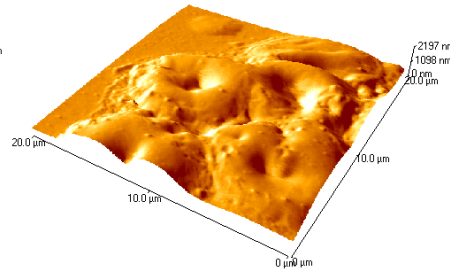
- Kontakt-Modus
- Der intermittierende Modus
(engl.: *intermittent contact mode*, oder *tapping mode* genannt)

AFM Aufnahmen

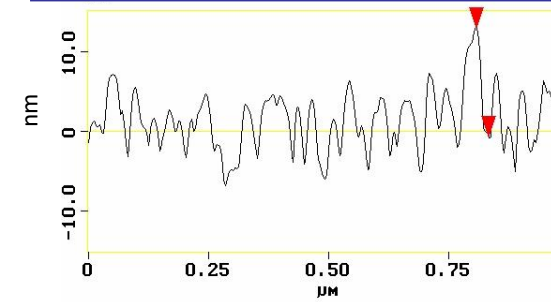
Hitzeschockproteine



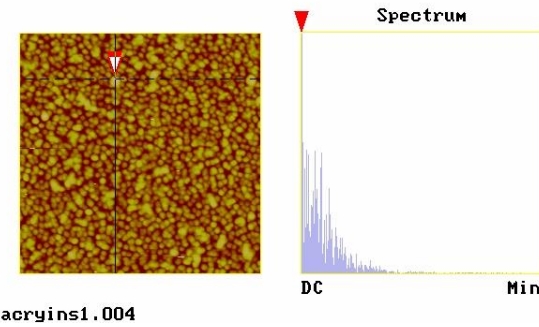
Rote blutzellen



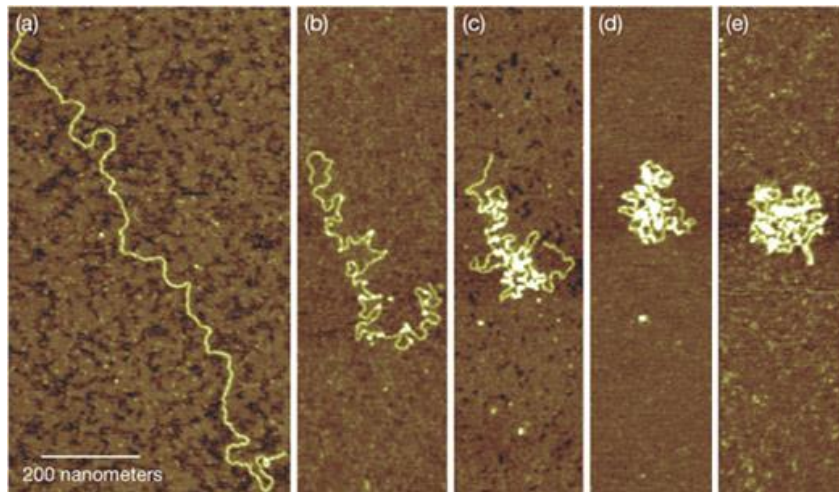
AFM Aufnahmen



Alpha-Crystallin
Aggregate



DNS

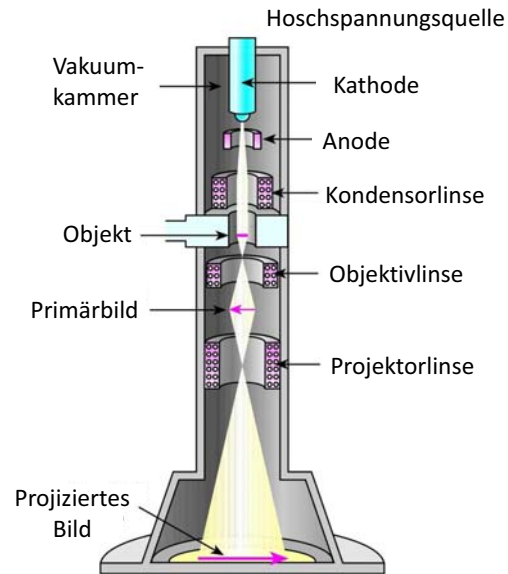


Progressive images from atomic force microscopy show the compaction of DNA caused by a protein called AbF2. (<https://www.llnl.gov/str/May04/DeYoreo.html>)

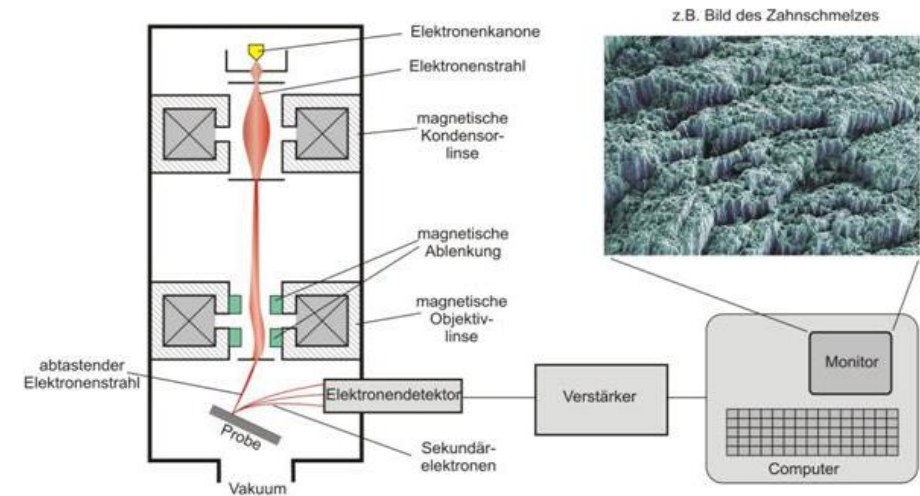
ELEKTRONENMIKROSKOPE

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

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

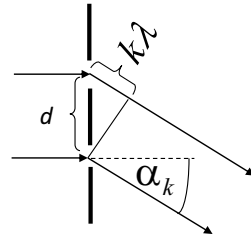
DIFFRAKTIONSMETHODE

Röntgendiffraktion

Anwendung der Röntgenstrahlung in Strukturanalyse der Materie.

Zur Erinnerung:
Diffraction des Lichtes

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



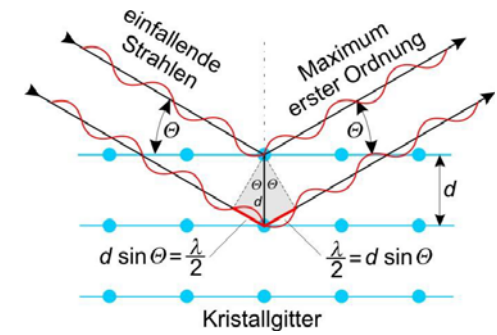
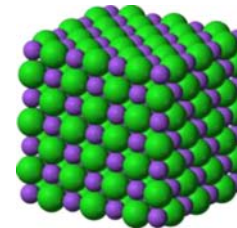
Röntgendiffraktion

Was für ein Gitter passt zur Röntgenstrahlung?

$$\lambda \lesssim d$$

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

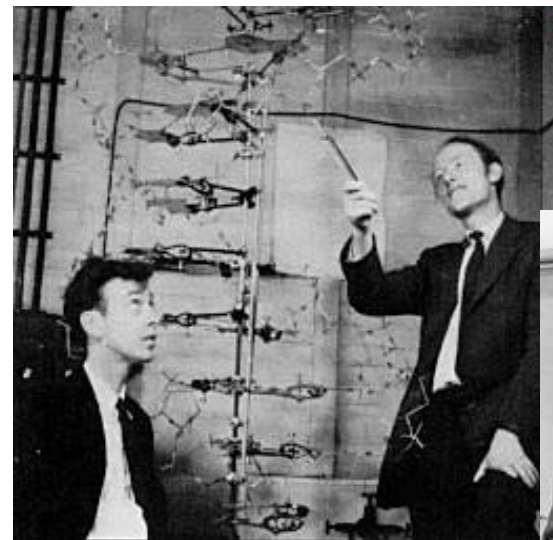
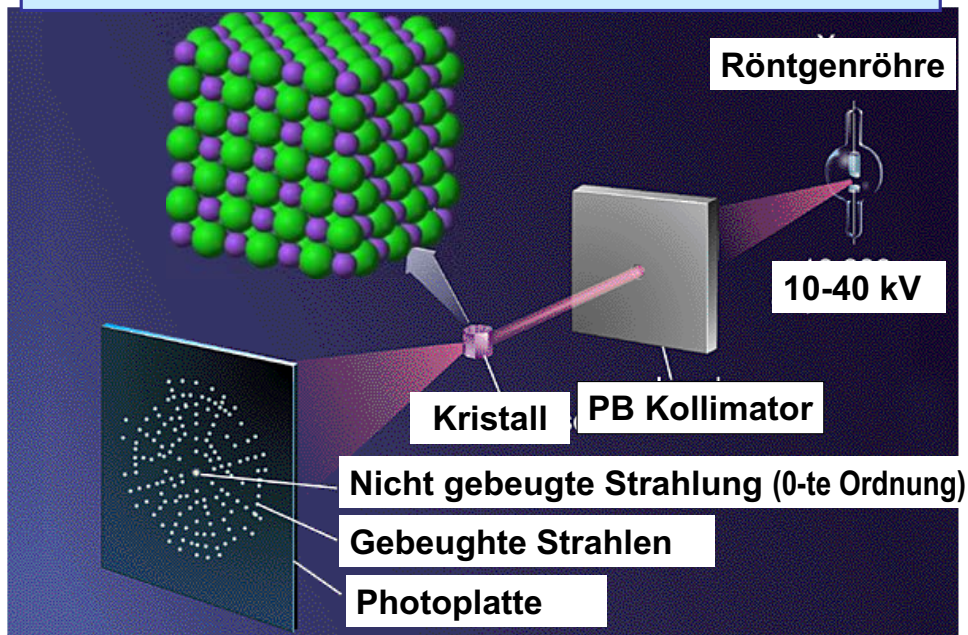
$$H \approx 100 \text{ pm}$$



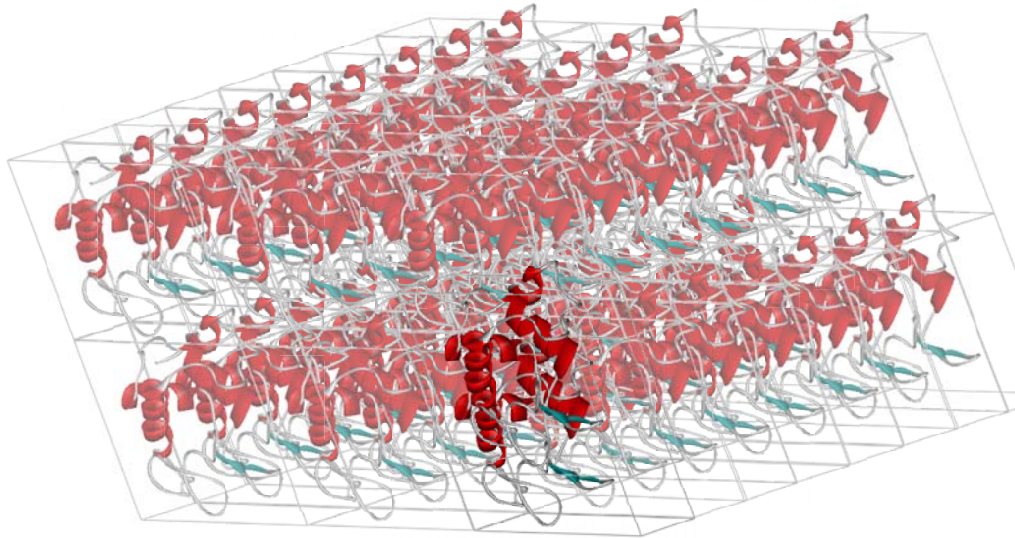
$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Atomgitter → Kristall → auch DNS o. Proteinkristall!

Aufbau des Röntgendiffraktionsgerätes



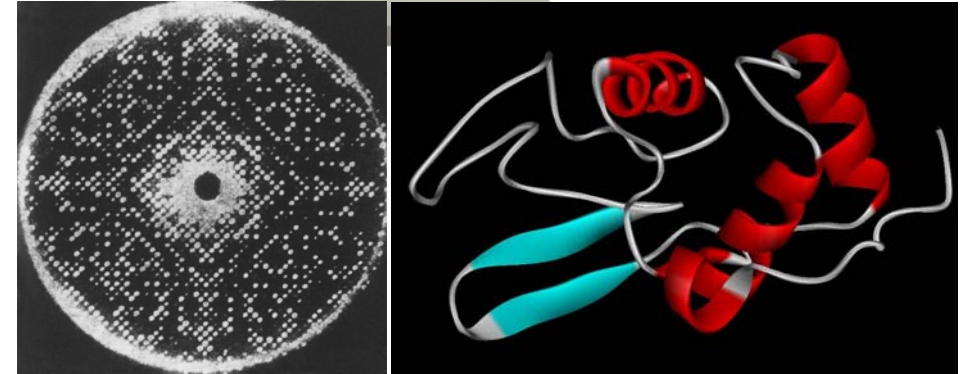
Eiweißkristalle



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

MyPDB Hide

Login to your Account
Register a New Account

Home Hide

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

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

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 provide molecular explorations of bio the AAAS Annual Meeting (Feb 17-21, Washington DC). m

Create High Resolution

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.