

# Strukturuntersuchungsmethoden in der Medizin: Spektroskopische und mikroskopische Methoden. Superresolutionsmikroskopie.

Balázs Kiss

kissb3@gmail.com



Nanobiotechnologie und Einzelmolekül-Forschungsgruppe und  
Myofilament-Mechanobiophysik Forschungsgruppe,  
Semmelweis Universität,  
Insitut für Biophysik und Strahlenbiologie.

20. November 2019.

## Strukturuntersuchungsmethoden in der medizinischen Forschung

### 1. Spektroskopische Verfahren

- a) Fluoreszenzspektroskopie ✓
- b) Absorptionsspektroskopie (UV-VIS) ✓
- c) Infrarotspektroskopie

### 2. Mikroskopie

- a) Lichtmikroskop ✓
- b) Spezielle Lichtmikroskope (Stereo-, Polarisations-, Phasenkontrast-, Fluoreszenzmikroskop, CLSM)
- c) Superresolutionsmikroskope (SIM, STED)
- d) Rastersondenmikroskope (STM, AFM)
- e) Elektronenmikroskope (TEM, SEM)

### 3. Diffraktionsmethoden

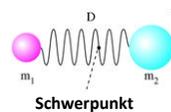
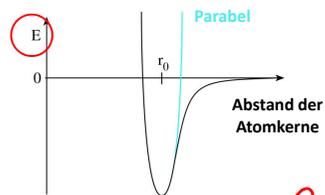
- a) Röntgendiffraktion
- b) Elektronendiffraktion
- c) Neutronendiffraktion

Lehrbuch: S. 400-409. und 570-571.

## Infrarotspektroskopie

- Infrarotes Licht:  $\lambda = 800 \text{ nm} - 1000 \mu\text{m}$
- Absorptionsspektroskopie
- Lichtabsorption induziert **Molekülschwingungen**
- Besonders empfindlich für die **Molekülstruktur**

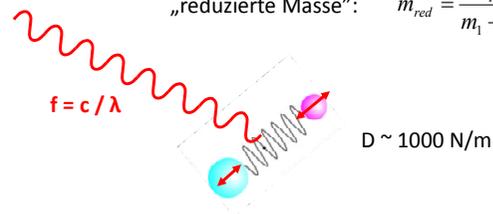
Nahe IR (NIR):  $800 \text{ nm} - 2,5 \mu\text{m}$   
**Mittleres IR (MIR): 2,5-50  $\mu\text{m}$**   
Ferne IR (FIR):  $50 \mu\text{m} - 1000 \mu\text{m}$



Frequenz der Schwingung:  $f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{red}}}$

„reduzierte Masse“:  $m_{red} = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$

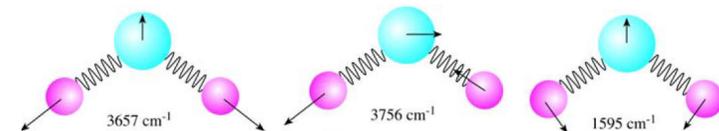
$E_{F,der} = \frac{1}{2} D \cdot \Delta x^2$  Parabel



## Mehratomige Moleküle: Die Schwingungen des Wassers



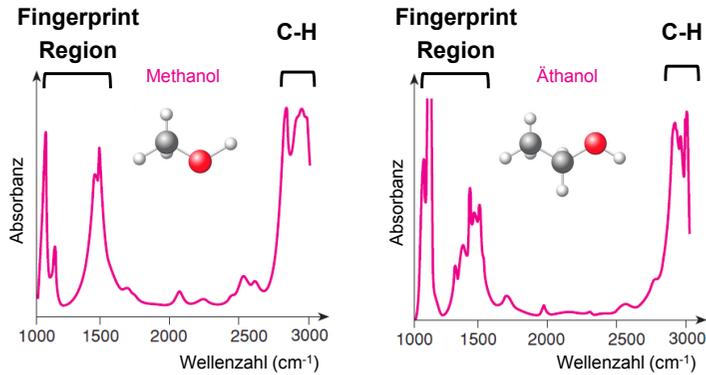
- Alle Atome schwingen mit derselben Frequenz aber mit unterschiedlichen Amplitude und Richtung.



# Anwendung: Identifizierung der Moleküle, Beweisung des Raumstruktues

Statt Wellenlänge verwendet man die Wellenzahl (Kehrwert der Wellenlänge):

$$\nu = \frac{1}{\lambda} \quad \nu: [\text{m}^{-1}, \text{cm}^{-1}] \quad \text{direkt proportional zur Photonenenergie}$$

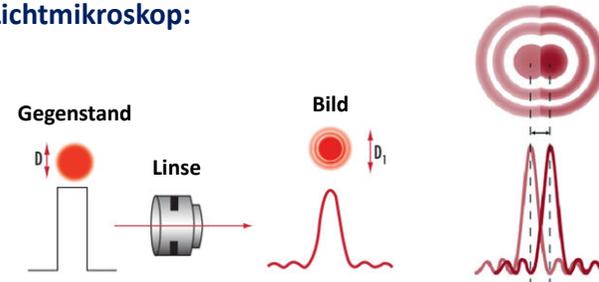


Mehr Infos: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxJm/Spectryp/InfraRed/InfraRed.htm>

Zur Erinnerung!

# Mikroskopie

Lichtmikroskop:

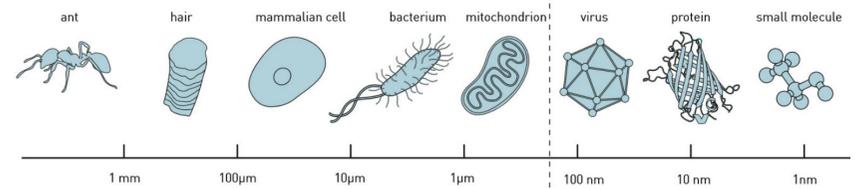


Das Abbesche Prinzip:  
Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

$$\delta = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \omega}$$

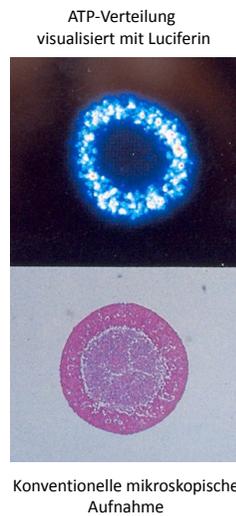
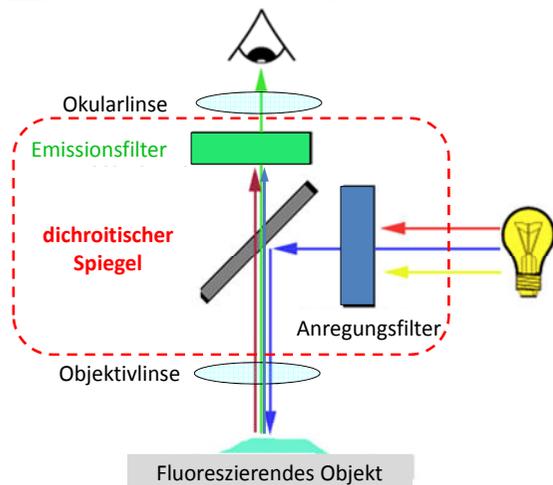
Numerische Apertur (NA)

Abbe-Limit bei ~200 nm

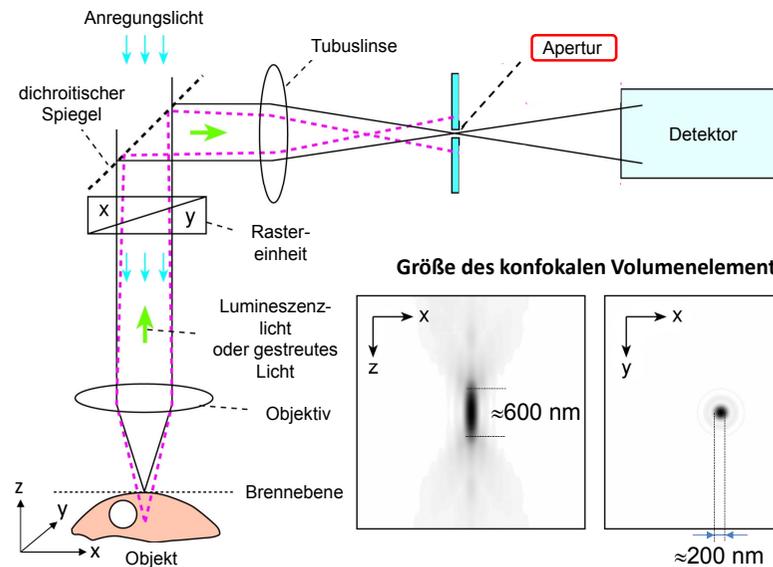


# Fluoreszenzmikroskop

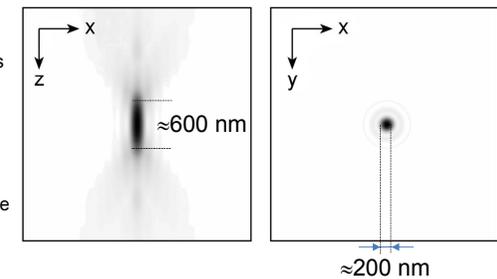
Epifluoreszenz-Anordnung:



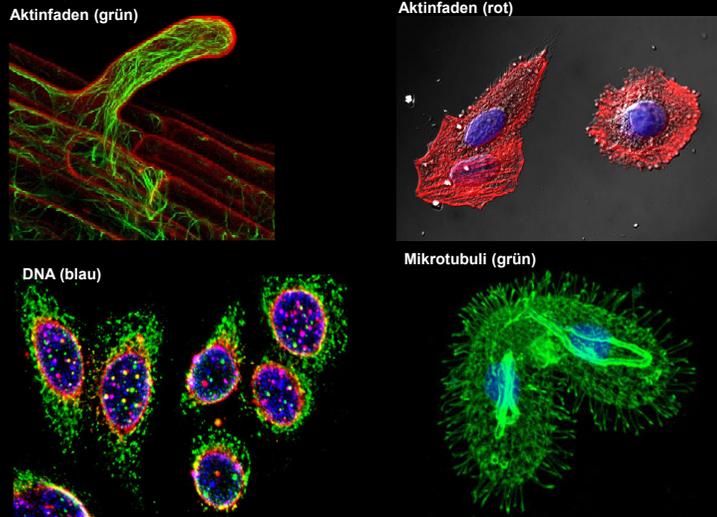
# Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)



Größe des konfokalen Volumenelements

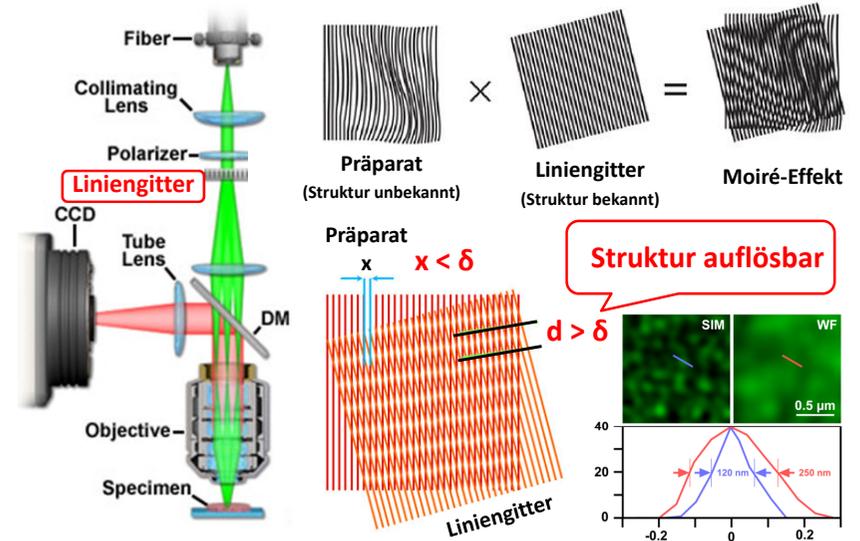


## Beispiele: CLSM-Aufnahmen



9

## Superresolutionsmikroskopie: Structured Illumination Microscopy (SIM)

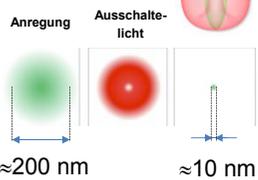
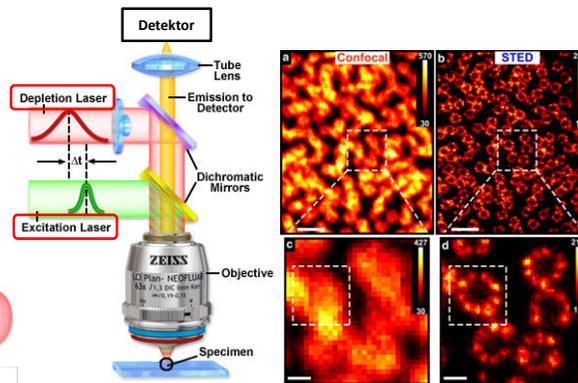


10

## Superresolutionsmikroskopie: Stimulierte Emission Depletion Microscopy (STED)



Stefan W. Hell  
Nobel Preis 2014



Abbe-Grenze Superresolution

- Anregung und „Abregung“ fast gleichzeitig
- Stimulierte Emission in einer sehr kleinen Raumteil
- Abtastung

11

## 3D-Auflösung der Spezialmikroskope

	CLSM	STED	CW-STED	3D-SIM		
$\sim \lambda_{em}$ [nm]	460-670	670	520	620	520	460
$z$	(PSF)	(PSF, reconstructed)				
100 nm						
0						
$\sim D_{xy}$ [nm]	180-250	60	70	130	110	100
$\sim D_z$ [nm]	500-700	700	560	340	280	250
$\sim V_{xyz}$ [ $\cdot 10^{-3} \mu\text{m}^3$ ]	10-23	1.3	1.5	3.0	1.8	1.3

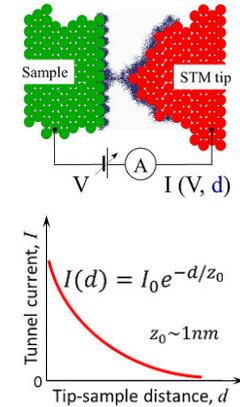
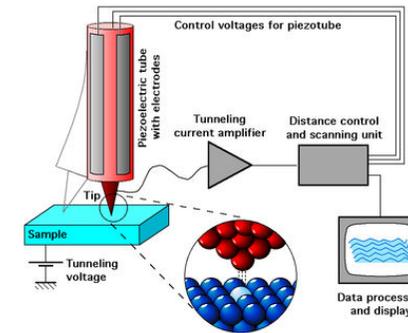
12

## Rastersondenmikroskopie

13

## Rastertunnelmikroskop (Scanning Tunneling Microscope, STM)

**Grundprinzip:** Bei einer angelegten Spannung zwischen einer feinen Spitze und einer Oberfläche fließt bei einem ausreichend kleinem Abstand messbaren Tunnelstrom.

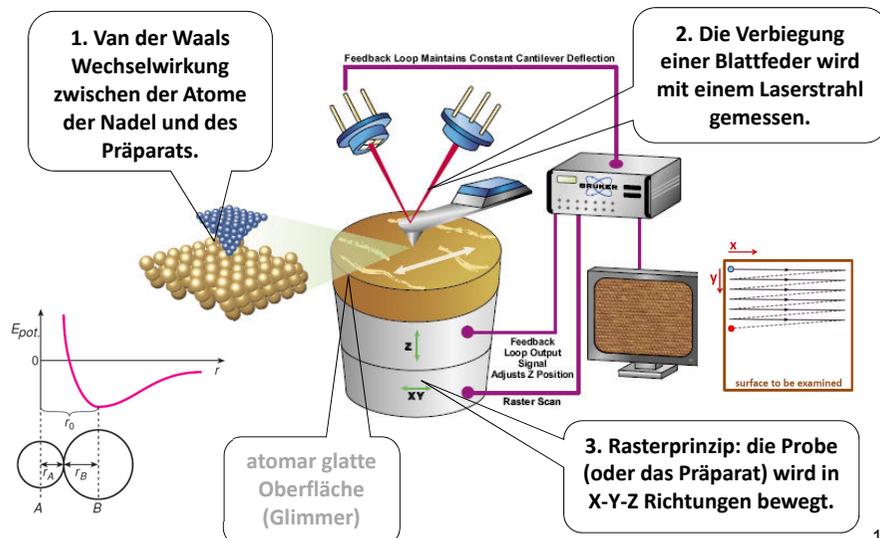


**Nachteil:** Präparat soll elektrischer Leiter sein.

14

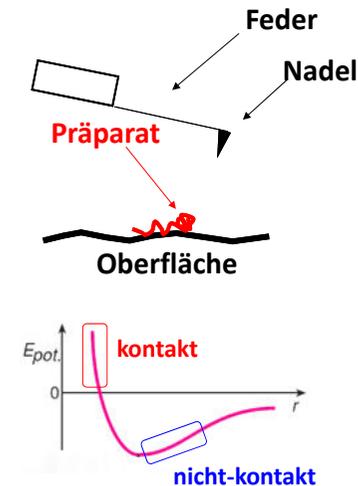
## Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM)

Lehrbuch: S. 579.



15

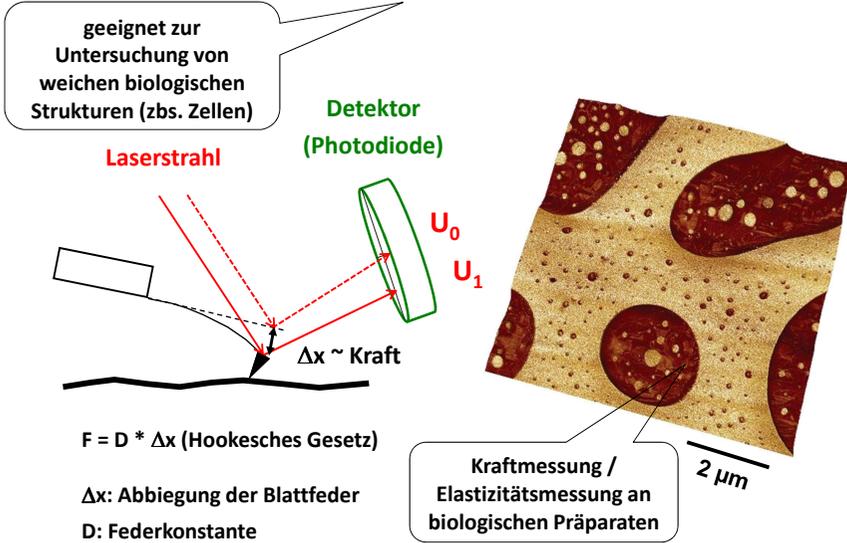
## AFM Betriebsarten



- **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** (zbs. Höhe) wird in jedem x,y Bildpunkt aus der  $\Delta z$  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  $\Delta z$  Höhenänderung des Cantilevers.

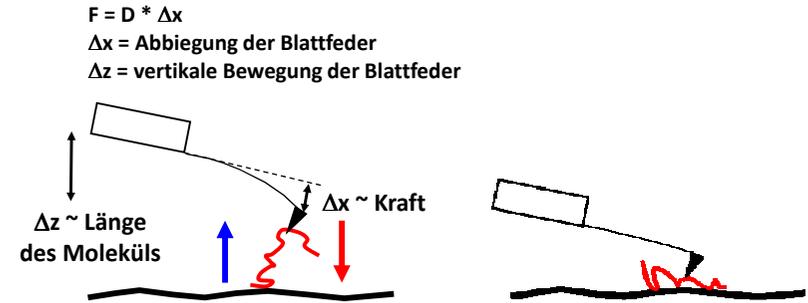
16

## AFM: Kontakt-Modus



17

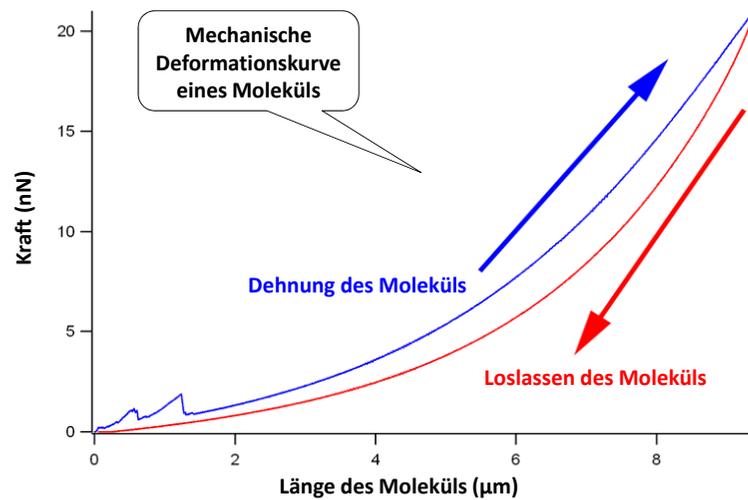
## Kraftmessung mit dem AFM



Typ der Wechselwirkung	Beispiel	Größe der Kraft
Kovalente Bindung	C-C	$\approx 1600$ pN
Sekundärbindungen	Biotin / Streptavidin	$\approx 160$ pN
Schwache Bindungen	H-Brücke	$\approx 4$ pN
Dehnung eines dsDNS Moleküls	zur 50% relative Verlängerung	0,1 pN

18

## Elastizitätsmessung mit dem AFM

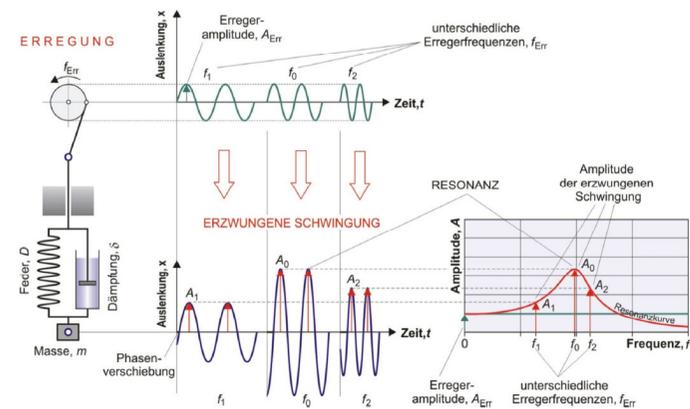


19

## Praktikum: Resonanz

## AFM: Nicht-Kontakt-Modus

**Resonanz:** Eine erzwungene Schwingung, bei der die Frequenz der äußeren Krafteinwirkung nahe der Eigenfrequenz des Schwingungssystems liegt. In diesem Fall können sehr große Amplituden auftreten.

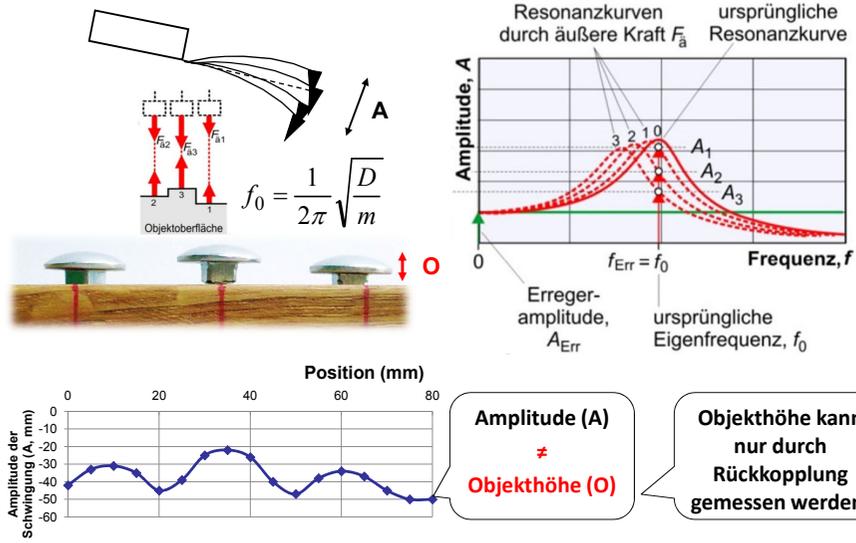


### Resonanzerscheinungen in der Medizin:

- Lichtabsorption
- MRI: Magnetresonanztomographie
- FRET: Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer

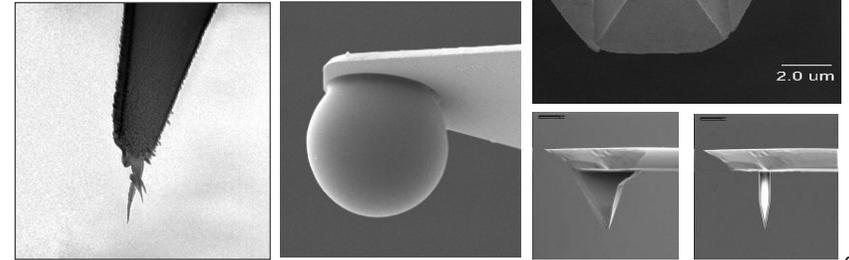
20

### AFM: Nicht-Kontakt-Modus

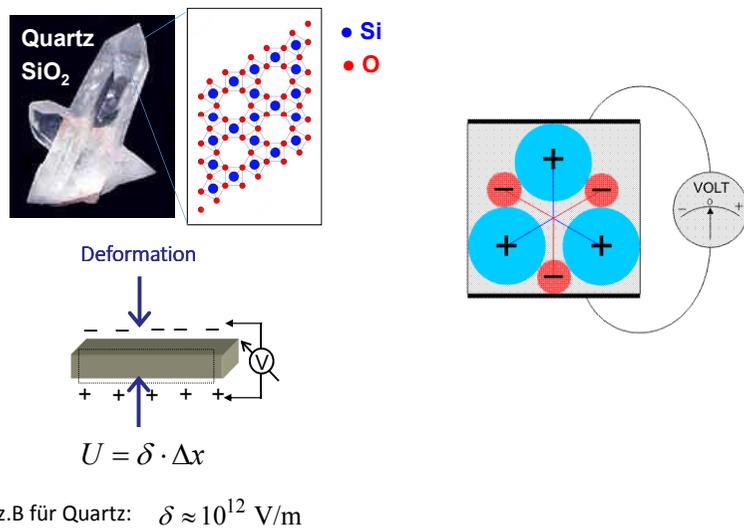


### Blattfeder / Cantilever

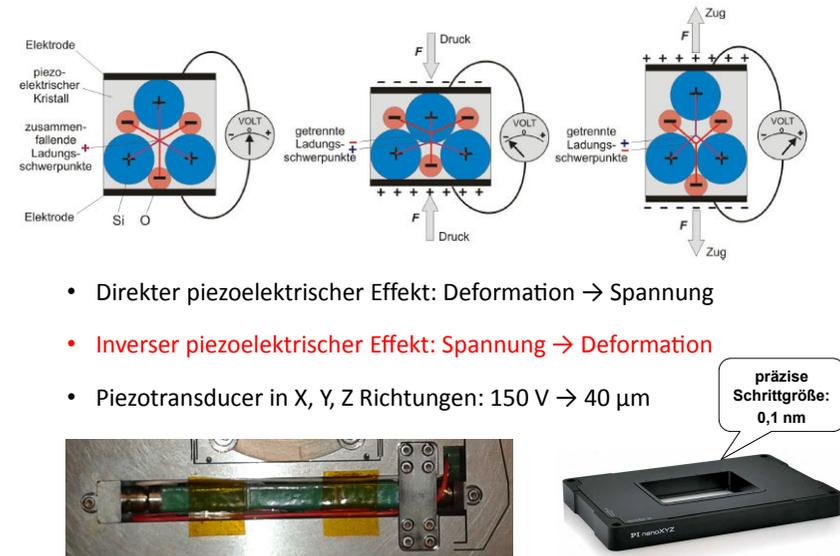
- Material: Siliciumnitrid ( $Si_3N_2$ )
- Krümmungsradius: 0,1 nm- 100  $\mu m$
- Federkonstante  $\sim$  0,1-10 N/m
- $f_0 \sim$  50-500 kHz



### Das Rasterprinzip: Piezoelektrizität



### Das Rasterprinzip: Piezoelektrizität



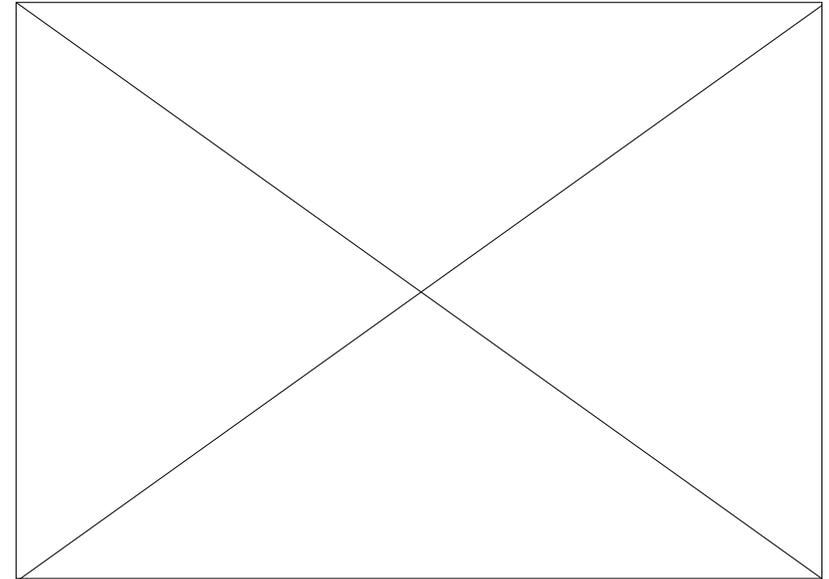
- Direkter piezoelektrischer Effekt: Deformation  $\rightarrow$  Spannung
- Inverser piezoelektrischer Effekt: Spannung  $\rightarrow$  Deformation
- Piezotransducer in X, Y, Z Richtungen: 150 V  $\rightarrow$  40  $\mu m$

## AFM - Eigenschaften

- **Vorteile:**
  - 3D topographische Abbildung mit hoher Auflösung.
  - Vertikale Auflösung ist im  $\sim 10$  pm-Bereich (laterale Auflösung: schlechter).
  - Elektrische Isolatoren oder lebendige Zellen können auch untersucht werden.
  - Messung auch in flüssigem Medium möglich.
  - Natives Präparat (Färbung oder Fixierung ist nicht notwendig).
  - Biologische Strukturen können unter physiologischen Bedingungen untersucht werden (Temperatur, pH, Ionenstärke).
- **Nachteile:**
  - Das Präparat soll zur Tragfläche konjugiert werden, dabei ändert sich eventuell seine Struktur.
  - Langsame Abtastung.
  - Maximale Abtasthöhe ist im  $\mu\text{m}$ -Bereich.
  - Maximale abtastbare Oberfläche liegt im  $100 \mu\text{m}^2$ -Bereich ( $10 \times 10 \mu\text{m}$  Rechteck).
  - Teuer (Instrument, Vorbereitung des Präparats, Cantilever, usw.).

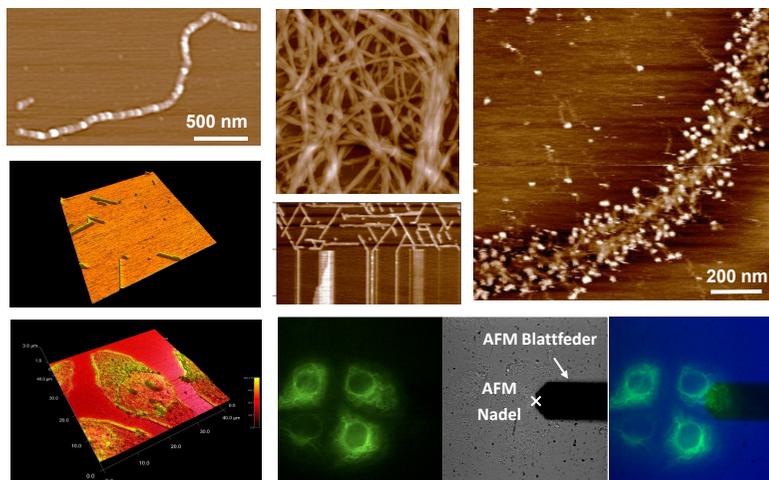
25

## Artefakte bei der Abbildung



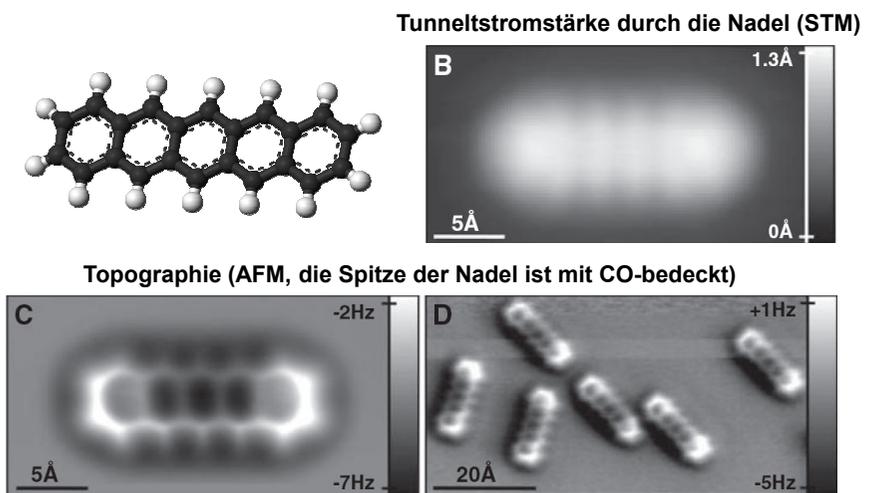
26

## AFM-Bilder aus unserem Institut



27

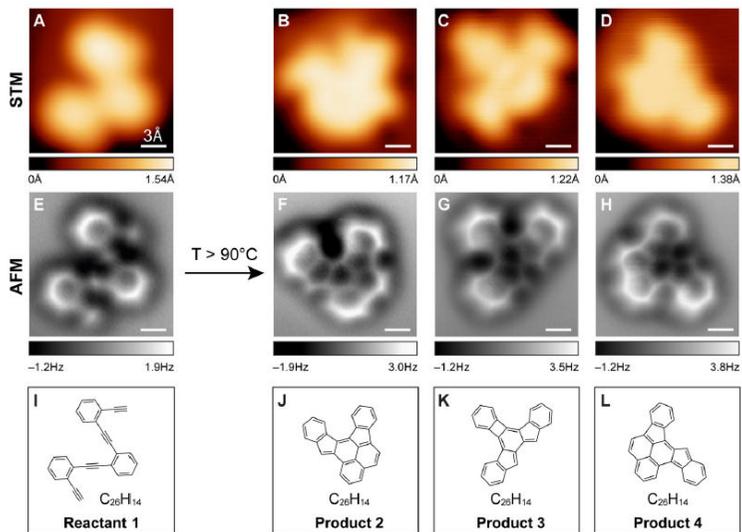
## Pentacen Molekül



*Nature Chemistry* 1, 597 - 598 (2009)

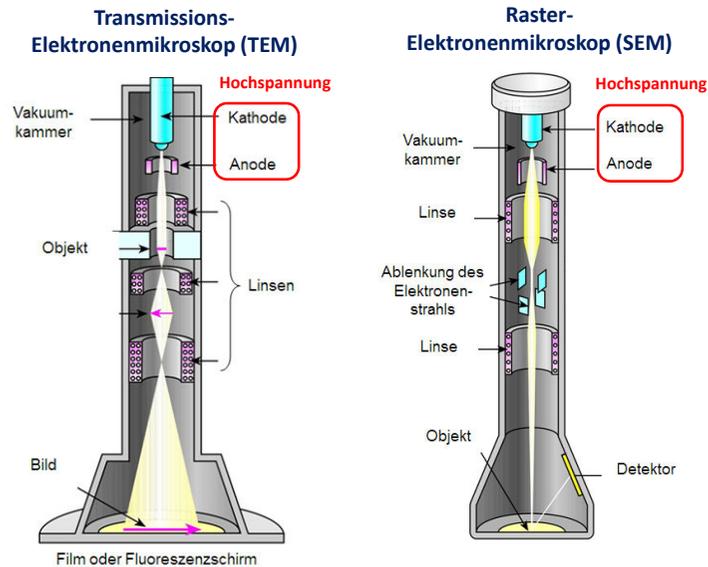
28

## Visualisierung von chemischen Reaktionen („Elektronendensität“)



29

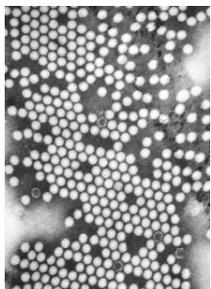
## Elektronenmikroskope



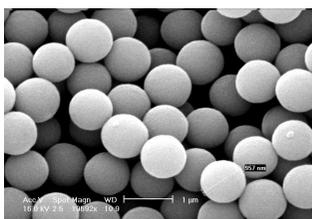
30

## Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugelchen (SEM)



Auflösungsgrenze ( $\delta$ ):

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

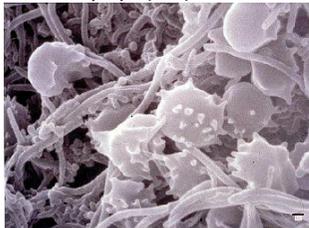
$$NA \approx 0,03$$

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

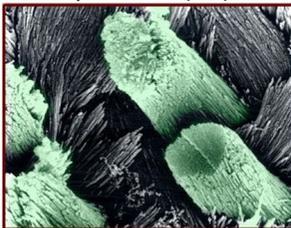
s. Materiewellen!  $\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$

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

Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den Apatitkristallen (SEM)



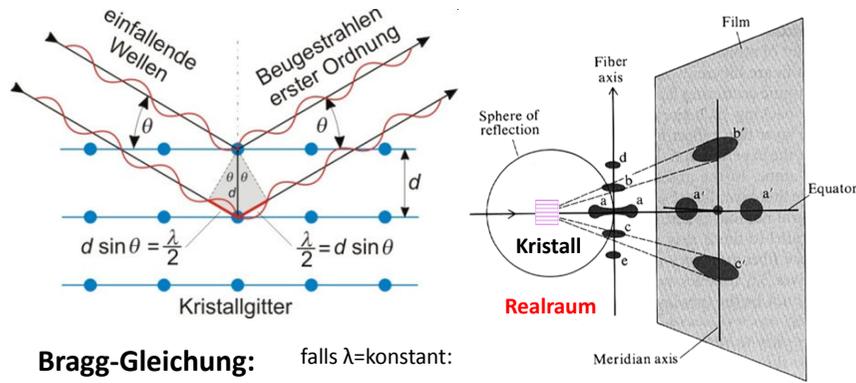
Dentin mit den Odontoblasten (SEM)



## Diffraktionsmethoden

32

# Röntgendiffraktion - Grundlagen



**Bragg-Gleichung:** falls  $\lambda = \text{konstant}$ :

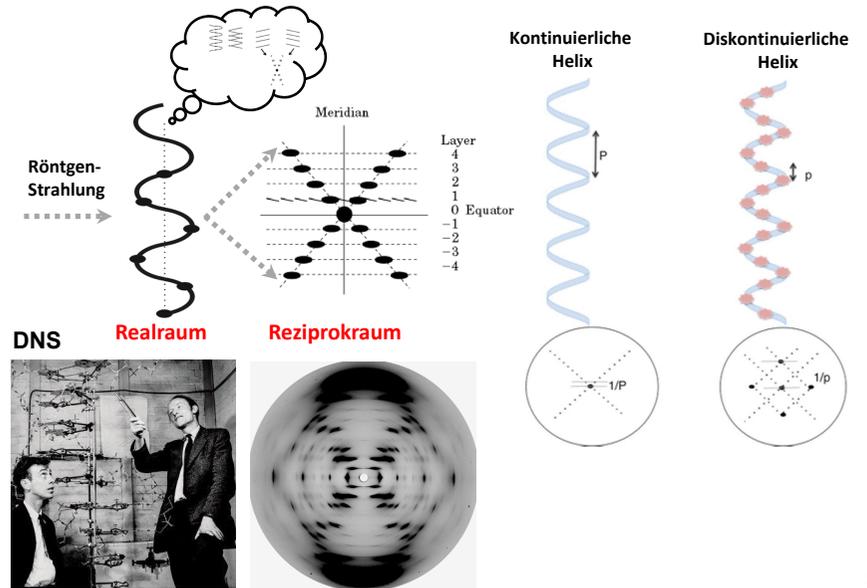
$$2d \sin \theta = n\lambda$$

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

- $d$ : Gitterabstand
  - $\theta$ : Einfallswinkel
  - $\lambda$ : Wellenlänge
- { Röntgendiffraktion: 0,01-0,1 nm  
 Elektronendiffraktion: 0,1 nm  
 Neutronendiffraktion: 0,01 nm

$$1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$$

# Röntgendiffraktion an Fasern



# The Advanced Photon Source

Ergänzungsmaterial!

- Erzeugung der monoenergetischen Röntgenstrahlung.

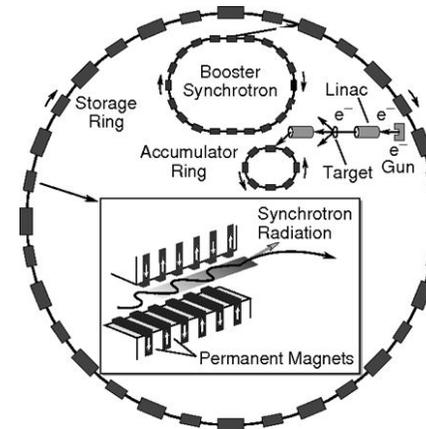
$$2d \sin \theta = n\lambda \quad \lambda \text{ soll konstant sein!}$$



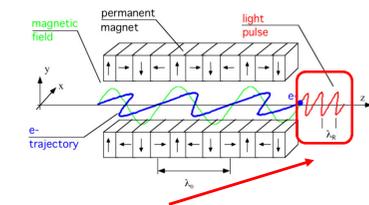
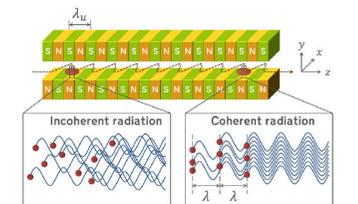
# The Advanced Photon Source

Ergänzungsmaterial!

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad \lambda \text{ soll konstant sein!}$$

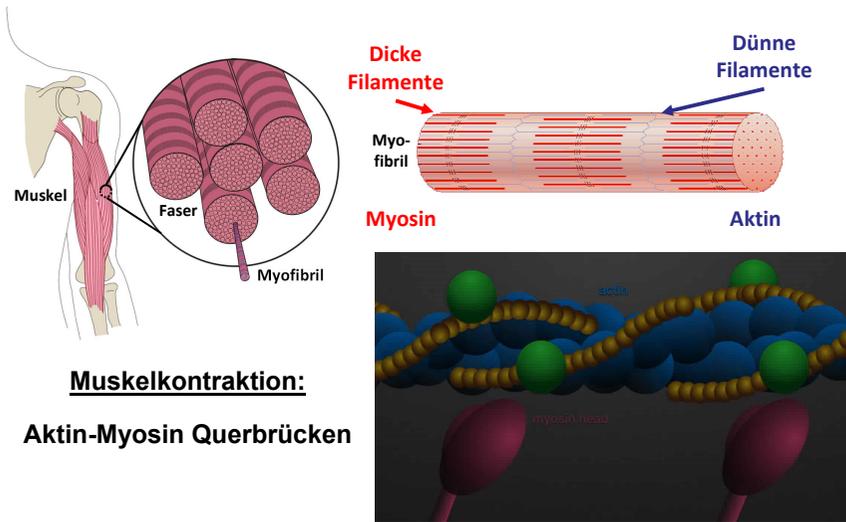


## Undulator



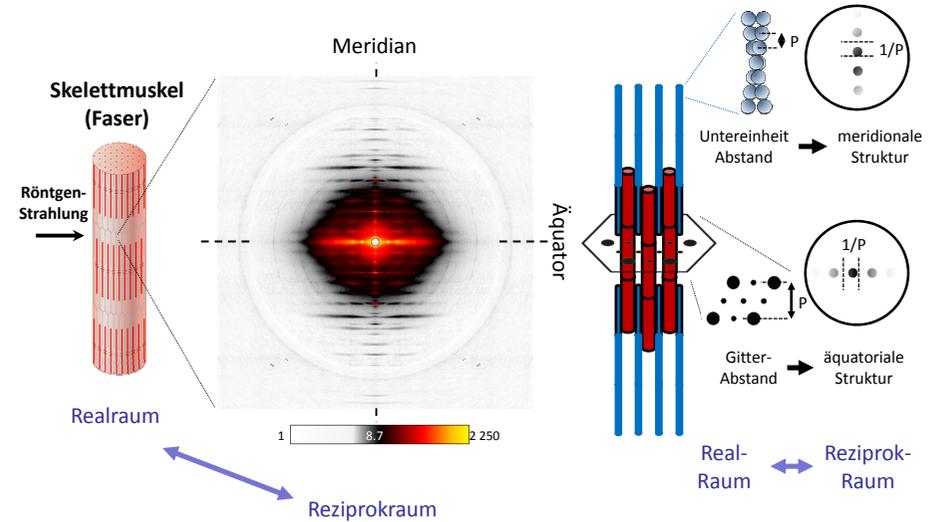
$$\lambda = \text{konstant} = 0.1033 \text{ nm}$$

## Röntgendiffraktion an Skelettmuskel



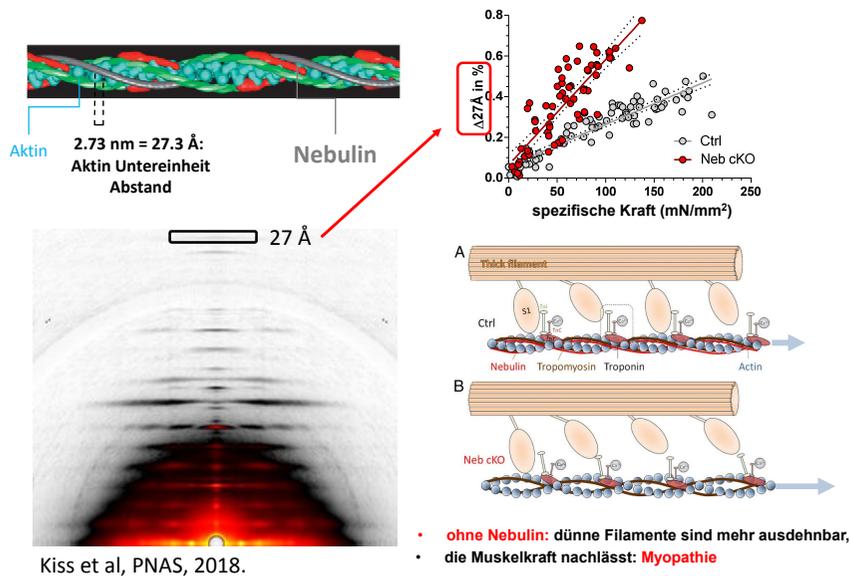
37

## Röntgendiffraktion an Skelettmuskel



38

## Beispiel: die Rolle von Nebulin in Skelettmuskel



39

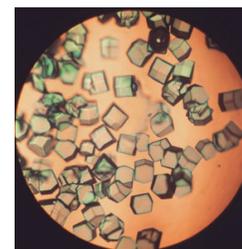
## Röntgendiffraktion – weitere Beispiele

<https://www.rcsb.org/>

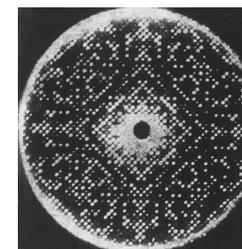


Heute: 157 935 Strukturen sind erreichbar (18.11.2018: 146 266 Strukturen).

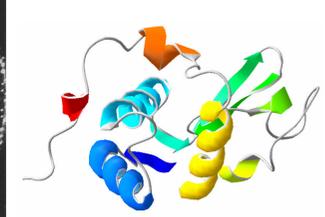
### Lysozyme



### Diffractionsbild

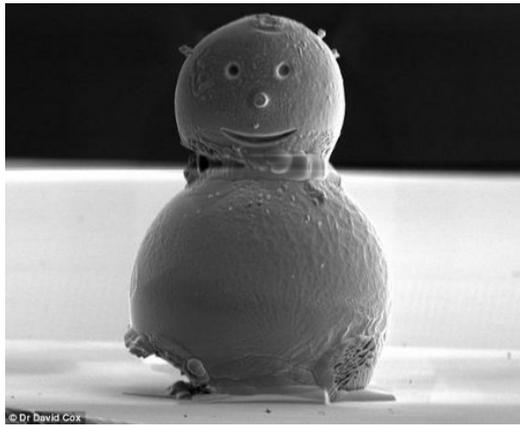


### 3D-Struktur



40

**Hausaufgaben: Aufgabensammlung 10.1-3 und 9-10**



10  $\mu\text{m}$