

Strukturuntersuchungsmethoden in der Medizin:

Spektroskopische und mikroskopische Methoden.

Superresolutionsmikroskopie.

Balázs Kiss

kissb3@gmail.com



Nanobiotechnologie und Einzelmolekül-Forschungsgruppe und
Myofilament-Mechanobiophysik Forschungsgruppe,
Semmelweis Universität,
Institut 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) Superresolutionsmikroskopie (SIM, STED)
- d) Rastersondenmikroskope (STM, AFM)
- e) Elektronenmikroskope (TEM, SEM)

3. Diffraktionsmethoden

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

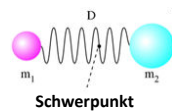
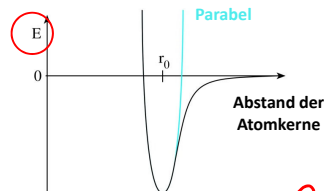
2

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

Infrarotspektroskopie

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

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



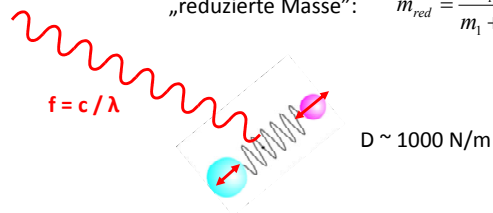
Frequenz der Schwingung:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{red}}}}$$

„reduzierte Masse“:

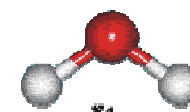
$$m_{\text{red}} = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

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

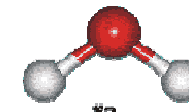


3

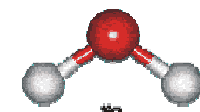
Mehratomige Moleküle: Die Schwingungen des Wassers



**Symmetrische
Valenzschwingung**

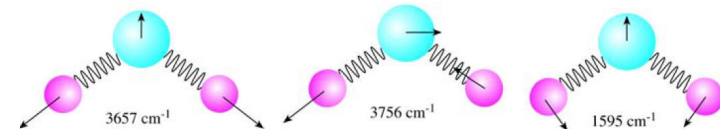


**Antisymmetrische
Valenzschwingung**



**Deformations-
schwingung**

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

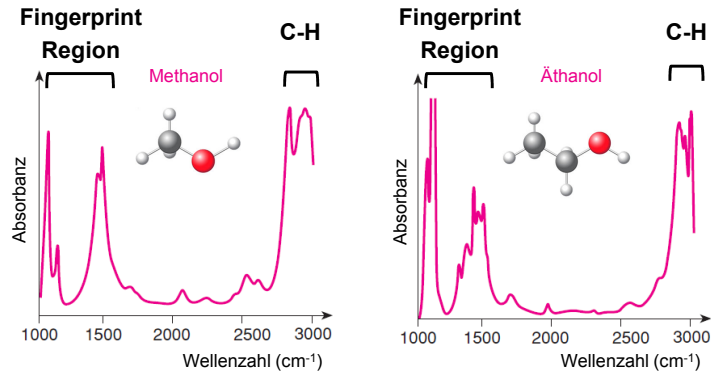


4

Anwendung: Identifizierung der Moleküle, Beweisung des Raumstrukture

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/VirtTxJml/Spectrpy/InfraRed/InfraRed.htm>

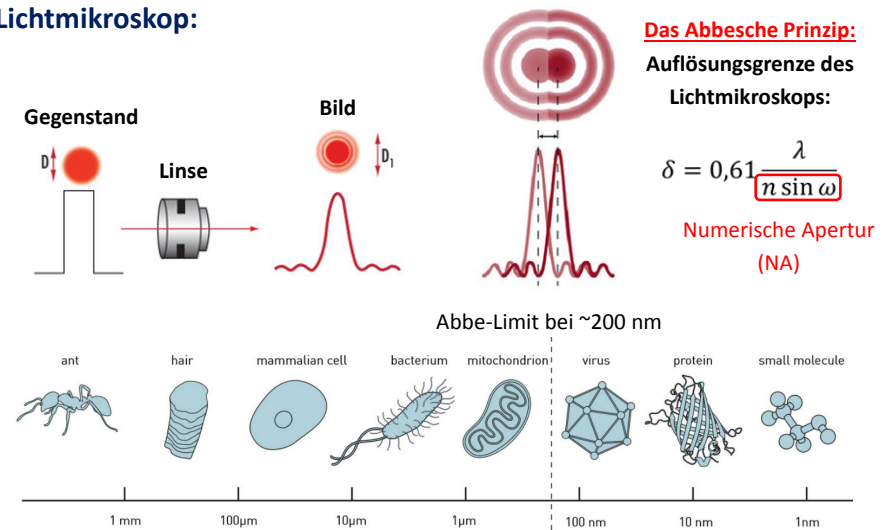
5

Lehrbuch: S. 384.

Zur Erinnerung!

Mikroskopie

Lichtmikroskop:

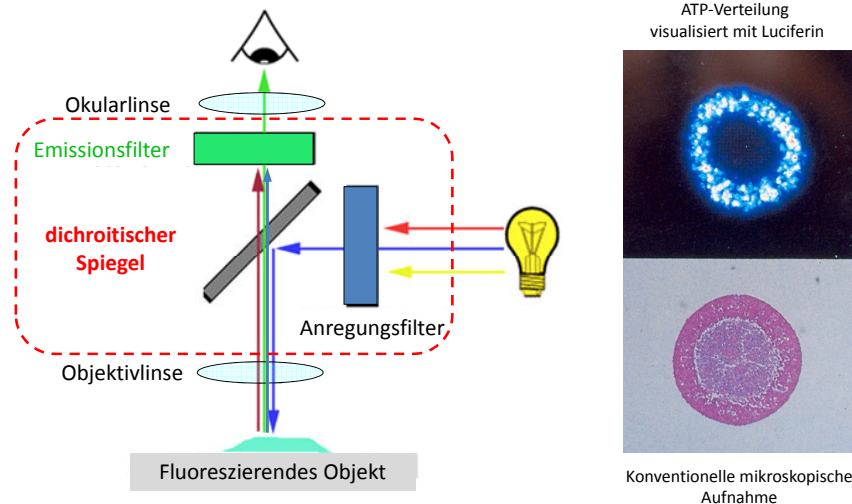


6

Lehrbuch: S. 388-389.

Fluoreszenzmikroskop

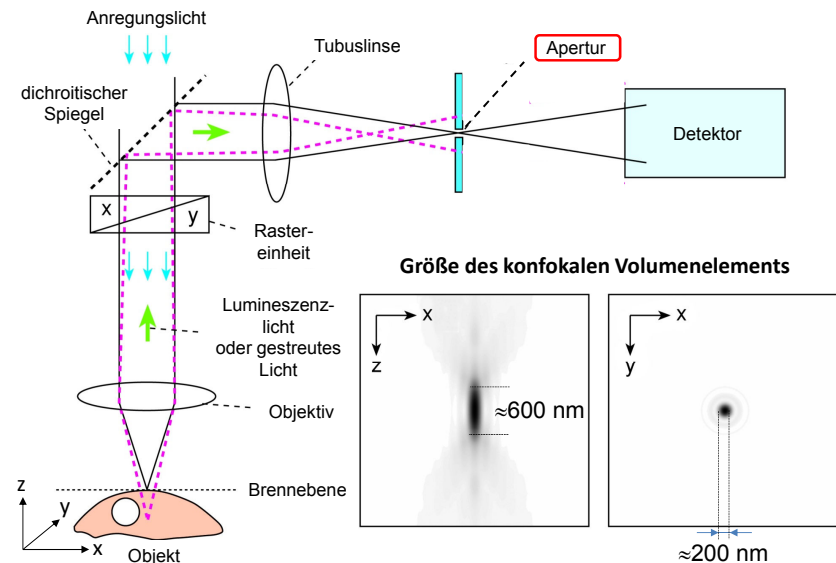
Epifluoreszenz-Anordnung:



7

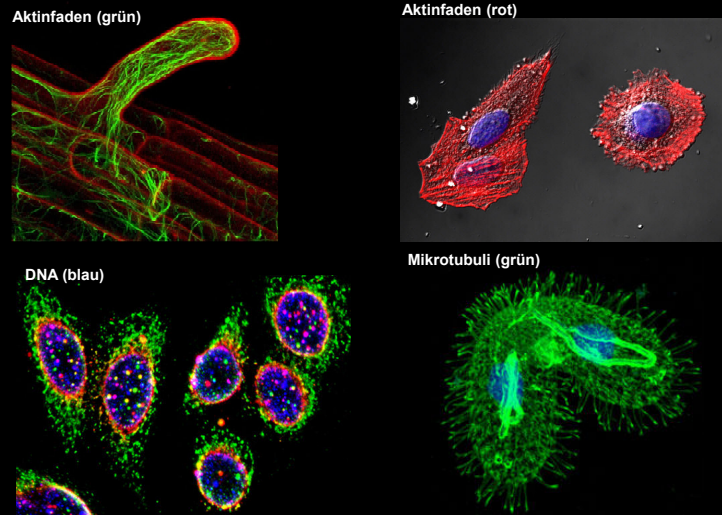
Lehrbuch: S. 582-588.

Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)



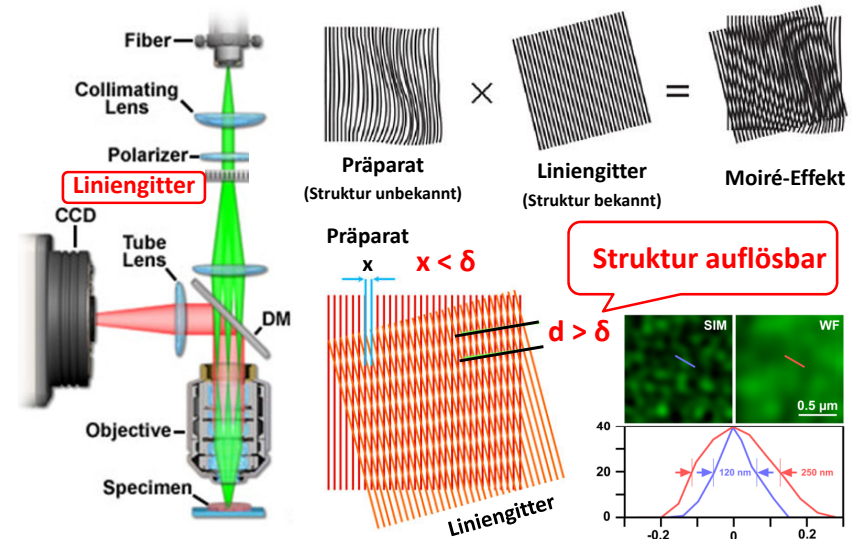
8

Beispiele: CLSM-Aufnahmen



9

Superresolutionsmikroskopie: Structured Illumination Microscopy (SIM)

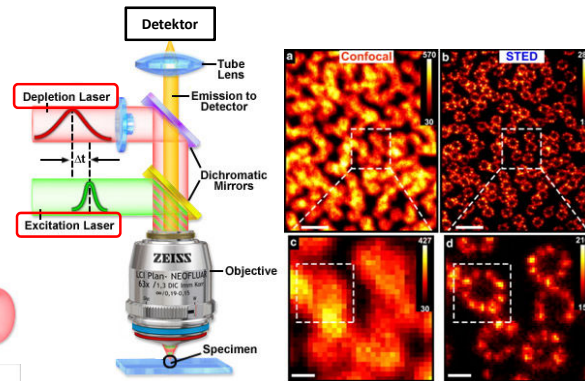


10

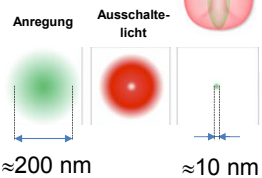
Superresolutionsmikroskopie: Stimulierte Emission Depletion Microscopy (STED)



Stefan W. Hell
Nobel Preis 2014



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



Abbe-Grenze

Superresolution

11

3D-Auflösung der Spezialmikroskope

	CLSM	STED	CW-STED	3D-SIM		
$\sim \lambda_{\text{em}}$ [nm]	460-670	670	520	620	520	460
	(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

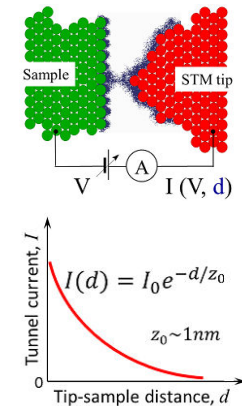
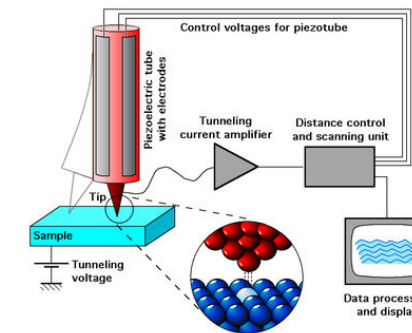
12

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.

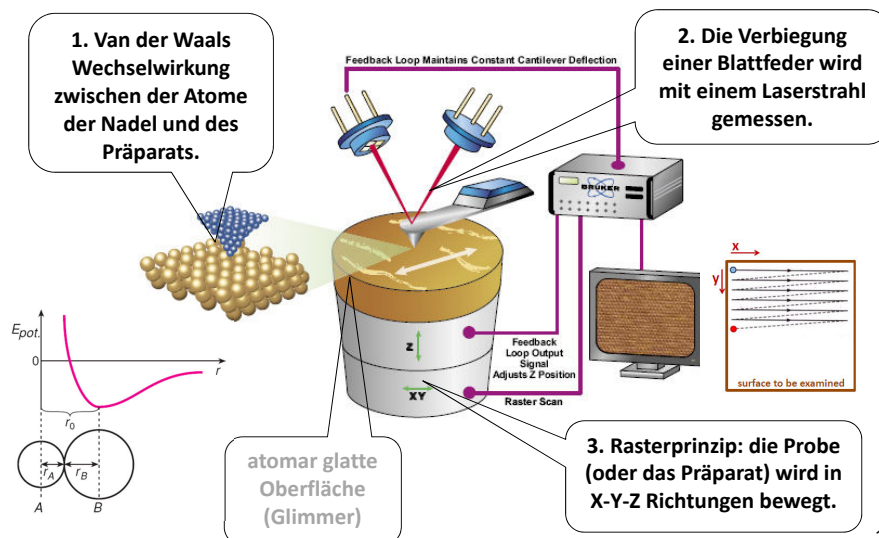


Nachteil: Präparat soll elektrischer Leiter sein.

14

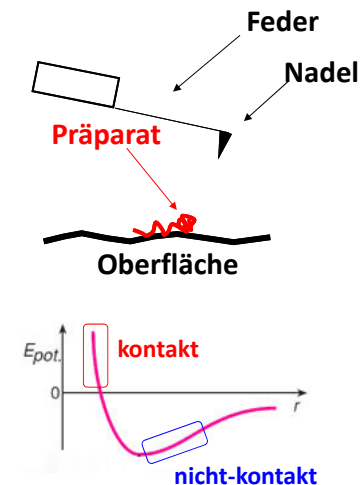
Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM)

Lehrbuch: S. 579.



15

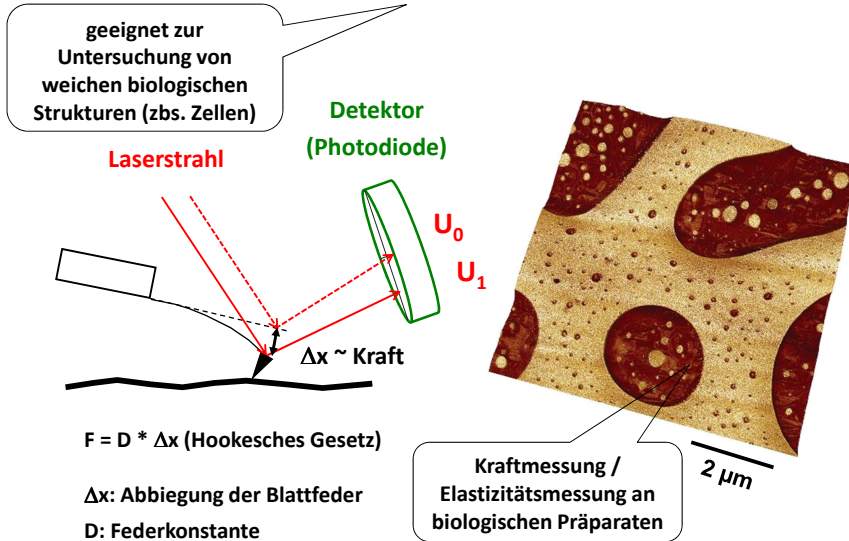
AFM Betriebsarten



- **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 Δz 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 Δz Höhenänderung des Cantilevers.

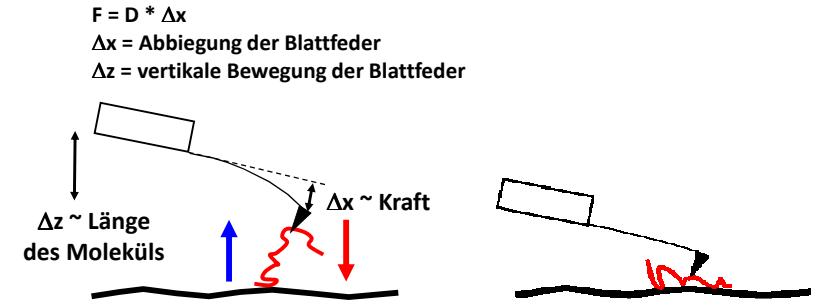
16

AFM: Kontakt-Modus



17

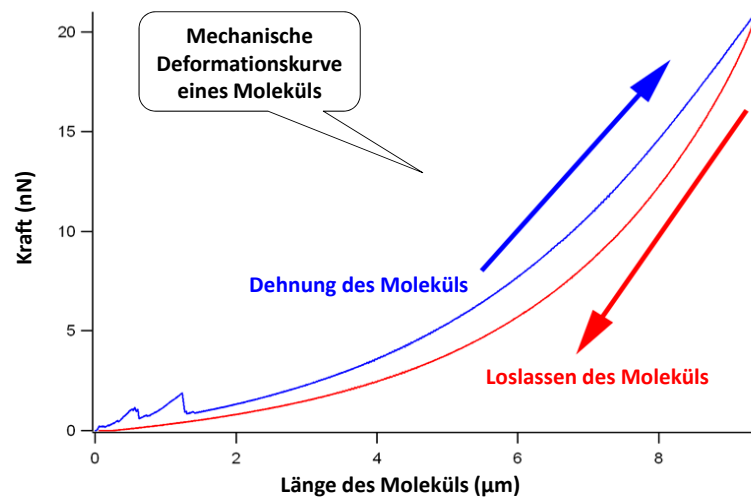
Kraftmessung mit dem AFM



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

18

Elastizitätsmessung mit dem AFM

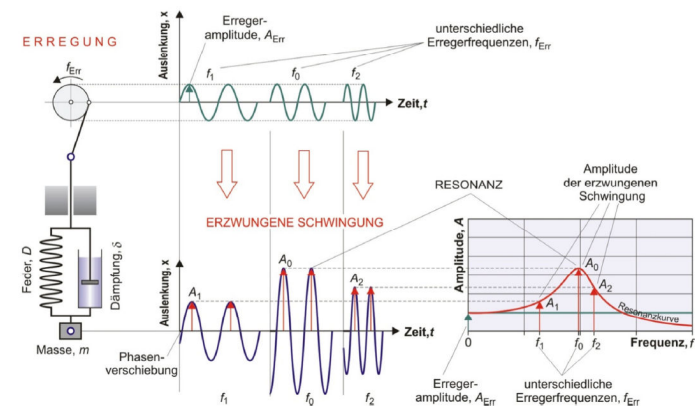


19

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.

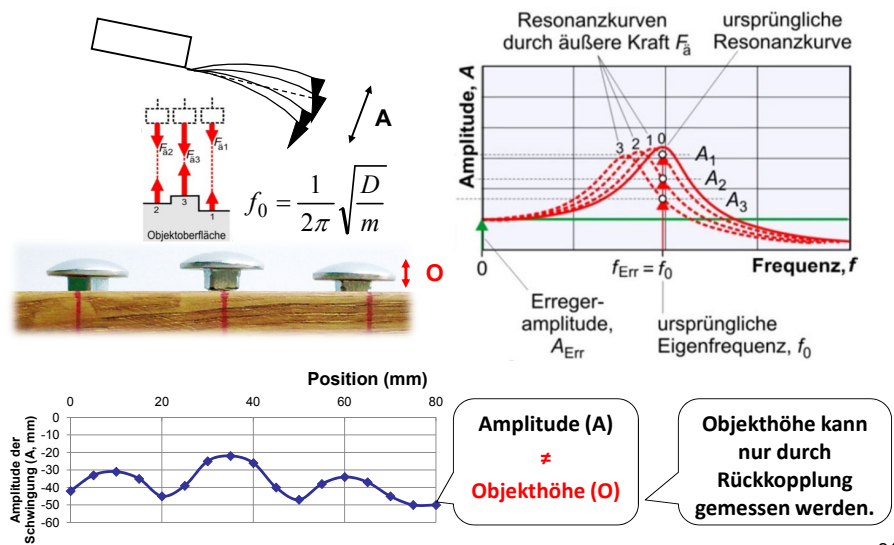


Resonanzerscheinungen in der Medizin:

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

20

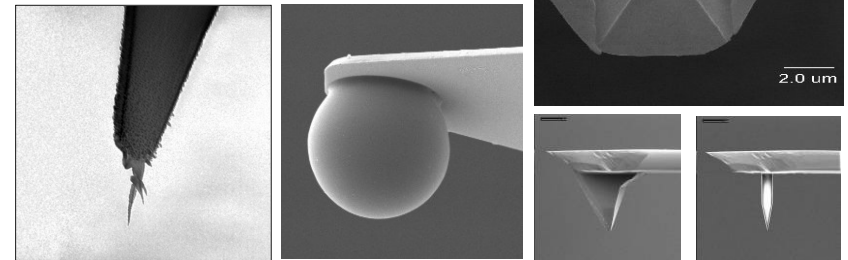
AFM: Nicht-Kontakt-Modus



21

Blattfeder / Cantilever

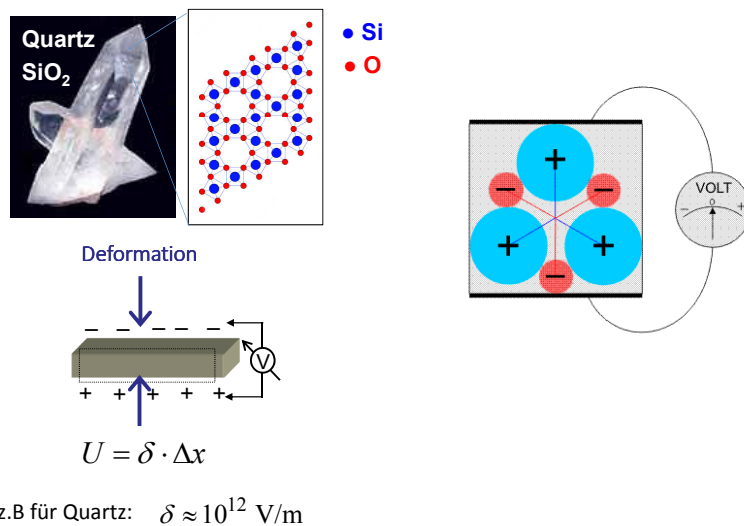
- Material: Siliciumnitrid (Si_3N_2)
- Krümmungsradius: 0,1 nm- 100 μm
- Federkonstante \sim 0,1-10 N/m
- $f_0 \sim$ 50-500 kHz



22

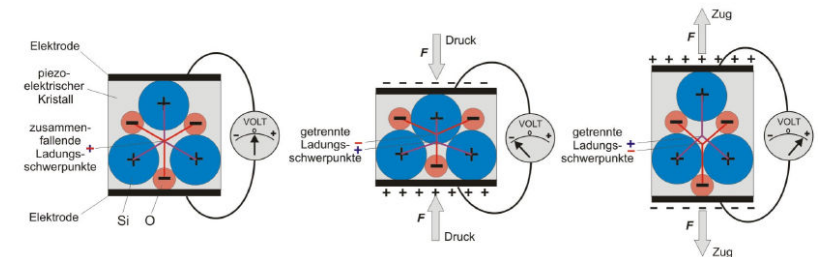
s. später: Sonographie

Das Rasterprinzip: Piezoelektrizität



23

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 μm



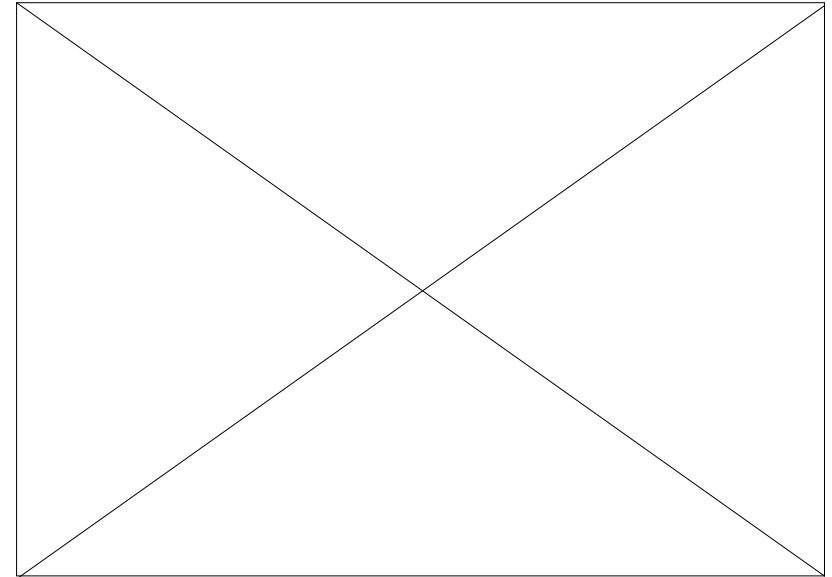
24

AFM - Eigenschaften

- **Vorteile:**
 - 3D topographische Abbildung mit hoher Auflösung.
 - Vertikale Auflösung ist im ~ 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 μm -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.).

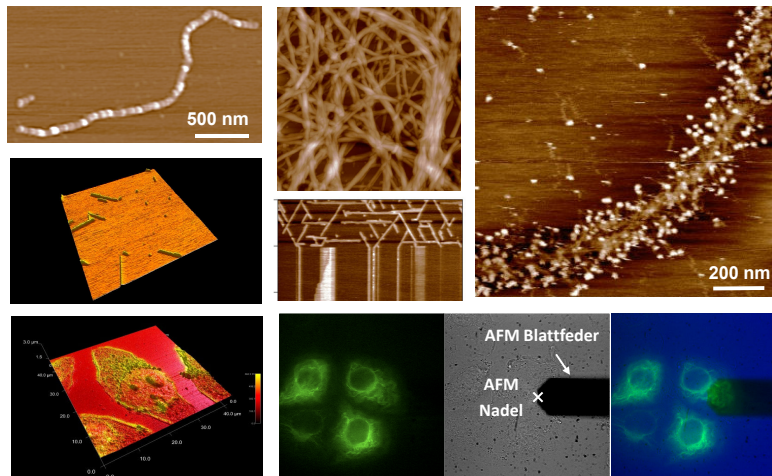
25

Artefakte bei der Abbildung



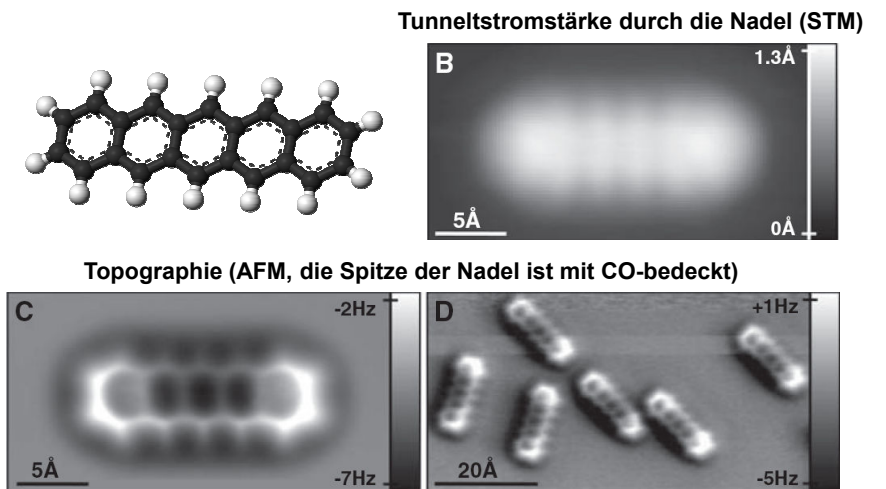
26

AFM-Bilder aus unserem Institut



27

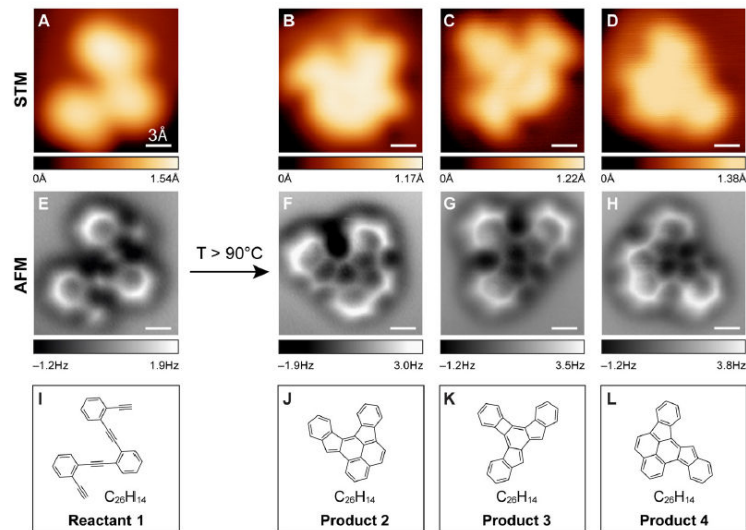
Pentacen Molekül



Nature Chemistry 1, 597 - 598 (2009)

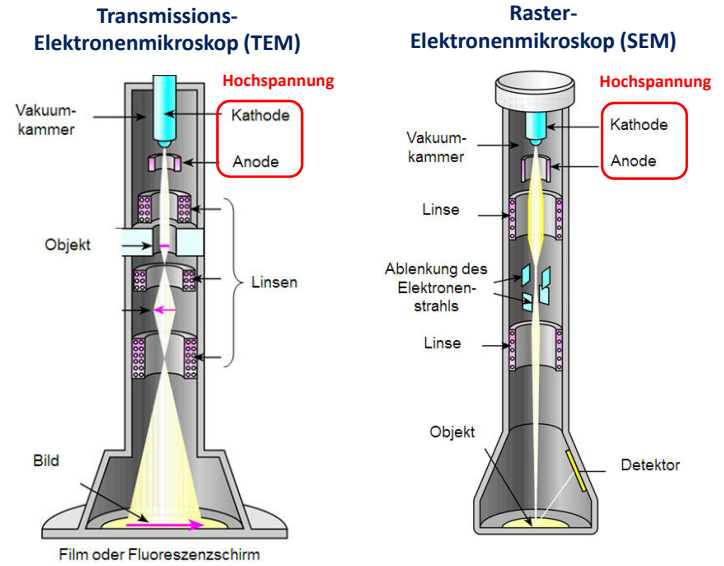
28

Visualisierung von chemischen Reaktionen („Elektronendensität“)



29

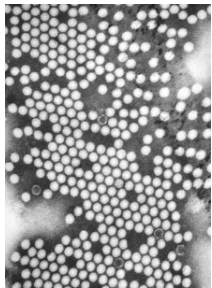
Elektronenmikroskope



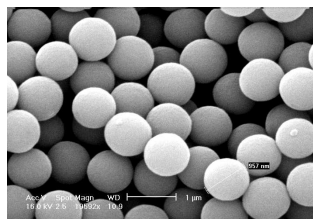
30

Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugeln (SEM)



Auflösungsgrenze (δ):

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

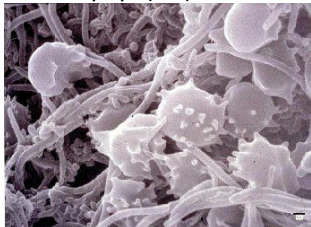
$$NA \approx 0,03$$

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

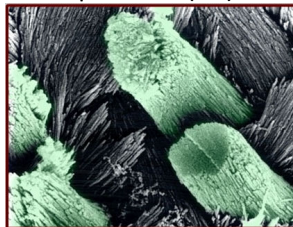
$$\delta \approx 0,2 \text{ nm}$$

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

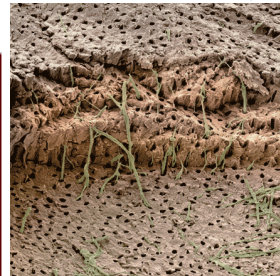
Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den Apatitkristallen (SEM)



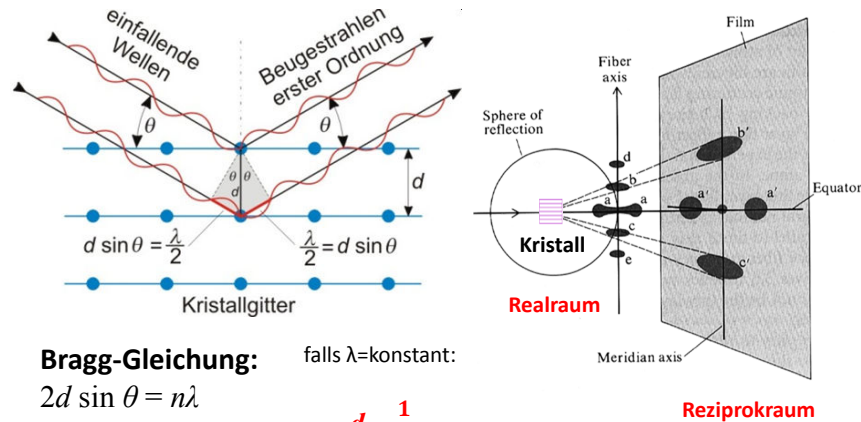
Dentin mit den Odontoblasten (SEM)



Diffraktionsmethoden

32

Röntgendiffraktion - Grundlagen



Bragg-Gleichung: falls $\lambda = \text{konstant}$:
 $2d \sin \theta = n\lambda$

d : Gitterabstand
 θ : Einfallswinkel
 λ : Wellenlänge

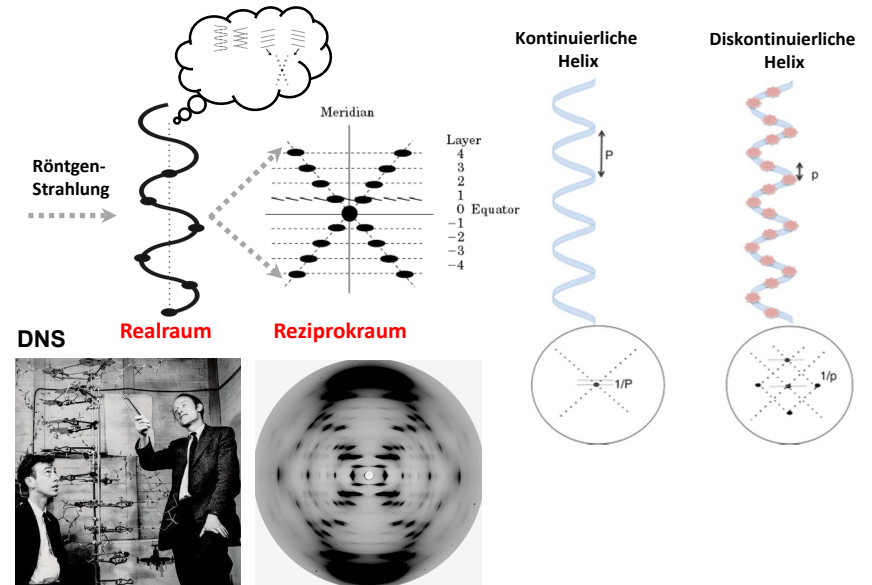
Röntgendiffraktion: 0,01-0,1 nm
 Elektronendiffraktion: 0,1 nm
 Neutronendiffraktion: 0,01 nm

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

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

33

Röntgendiffraktion an Fasern



34

The Advanced Photon Source

Ergänzungsmaterial!

- Erzeugung der monoenergetischen Röntgenstrahlung.

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

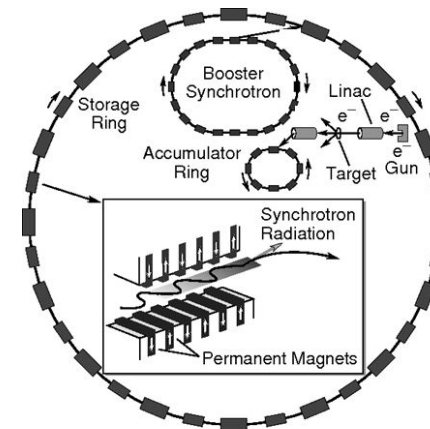


35

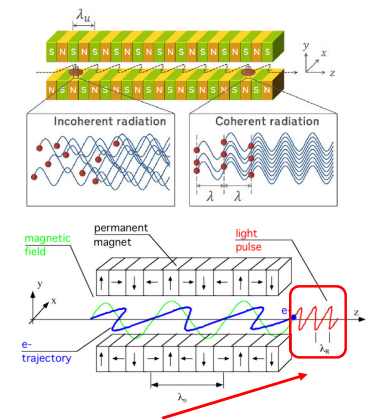
The Advanced Photon Source

Ergänzungsmaterial!

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



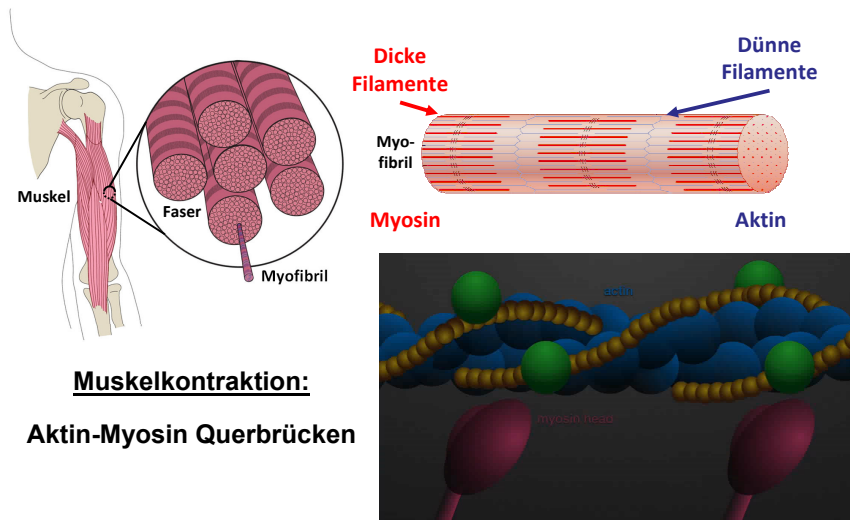
Undulator



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

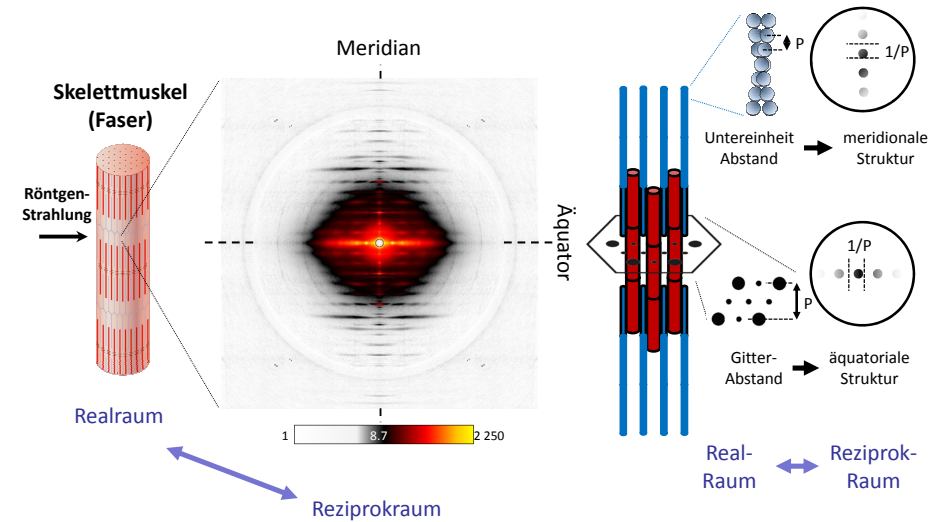
36

Röntgendiffraktion an Skelettmuskel



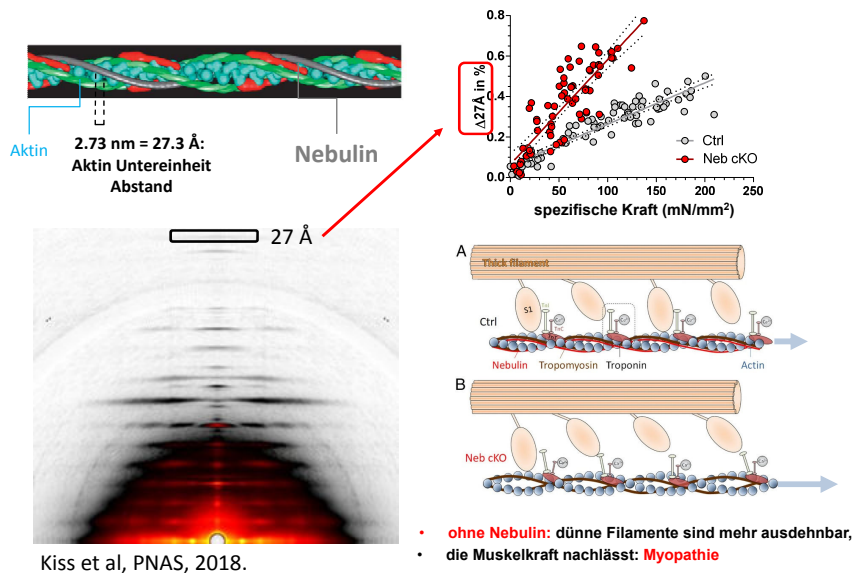
37

Röntgendiffraktion an Skelettmuskel



38

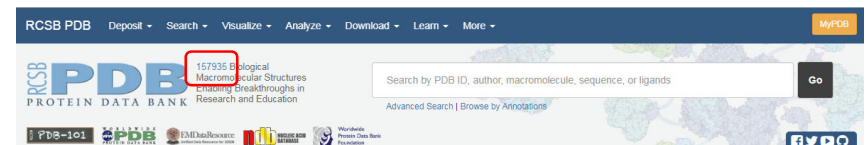
Beispiel: die Rolle von Nebulin in Skelettmuskel



39

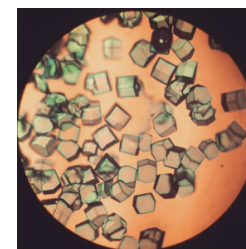
Röntgendiffraktion – weitere Beispiele

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

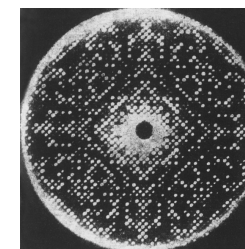


Heute: 157 935 Strukturen sind erreichbar (18.11.2018: 146 266 Strukturen).

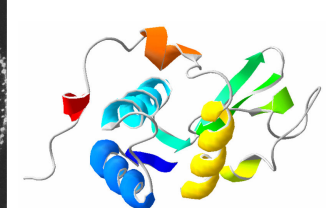
Lysozyme



Diffractionsbild



3D-Struktur



40

Hausaufgaben: Aufgabensammlung 10.1-3 und 9-10

