

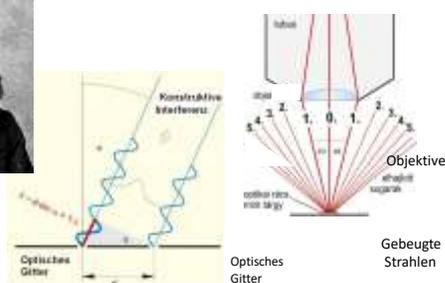
## Methoden der Strukturenuntersuchung

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)	
10 <sup>-9</sup>	nanometer	Protein	
10 <sup>-10</sup>	– Angström	Durchmesser des Atoms, H Atom $\varnothing \approx 1$ Angström (Å)	
10 <sup>-12</sup>	pikometer	Wellenlänge der Röntgenstrahlung	
10 <sup>-15</sup>	femtometer	Atomkern	

### Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops

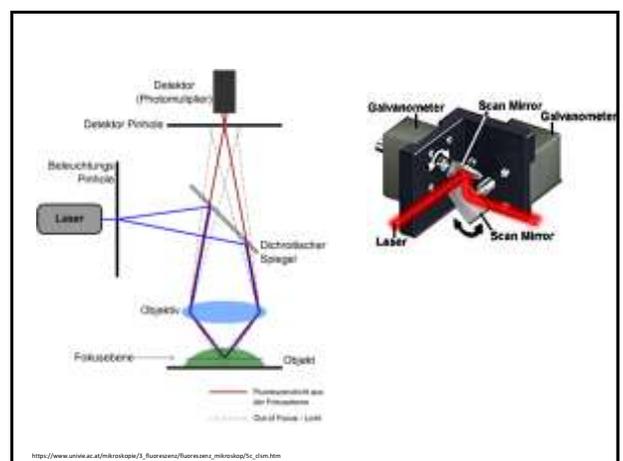
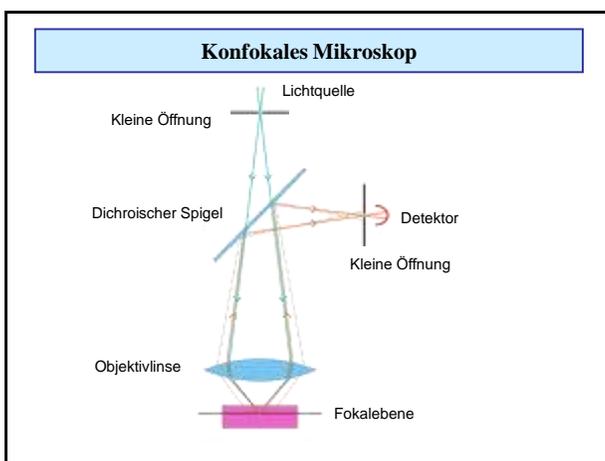
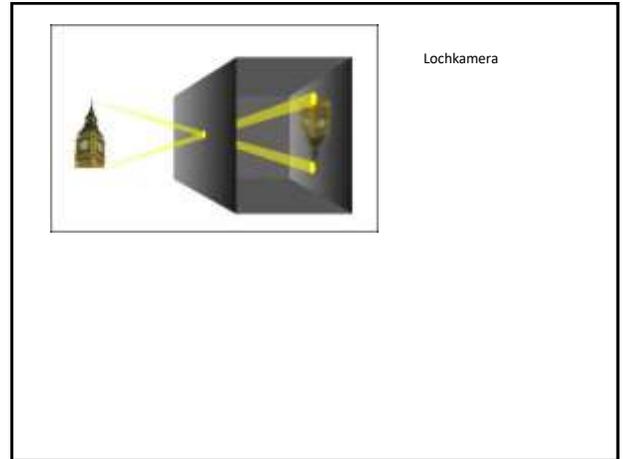
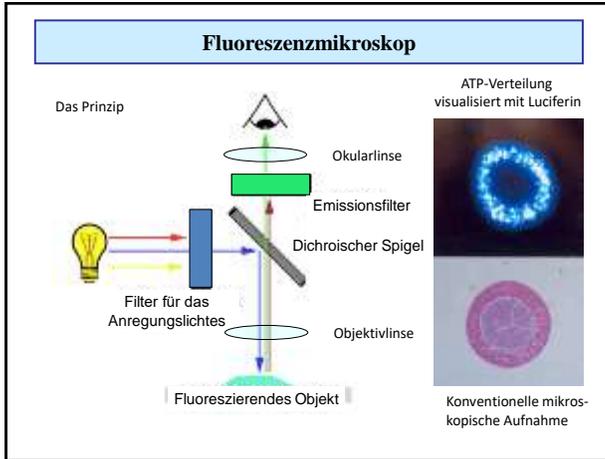


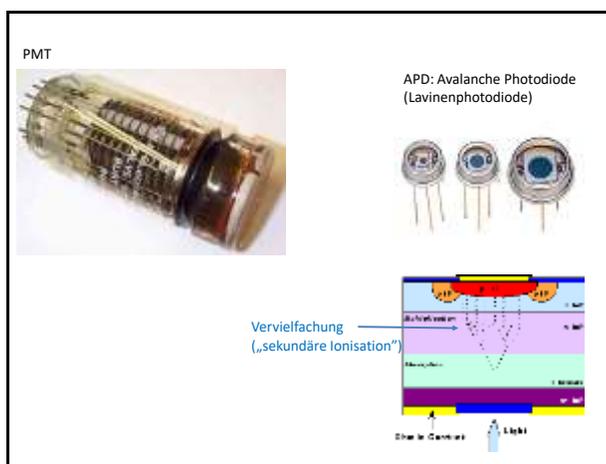
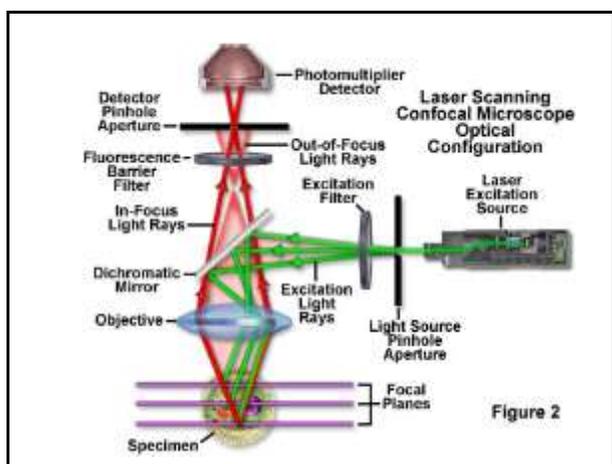
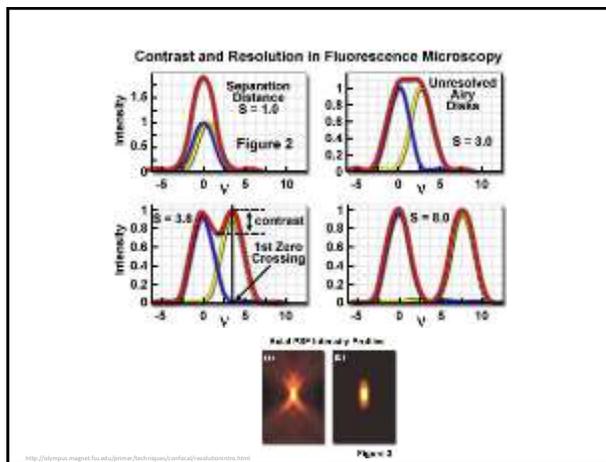
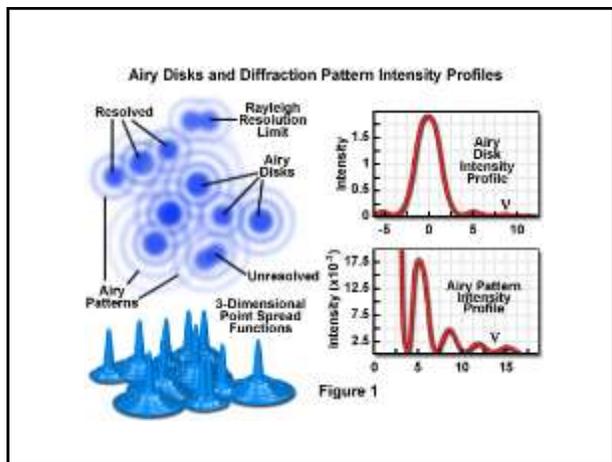
Auflösungsgrenze:  $\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin\omega)$

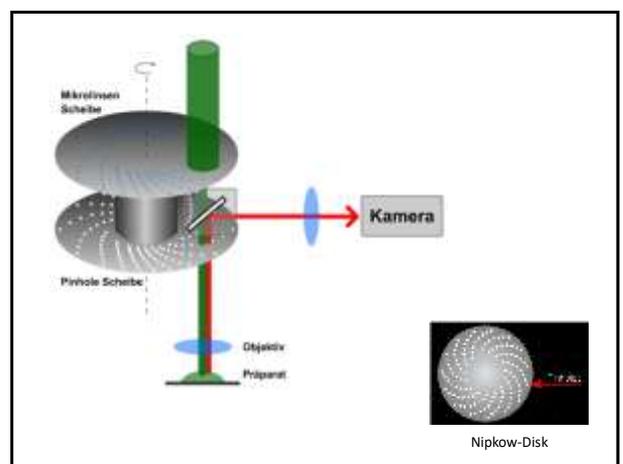
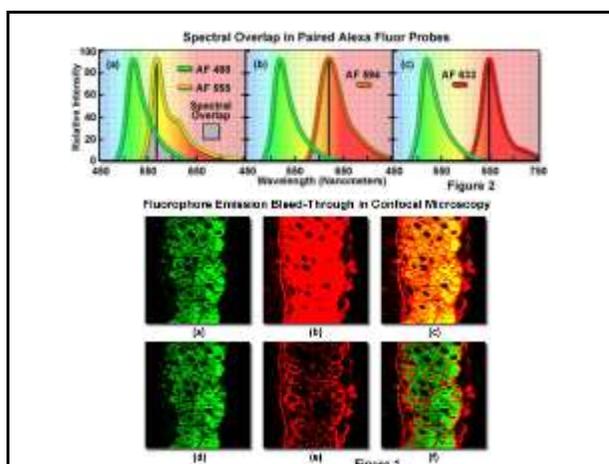
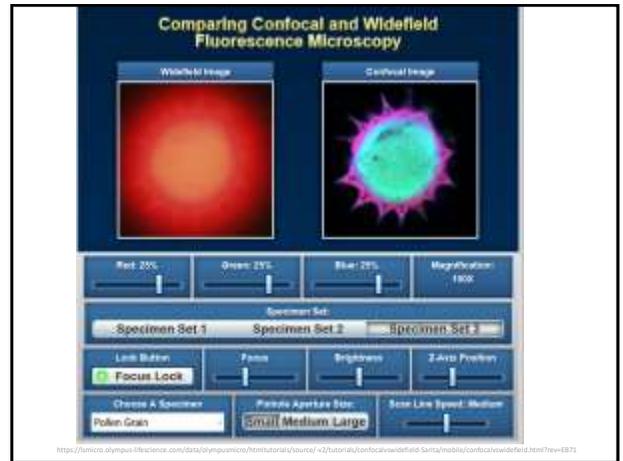
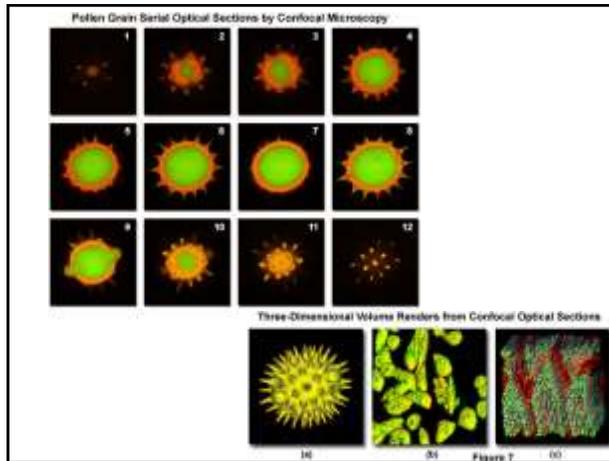
Mit  $\lambda=400$  nm,  $n=1,6$  und  $\omega \approx 90^\circ$  ist  $d \approx 150$  nm

### Spezielle Lichtmikroskopische Techniken

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

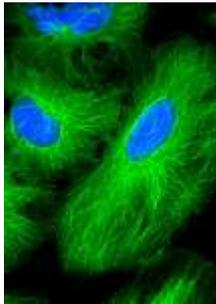






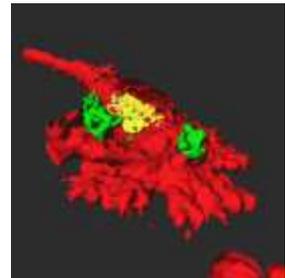
### Konfokales Mikroskop

Aus Tubulin bestehende  
Mikrotubuli in Zellen

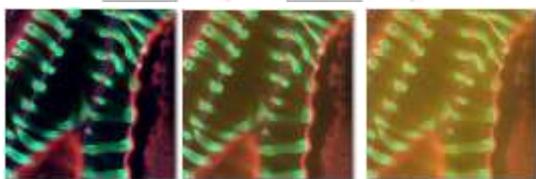


### Konfokales Mikroskop

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



Lochblendengröße (pinhole size)



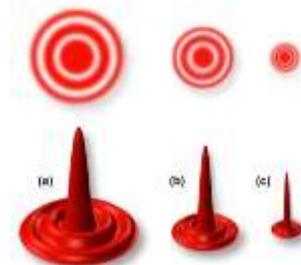
1 Airy-Einheit

4 Airy-Einheiten

20 Airy-Einheiten

$$\text{Airy-Einheit} \quad 1,AE = \frac{1,22 \cdot \lambda}{NA}$$

Die Numerische Appertur beeinflusst die Scheibengröße:

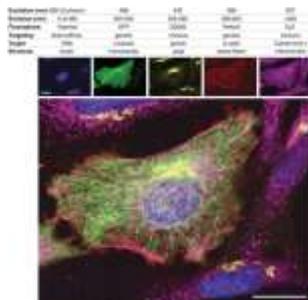


$$1,AE = \frac{1,22 \cdot \lambda}{NA}$$

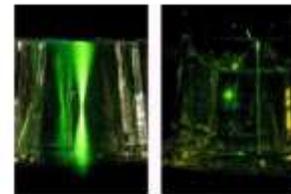
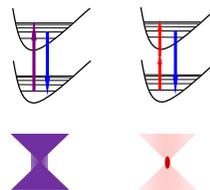
### Gleichzeitige Anwendung von mehreren fluoreszierenden Markierungen

He-La Zellen markiert mit fünf unterschiedlichen Fluoreszenzmethoden.

Der Masstab ist 20 µm.



### Fluoreszenzanregung mit zwei Photonen Zweiphotonenmikroskop

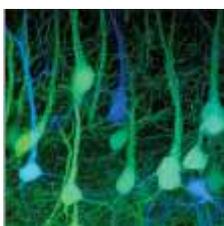


Fluoreszenzemission bei Einphoton- und Zweiphotonenanregung.

IR Laser

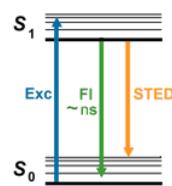
Auflösung!

### Zweiphotonenmikroskopie

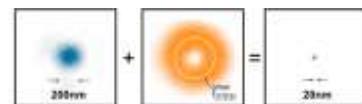


Visual Cortex von genetisch manipulierten Mause die GFP produzieren.

### STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop



Stefan Hell (Nobelpreis 2014)

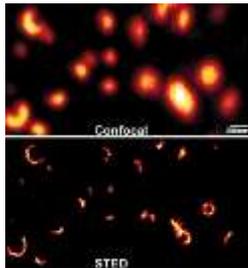


Anregung

Auslöschung

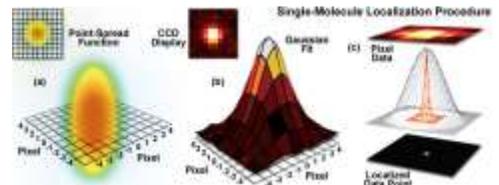
Lumineszenz nach dem Auslöschung

**STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop**

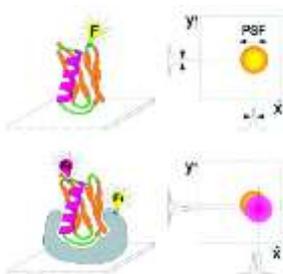


Reorganization des Synaptotaxis in synaptischen Vesikeln

**STED: Lokalization**



**STED: Lokalization und KoloKalization**



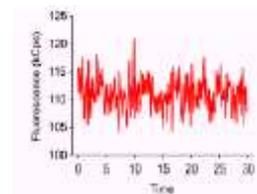
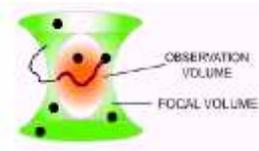
Die Position des Eiweisses kann mit nm Genauigkeit angenommen werden.

KoloKalization bedeutet nicht unbedingt eine Wechselwirkung!

**Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie (FCS)**

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

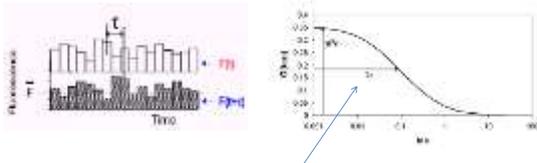
Fluktuationen des Fluoreszenzlichtes:



Ähnlich zur dynamischen Lichtstreuung, aber mit Fluoreszenz

### FCS: Autokorrelationsfunktion

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



$\tau_d$  – 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

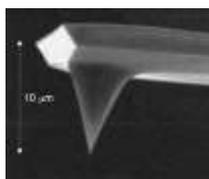
#### Konzentration

#### Reaktionsgeschwindigkeit

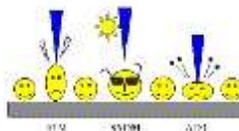
#### Diffusion in der Inneren der Zellen

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

## RASTERSONDENMIKROSKOPE



### Rastermikroskope (Scanning Probe Microscopes)



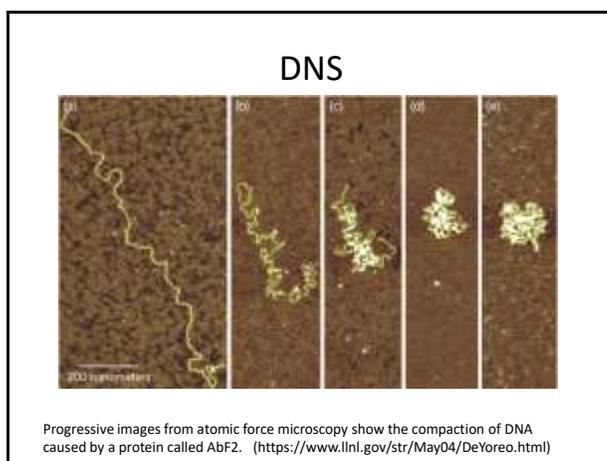
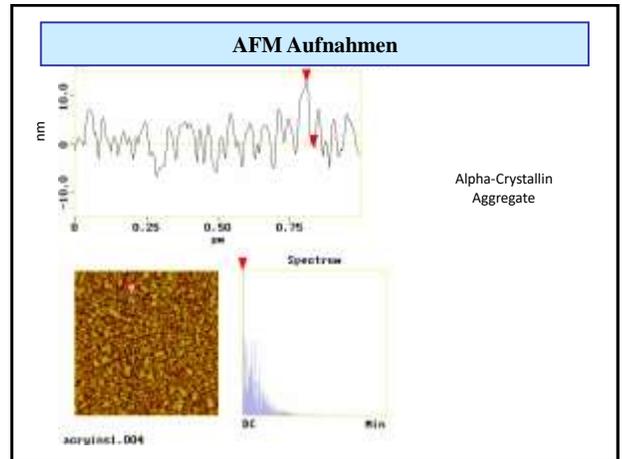
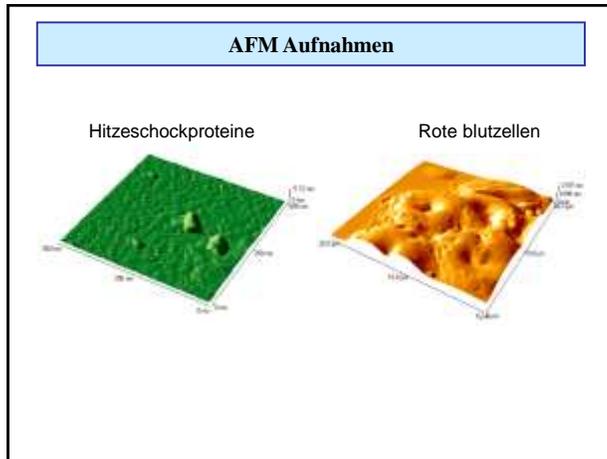
STM:  
Scanning Tunneling Microscope  
Rastertunnelmikroskop

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.





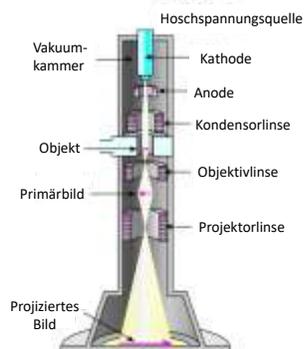
**ELEKTRONENMIKROSKOPE**

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

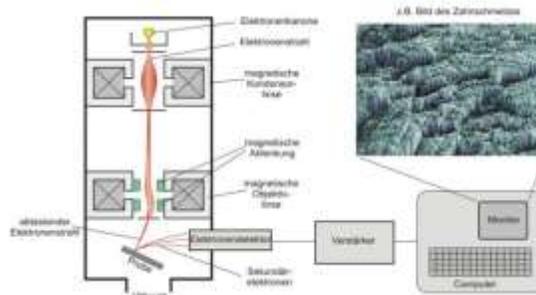
Transmissionselektronenmikroskop  
Rasterelektronenmikroskop

Materienwellen!

### Transmissionselektronenmikroskop



### Rasterelektronenmikroskop



### Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops Abbe'sches Prinzip und Materiewellen

Materiewelle: 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!  $NA \approx 0,002$

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

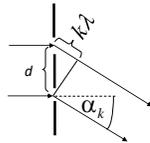
## DIFFRAKTIONSMETHODE

### Röntgendiffraktion

Anwendung der Röntgenstrahlung in Strukturanalyse der Materie.

Zur Erinnerung:  
Diffraction des Lichtes

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



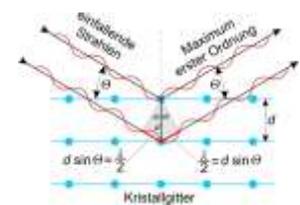
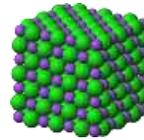
### Röntgendiffraktion

Was für ein Gitter passt zur Röntgenstrahlung?

$$\lambda < \sim d$$

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

**H**  $\approx 100$  pm



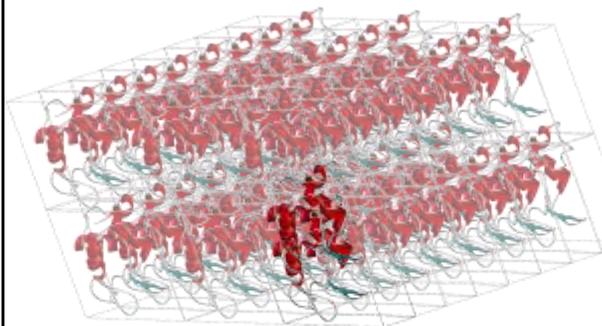
$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

Atomgitter  $\rightarrow$  Kristall  $\rightarrow$  auch DNS o. Proteinkristall!

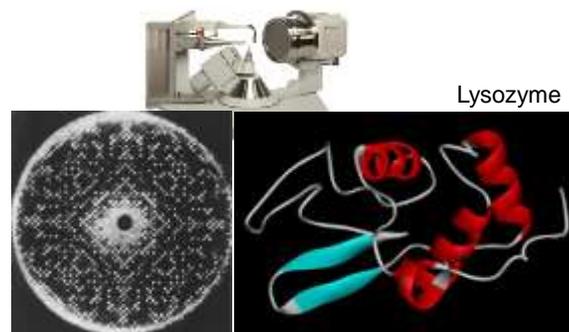
### Aufbau des Röntgendiffraktionsgerätes



### Eiweißkristalle



### Bestimmung der Raumstruktur der Eiweiße



Heute 24 April, 2017: 129367 Strukturen!

**PDB**  
PROTEIN DATA BANK

An Information Portal to Biological Macromolecular Structures

**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 PDB PDB curates and associates PDB data according to agreed upon standards.

The PDB 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 Molecular Navigation

Featured Molecular

### 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.

**Ende**