

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.

18. November 2020.

Strukturuntersuchungsmethoden in der medizinischen Forschung

1. Spektroskopische Verfahren

- Fluoreszenzspektroskopie
- Absorptionsspektroskopie (UV-VIS)
- Infrarotspektroskopie

2. Mikroskopie

- Lichtmikroskop
- Spezielle Lichtmikroskope (Stereo-, Polarisations-, Phasenkontrast-, Fluoreszenzmikroskop, CLSM)
- Superresolutionsmikroskope (SIM, STED)
- Rastersondenmikroskope (AFM)
- Elektronenmikroskope (TEM, SEM)

3. Diffraktionsmethoden

- Röntgendiffraktion
- Elektronendiffraktion
- Neutronendiffraktion

2

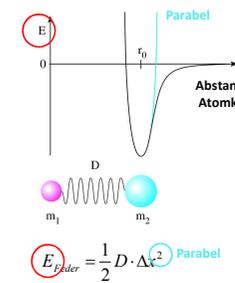
Spektroskopische Verfahren

3

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

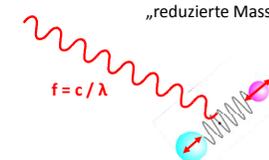
Infrarotspektroskopie

- Infrarotes Licht (IR): $\lambda = 800 \text{ nm} - 1000 \mu\text{m}$ → Nahe IR (NIR): 800 nm – 2,5 μm
Mittleres IR (MIR): 2,5-50 μm
- Ein Typ der Absorptionsspektroskopie → Ferne IR (FIR): 50 μm – 1000 μm
- IR-Lichtabsorption induziert **Molekülschwingungen**
- Besonders empfindlich für die **Molekülstruktur**



Frequenz der Schwingung: $f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{red}}}}$

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



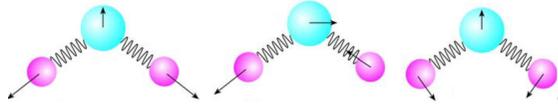
$D \sim 1000 \text{ N/m}$
 $f_0 \sim 5 \cdot 10^{13} \text{ Hz}$

4

Mehratomige Moleküle: Die Schwingungen des Wassers



- Alle Atome schwingen mit **derselben Frequenz** aber mit **unterschiedlichen Amplitude und Richtung**.
- Die Atome müssen **elektrisches Dipolmoment (p)** besitzen: $p = q \cdot d$

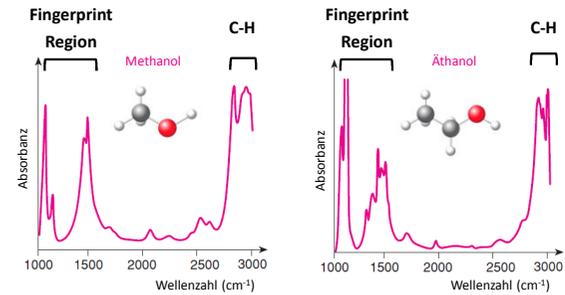


5

Anwendung: Identifizierung der Moleküle, Beweisung des Raumstrukturs

Statt Wellenlänge verwendet man die **Wellenzahl** (Reziprok 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/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/InfraRed.htm>

6

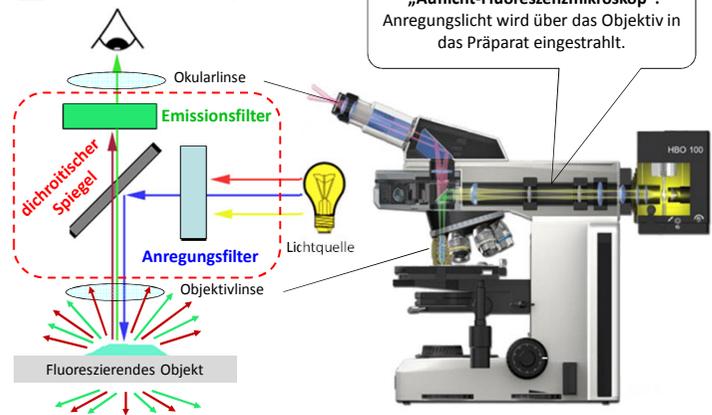
Spezielle Lichtmikroskope

7

Fluoreszenzmikroskop 1.

Lehrbuch: S. 388-389.

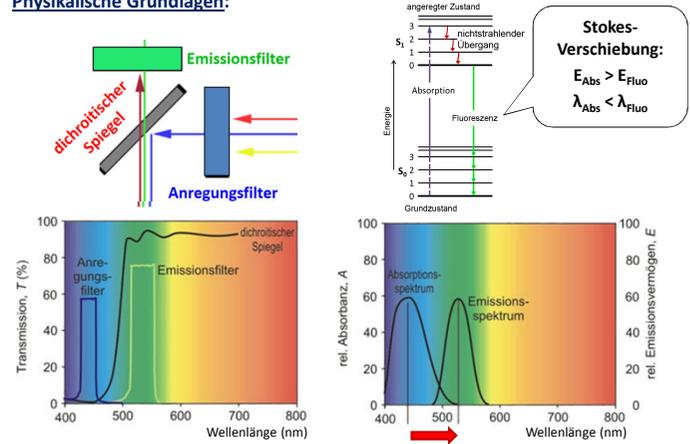
Epifluoreszenz-Anordnung:



8

Fluoreszenzmikroskop 2.

Physikalische Grundlagen:



9

Fluoreszenzmikroskop 3.

Angewandte fluoreszierende Farbstoffe:

Intrinsic Fluorophore: „Eigenfluoreszenz“

- Tryptophan, Tyrosin, Porphyrine

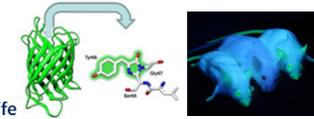
Extrinsic Fluorophore: fluoreszierende Stoffe

Der ideale Fluorophor:

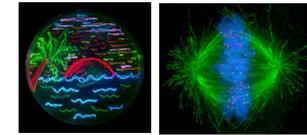
- klein
- hydrophil
- emittiert im sichtbaren Lichtbereich
- große Stokes-Verschiebung
- spezifische Bindung
- verursacht keine photochemische Reaktionen

fluoreszierende Proteine:

- GFP: Green Fluorescent Protein
- FMN-bindende: Flavinmononukleotid



Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

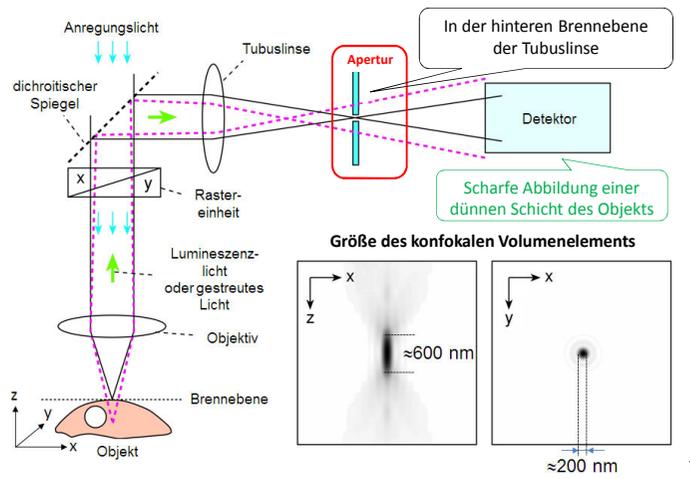


Bakterienkulturen, die verschiedene fluoreszierende Proteine exprimieren

Mikroskopische Aufnahme während der Metaphase einer Mitose (Mikrotubuli: grün, Chromosomen: blau, Kinetochoren: rosa).

10

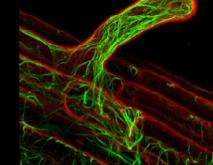
Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)



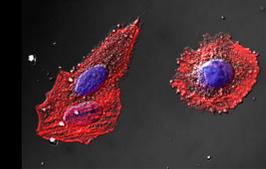
11

Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 1.

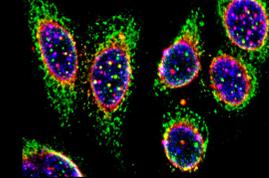
Aktinfaden (grün)



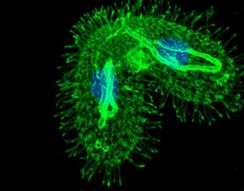
Aktinfaden (rot)



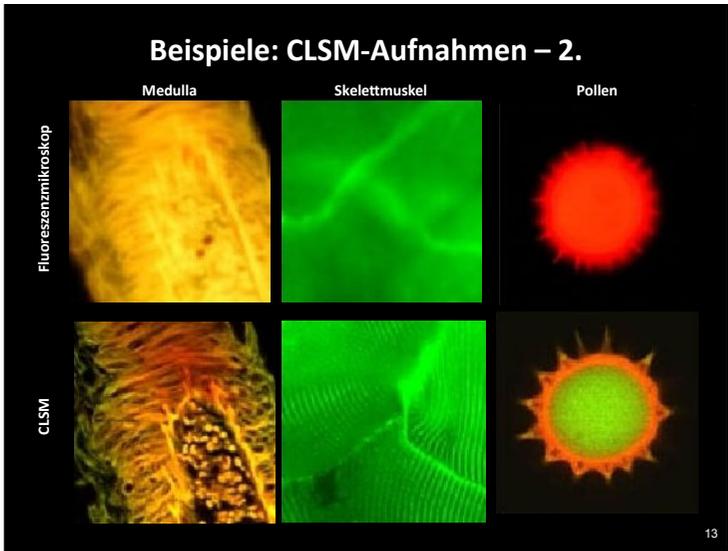
DNA (blau)



Mikrotubuli (grün)



12

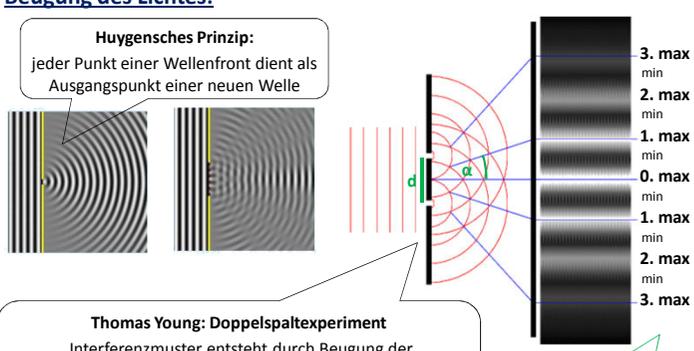


Zur Erinnerung!

Grundproblem – 1.

Beugung des Lichtes:

Huygensches Prinzip:
jeder Punkt einer Wellenfront dient als Ausgangspunkt einer neuen Welle



3. max
min

2. max
min

1. max
min

0. max
min

1. max
min

2. max
min

3. max

Thomas Young: Doppelspaltexperiment
Interferenzmuster entsteht durch Beugung der Wellenausbreitung am Doppelspalt. Bei monochromatischem Licht besteht dieses Muster auf dem Schirm aus hellen Streifen (Maxima) und dunklen Streifen (Minima).

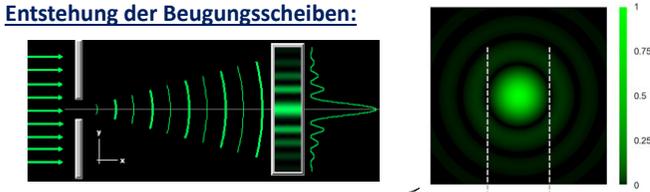
Maximale Verstärkung:
 $k \cdot \lambda = d \cdot \sin(\alpha)$

15

Zur Erinnerung!

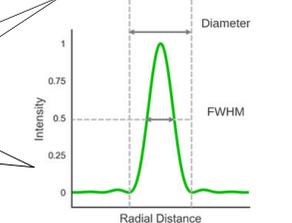
Grundproblem – 2.

Entstehung der Beugungsscheiben:



Airy-Scheibe:
zentrales Maximum, umgeben von Ringen abnehmender Intensität.

Das zentrale Maximum enthält 84% der Intensität, die Umgebung enthält 16% der Intensität.



16

Zur Erinnerung! **Grundproblem – 3.**

Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops: **Rayleigh-Grenzfall:** Hauptmaximum stimmt mit dem ersten Minimum der benachbarten Beugungsscheibe

auflösbar **nicht mehr auflösbar** **$0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin(\alpha))$**

Intensity vs. Radial Distance graphs for each case.

17

Zur Erinnerung! **Lichtmikroskop** **Lehrbuch: S. 384.**

Das Abbesche Prinzip: **Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:**

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

Numerische Apertur (NA)

Abbe-Limit bei ~200 nm

Punktverteilungsfunktion oder Punktbildverwackungsfunktion: Point Spread Function (PSF)

ant 1 mm, hair 100 μm, mammalian cell 10 μm, bacterium 1 μm, mitochondrion 100 nm, virus 10 nm, protein, small molecule 1 nm

18

Strukturierte Beleuchtung Mikroskopie (SIM)

Laser, Collimating Lens, Polarizer, **Liniengitter**, DM, Objective, Specimen, Detektor

Präparat (Struktur unbekannt) × Liniengitter (Struktur bekannt) = Moiré-Effekt (Interferenzbild)

Präparat $x < \delta$ **Interferenzstruktur auflösbar** $d > \delta$

0.5 μm, 120 nm, 250 nm

19

Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)

Stefan W. Hell, Nobel Preis 2014

Detektor, Tube Lens, Emission to Detector, Dichromatic Mirrors, Excitation Laser, Specimen, Objective

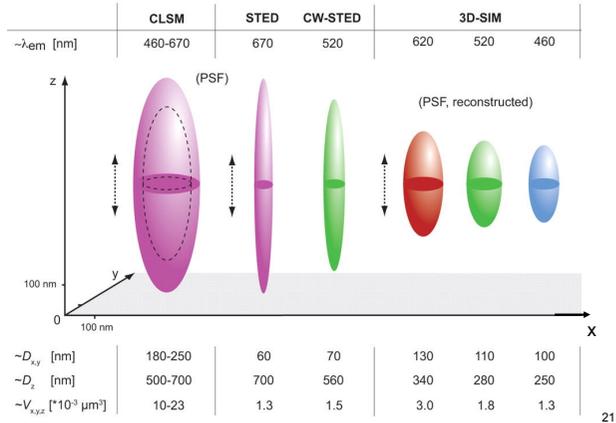
Anregung ≈ 200 nm, Ausschaltlicht ≈ 10 nm

Abbe-Grenze **Superresolution**

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

20

3D-Auflösung der Spezialmikroskope

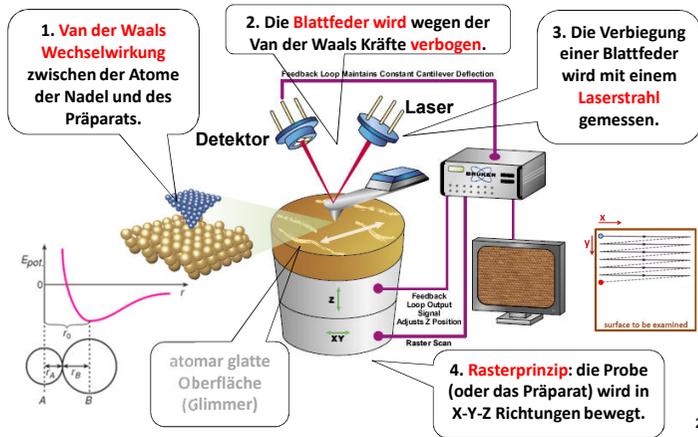


Rastersondenmikroskopie

22

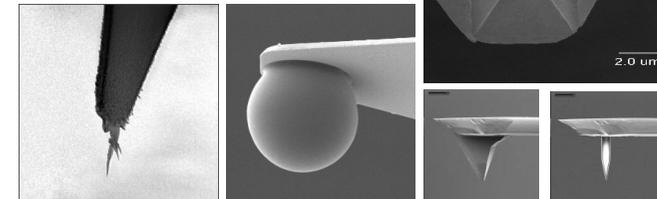
Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM)

Lehrbuch: S. 579.



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



24

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** (zB. 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.

25

AFM: Kontakt-Modus

geeignet zur Untersuchung von weichen biologischen Strukturen (zbs. Zellen)

Laserstrahl

Detektor (Photodiode)

$\Delta x \sim \text{Kraft}$

$F = D \cdot \Delta x$ (Hookesches Gesetz)

Δx : Abiegung der Blattfeder
D: Federkonstante

Kraftmessung /
Elastizitätsmessung an
biologischen Präparaten

2 µm

26

Zur Erinnerung!

Resonanz

Praktikum: 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.

Harmonische Schwingung (ungedämpft)

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m}}$$

Erzwungene Schwingung

27

AFM Modell: Nicht-Kontakt-Modus

N.B.: magnetische Wechselwirkung modelliert die Van der Waals Kräfte

28

Zur Erinnerung! **AFM: Nicht-Kontakt-Modus** Praktikum: Resonanz

Resonanzkurven durch äußere Kraft F_3 ursprüngliche Resonanzkurve

Amplitude, A Frequenz, f

Erregeramplitude, A_{Err} ursprüngliche Eigenfrequenz, f_0

$f_{Err} = f_0$

Amplitude (A) \neq Objekthöhe (O)

Objekthöhe kann nur mit Rückkopplung gemessen werden.

29

s. später: Sonographie

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 μ m

präzise Schrittgröße: 0,1 nm

30

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 μ m-Bereich.
 - Maximale abtastbare Oberfläche liegt im $100 \mu\text{m}^2$ -Bereich (10-10 μ m Rechteck).
 - Teuer (Instrument, Vorbereitung des Präparats, Cantilever).

31

Natives SARS-CoV-2 Virus

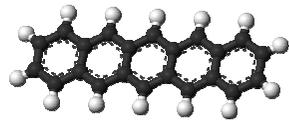
Topography, spike dynamics and nanomechanics of individual native SARS-CoV-2 virions

Bálint Kiss^{1†}, Zoltán Kis^{2,3†}, Bernadett Pályi², Miklós S.Z. Kellermeier^{1*}

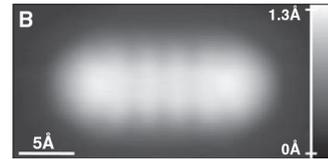
bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.17.302380>

32

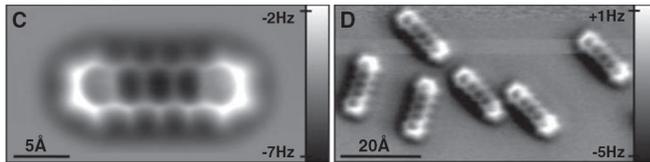
Pentacen Molekül



Tunnelstromstärke durch die Nadel



Topographie (AFM, die Spitze der Nadel ist mit CO-bedeckt)



Nature Chemistry 1, 597 - 598 (2009)

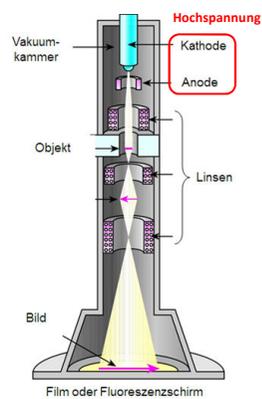
33

Elektronenmikroskope

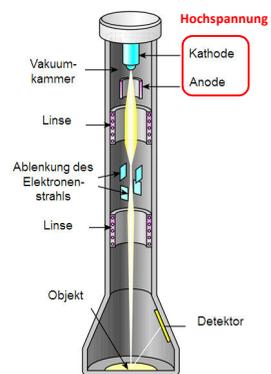
34

Elektronenmikroskope

Transmissions-
Elektronenmikroskop (TEM)



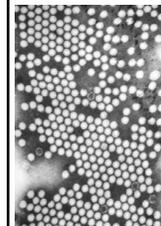
Raster-
Elektronenmikroskop (SEM)



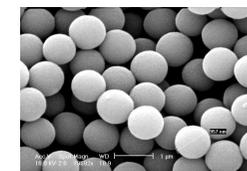
35

Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugeln (SEM)



Auflösungsgrenze (δ):

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

$$NA \approx 0,03$$

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

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

Materiewelle $\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$

Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den
Apatitkristallen (SEM)



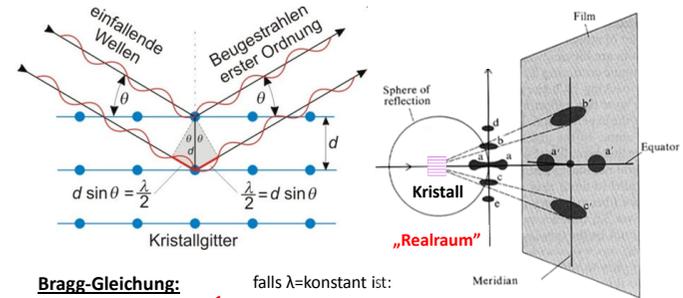
Dentin mit den Odontoblasten (SEM)



36

Diffractionsmethoden

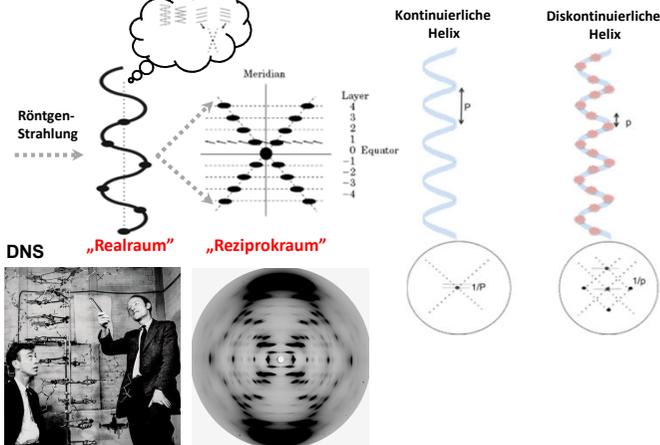
Röntgendiffraktion - Grundlagen



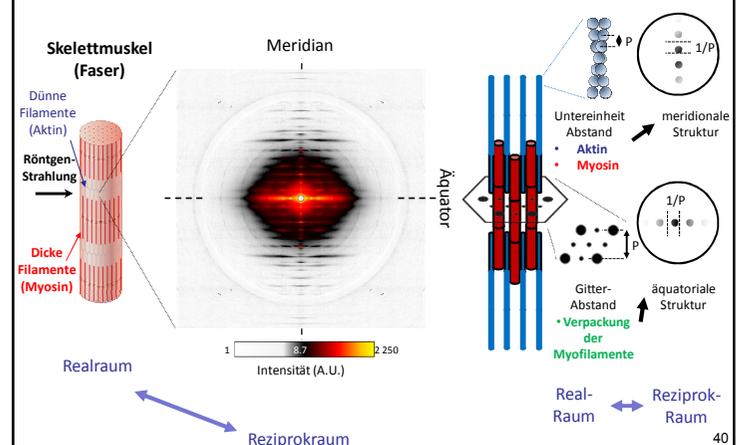
Bragg-Gleichung: falls $\lambda = \text{konstant}$ ist:
 $2d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$ $d \sim \frac{1}{\theta}$ strukturspezifische Information „Reziprokrum“

- d : Gitterabstand
 - θ : Einfallswinkel
 - λ : Wellenlänge
- { Röntgendiffraktion: 0,01-0,1 nm
 Elektronendiffraktion: 0,1 nm
 Neutronendiffraktion: 0,01 nm
- 1Å = 0,1 nm**

Röntgendiffraktion an Fasern



Röntgendiffraktion an Skelettmuskel

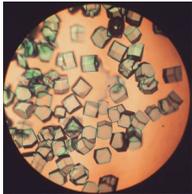


Röntgendiffraktion – weitere Beispiele

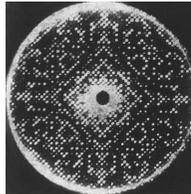
<https://www.rcsb.org/>



Lysozym
Kristalle



Diffractionsbild

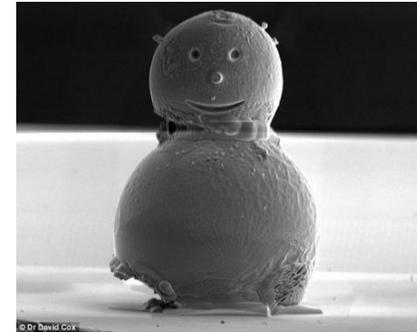


3D-Struktur



41

Hausaufgaben: Aufgabensammlung 10.1-3 und 9-10



10 μm

42