

## 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

- 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 (AFM)
- e) Elektronenmikroskope (TEM, SEM)

### 3. Diffraktionsmethoden

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

2

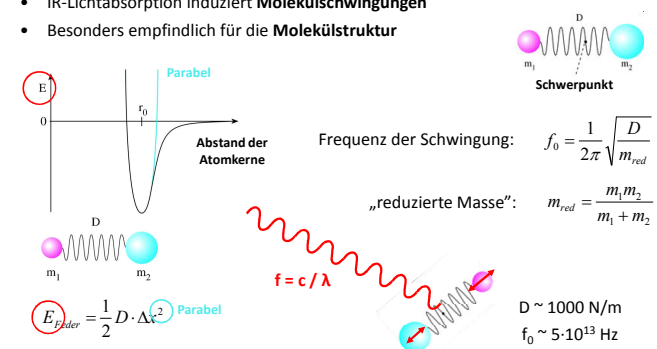
## Spektroskopische Verfahren

3

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

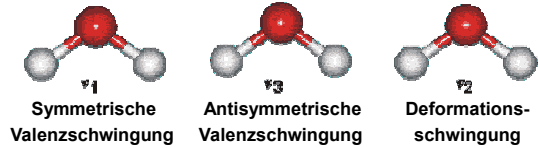
## Infrarotspektroskopie

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

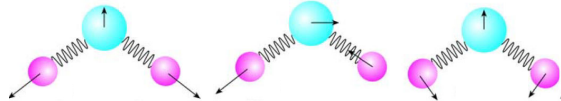


4

## 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:  $p = q \cdot d$

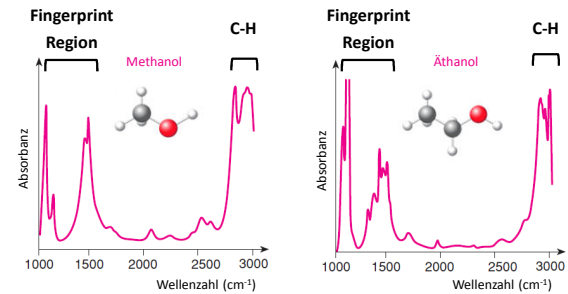


5

## 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

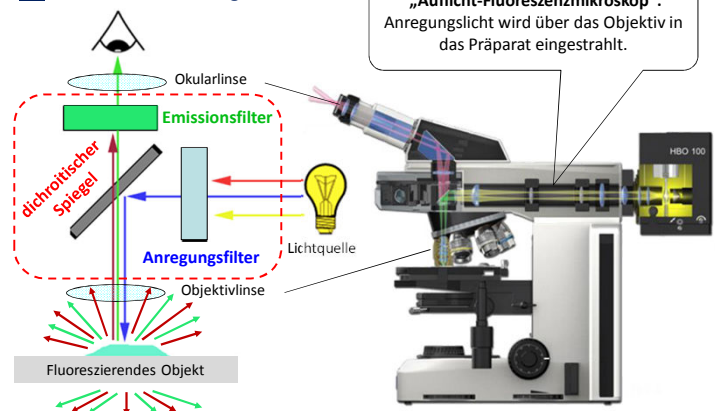
## Spezielle Lichtmikroskope

7

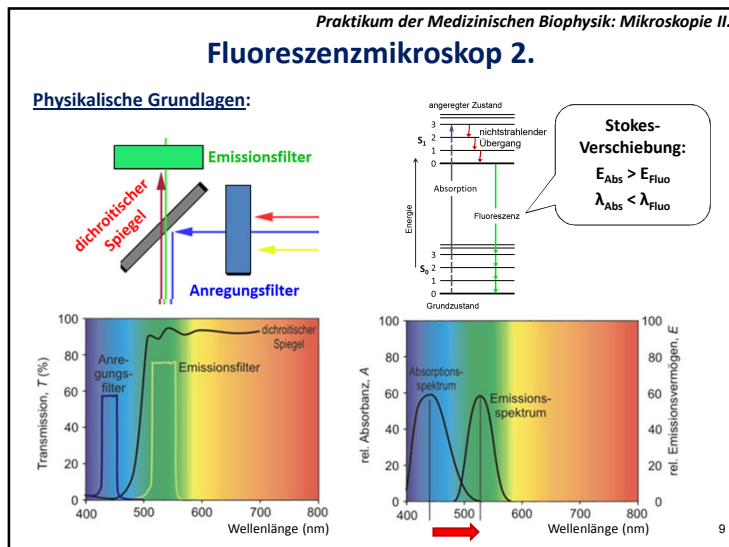
## Fluoreszenzmikroskop 1.

*Lehrbuch: S. 388-389.*

### Epifluoreszenz-Anordnung:



8



## Fluoreszenzmikroskop 3.

**Angewandte fluoreszierende Farbstoffe:**

**Intrinsic Fluorophore: „Eigenfluoreszenz“**

- Tryptophan, Tyrosin, Porphyrine

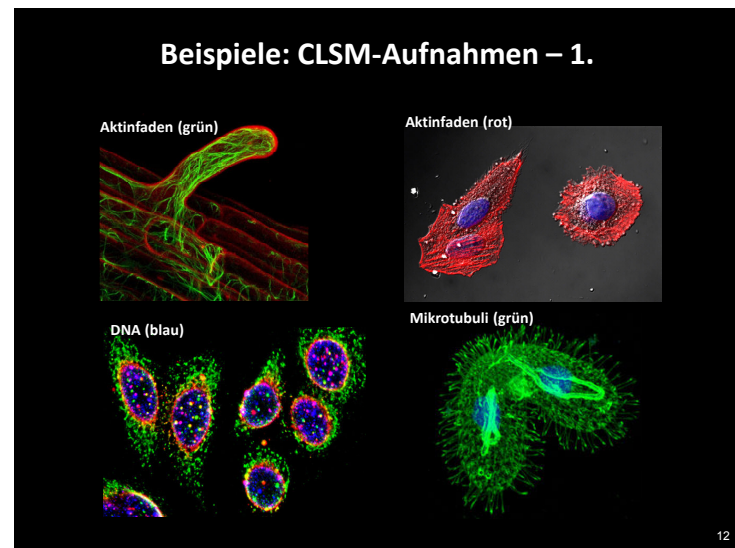
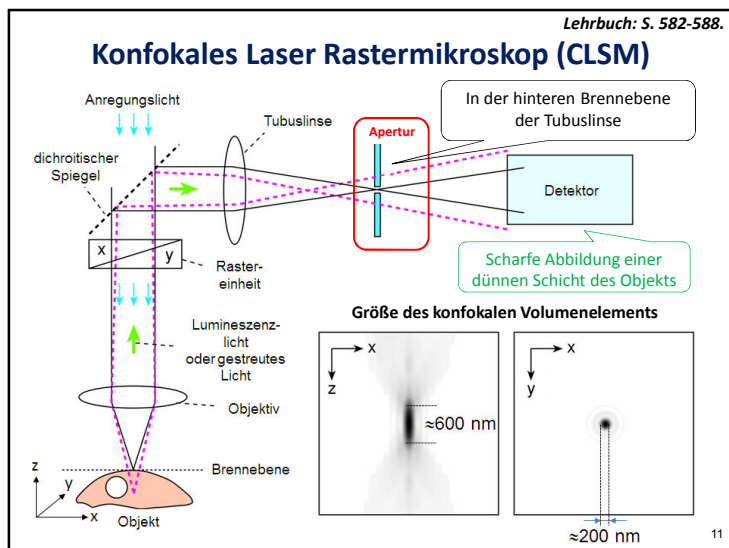
**Extrinsic Fluorophore: fluoreszierende Stoffe**

- **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).





**Zur Erinnerung!** **Grundproblem – 1.**

**Beugung des Lichtes:**

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

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

**Diagramm:** Ein Diagramm, das die Beugung von Licht an einem Doppelspalt zeigt. Es illustriert die Huygenssche Prinzip, das Thomas Youngs Doppelspaltexperiment und das resultierende Interferenzmuster mit Maxima und Minima. Die Formel für die maximale Verstärkung ist angegeben.

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.

**Diagramm:** Ein Diagramm, das die Entstehung der Beugungsscheiben zeigt. Es illustriert die Huygenssche Prinzip, das Thomas Youngs Doppelspaltexperiment und das resultierende Interferenzmuster mit Maxima und Minima. Die Formel für die maximale Verstärkung ist angegeben.

16

**Zur Erinnerung!** **Grundproblem – 3.**

**Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:**

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

**auflösbar** **nicht mehr auflösbar**

$0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin(\alpha))$

**Beugungsscheibe**

Intensity

Radial Distance

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 hair mammalian cell bacterium mitochondrion virus protein small molecule

1 mm 100µm 10µm 1µm 100 nm 10 nm 1 nm

18

**Strukturierte Beleuchtung Mikroskopie (SIM)**

Laser

Collimating Lens

Polarizer

**Liniengitter**

Detektor

DM

Objective

Specimen

**Präparat (Struktur unbekannt)** **Liniengitter (Struktur bekannt)** **Moiré-Effekt (Interferenzbild)**

**Präparat**  $x < \delta$   $d > \delta$  **Liniengitter**

**Interferenzstruktur auflösbar**

**SIM** **WF** **0,5 µm**

40 20 0

-0.2 0 0.2

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** **Depletion Laser** **Objective** **Specimen**

**Anregung** **Ausschaltlicht**

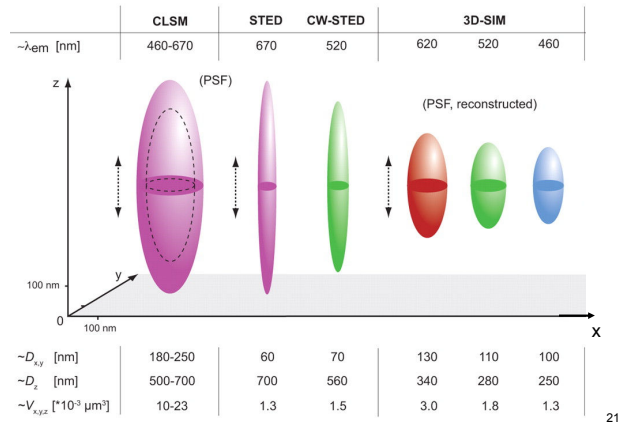
**Abbe-Grenze** **Superresolution**

$\approx 200 \text{ nm}$   $\approx 10 \text{ nm}$

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

20

### 3D-Auflösung der Spezialmikroskope

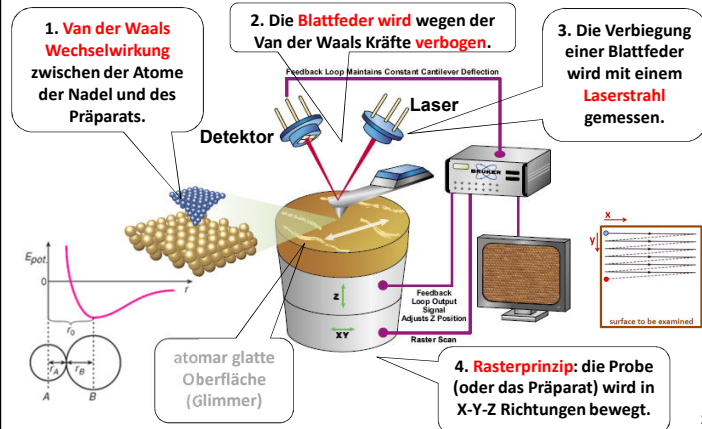


### Rastersondenmikroskopie

22

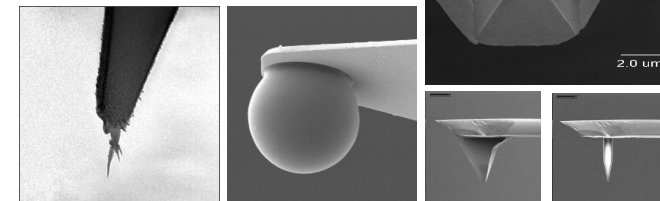
### Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM)

Lehrbuch: S. 579.



### Blattfeder / Cantilever

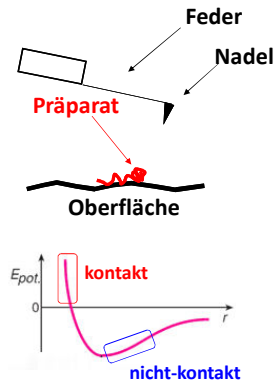
- Material: Siliciumnitrid ( $Si_3N_2$ )
- Krümmungsradius: 0,1 nm - 100  $\mu m$
- Federkonstante  $\sim$  0,1-10 N/m
- $f_0 \sim$  50-500 kHz



24



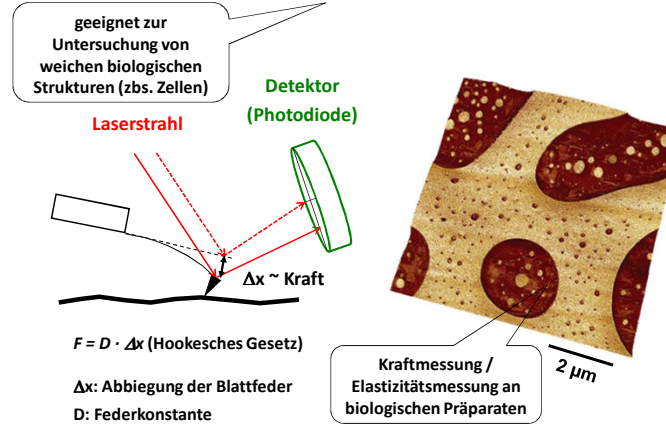
## AFM Betriebsarten



- **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** (z.B. 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.

25

## AFM: Kontakt-Modus



26

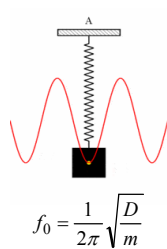
Zur Erinnerung!

## Resonanz

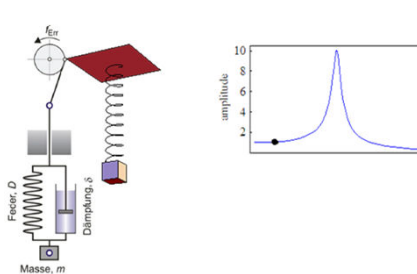
Praktikum: Resonanz

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)

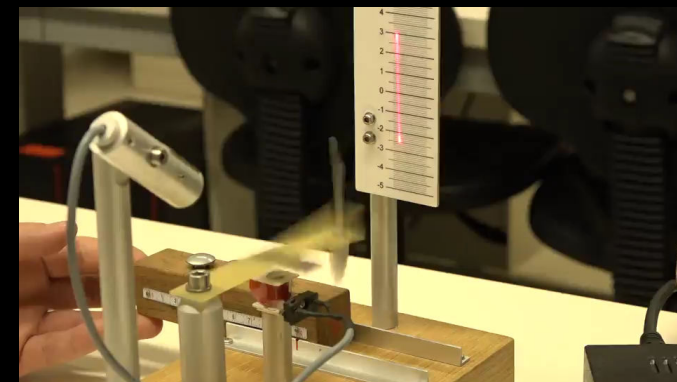


### Erzwungene Schwingung



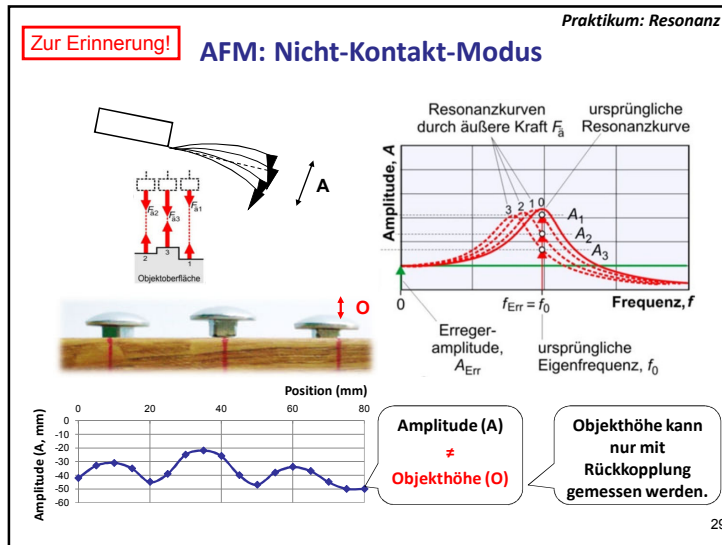
27

## AFM Modell: Nicht-Kontakt-Modus



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

28



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  $\mu$ m

präzise Schrittgröße: 0,1 nm

30

- ### 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  $\mu$ m-Bereich.
    - Maximale abtastbare Oberfläche liegt im  $100 \mu\text{m}^2$ -Bereich ( $10 \cdot 10 \mu\text{m}$  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

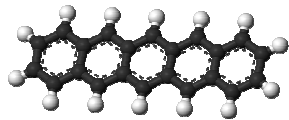
Bálint Kiss<sup>1,†</sup>, Zoltán Kis<sup>2,3,†</sup>, Bernadett Pályi<sup>2</sup>, Miklós S.Z. Kellermayer<sup>1,\*</sup>

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

32



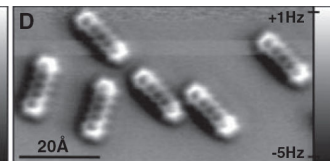
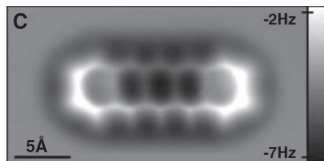
## Pentacen Molekül



Tunneltstromstärke durch die Nadel



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



Nature Chemistry 1, 597 - 598 (2009)

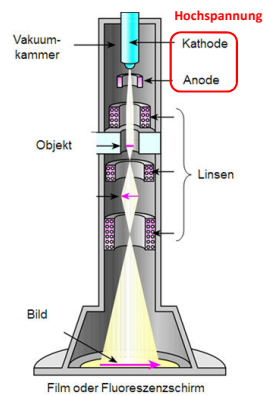
33

## Elektronenmikroskope

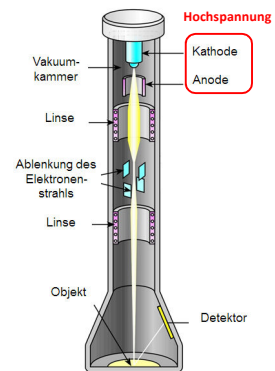
34

## Elektronenmikroskope

Transmissions-  
Elektronenmikroskop (TEM)



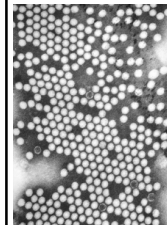
Raster-  
Elektronenmikroskop (SEM)



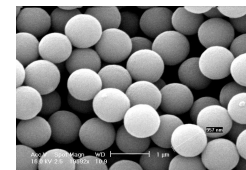
35

## Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugeln (SEM)



Auflösungsgrenze ( $\delta$ ):

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

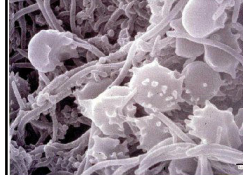
$$NA \approx 0,03$$

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

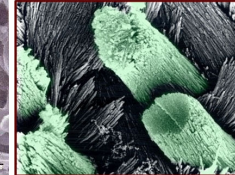
$$\delta \approx 0,2 \text{ nm}$$

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

Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den  
Apatitkristallen (SEM)



Dentin mit den Odontoblasten (SEM)

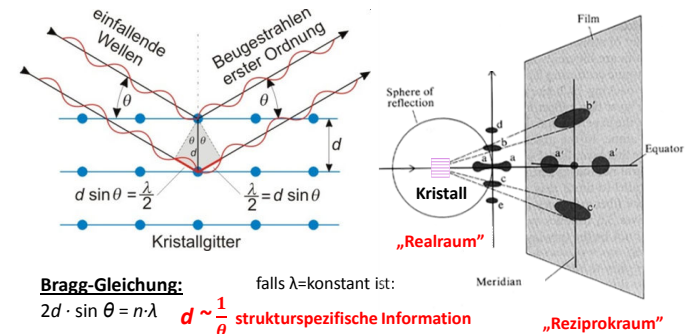


36

## Diffraktionsmethoden

37

## Röntgendiffraktion - Grundlagen



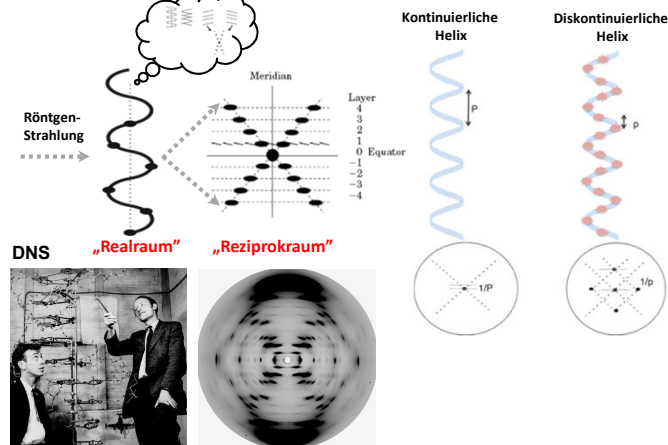
$d$ : Gitterabstand  
 $\theta$ : Einfallswinkel  
 $\lambda$ : Wellenlänge

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

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

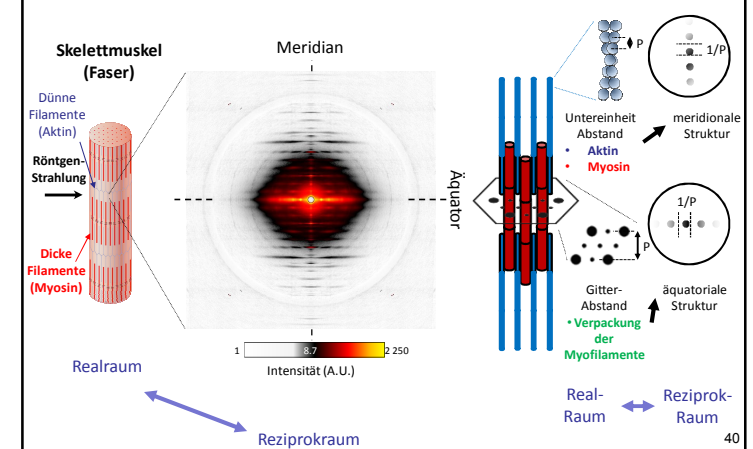
38

## Röntgendiffraktion an Fasern



39

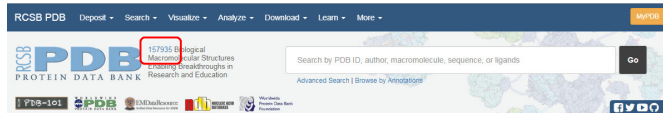
## Röntgendiffraktion an Skelettmuskel



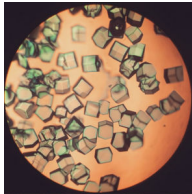
40

## Röntgendiffraktion – weitere Beispiele

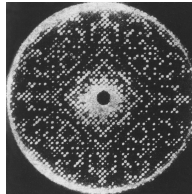
<https://www.rcsb.org/>



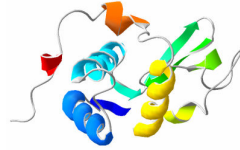
Lysozym  
Kristalle



Diffractionsbild

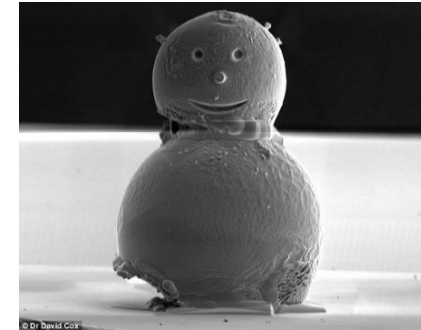


3D-Struktur



41

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



10  $\mu\text{m}$

42