

Strukturuntersuchungsmethoden in der Medizin: Spektroskopische und mikroskopische Methoden. Superresolutionmikroskopie.

Balázs Kiss

kissb3@gmail.com



**Myofilament-Mechanobiophysik Forschungsgruppe,
Semmelweis Universität,
Institut für Biophysik und Strahlenbiologie.**

17. November 2021.

Strukturuntersuchungsmethoden in der medizinischen Forschung

1. Spektroskopische Verfahren

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

2. Mikroskopie

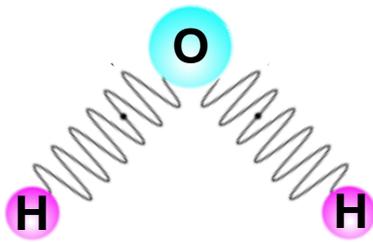
- a) Lichtmikroskop
- b) Spezielle Lichtmikroskope (Stereo-, Polarisations-, Phasenkontrast-, Fluoreszenzmikroskop, CLSM)
- c) Superresolutionsmikroskope (SIM, STED)
- d) Elektronenmikroskope (TEM, SEM)
- e) Rastersondenmikroskope (AFM)

3. Diffraktionsmethoden

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

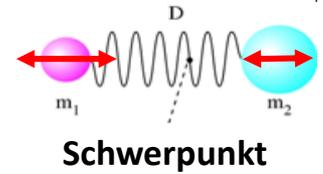
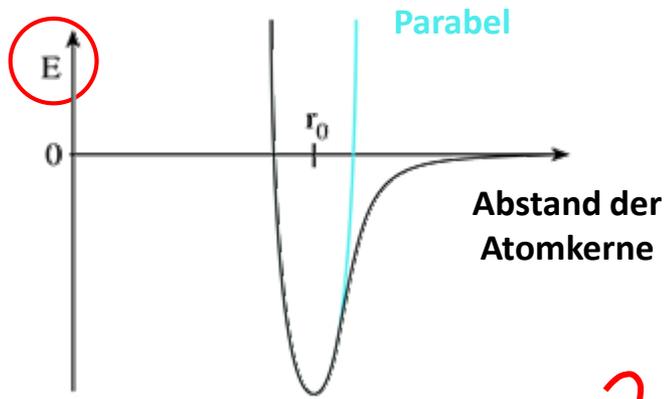
Spektroskopische Verfahren

Infrarotspektroskopie



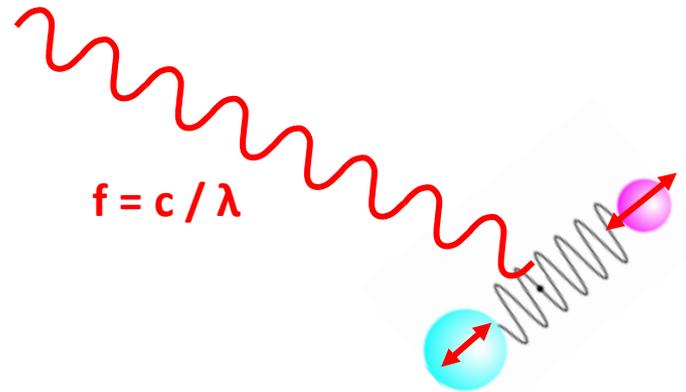
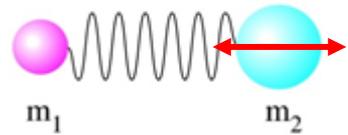
- Infrarotes Licht (IR): $\lambda = 800 \text{ nm} - 1000 \text{ }\mu\text{m}$ \longrightarrow **Mittleres IR (MIR): 2,5-50 μm**
- Ein Typ der Absorptionsspektroskopie
- IR-Lichtabsorption induziert **Molekülschwingungen** \longrightarrow **Molekülstruktur**

Nahe IR (NIR): 800 nm – 2,5 μm
 Mittleres IR (MIR): 2,5-50 μm
 Ferne IR (FIR): 50 μm – 1000 μm



Eigenfrequenz
 der Schwingung:

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

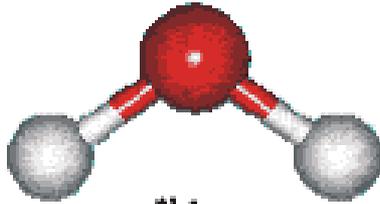


$$m_{red} = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

$$E_{Feder} = \frac{1}{2} D \cdot \Delta x^2 \text{ Parabel}$$

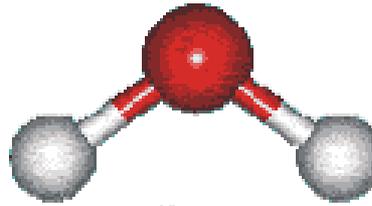
$D \sim 1000 \text{ N/m}$
 $f_0 \sim 5 \cdot 10^{13} \text{ Hz}$

Mehratomige Moleküle: Die Schwingungen des Wassers



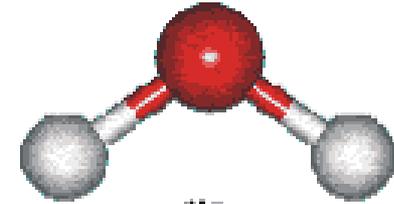
ν_1

**Symmetrische
Valenzschwingung**



ν_3

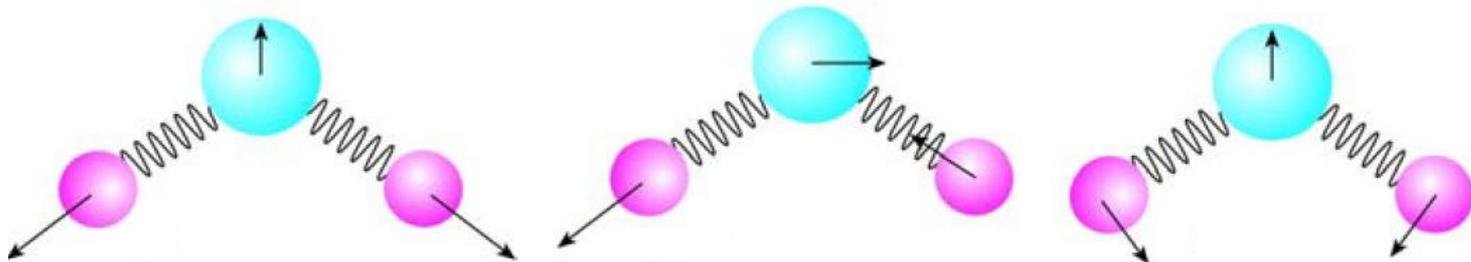
**Antisymmetrische
Valenzschwingung**



ν_2

**Deformations-
schwingung**

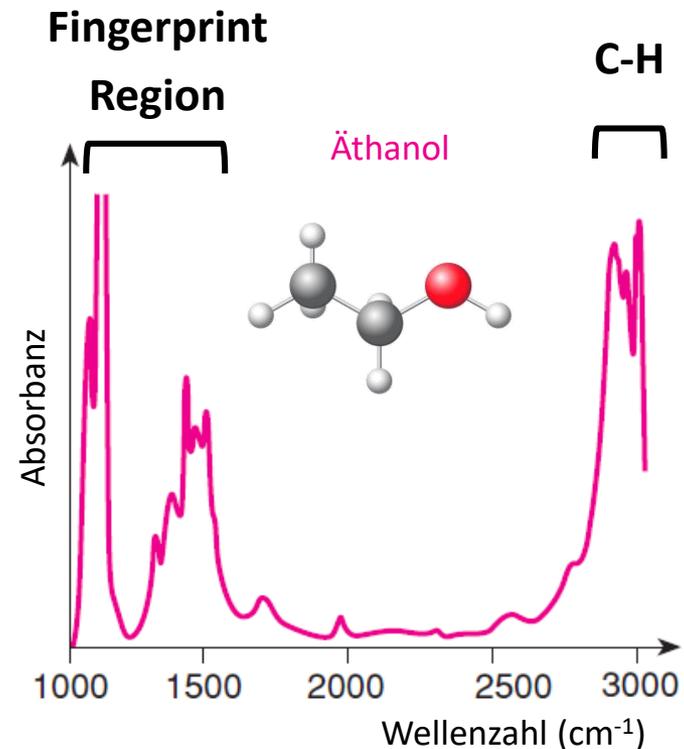
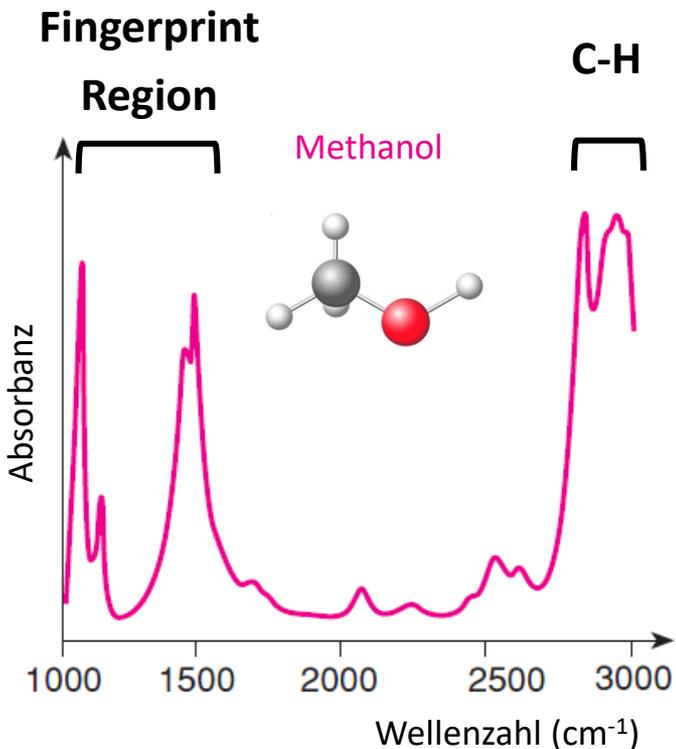
- Alle Atome schwingen mit **derselben Frequenz** aber mit **unterschiedlichen Amplitude und Richtung**.
- Die Atome müssen **elektrisches Dipolmoment (\mathbf{p})** besitzen: $\mathbf{p} = q \cdot \mathbf{d}$



Anwendung: Identifizierung der Moleküle, Beweis des Raumstrukturs

Statt Wellenlänge verwendet man die **Wellenzahl** (Reziprok der Wellenlänge):

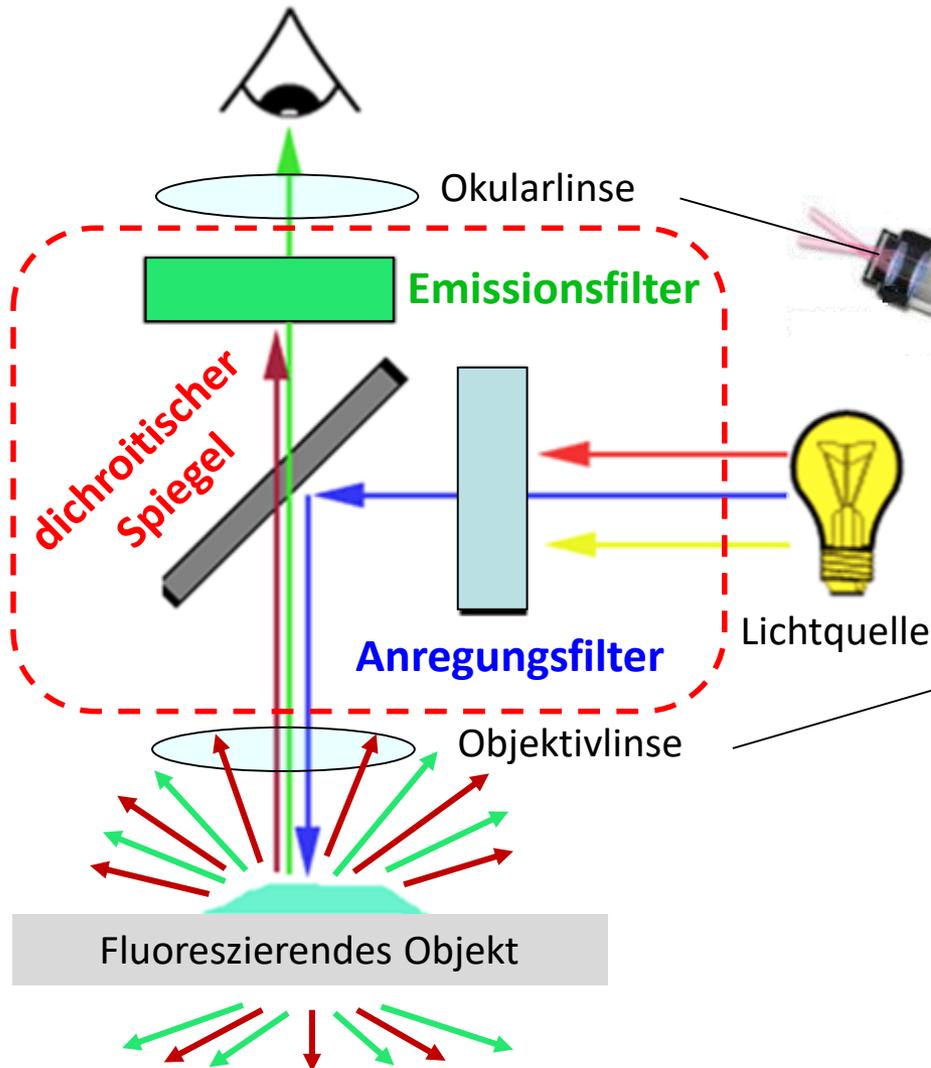
$$\nu = \frac{1}{\lambda} \quad \nu: [\text{m}^{-1}, \text{cm}^{-1}] \quad \text{direkt proportional zur Photonenenergie}$$



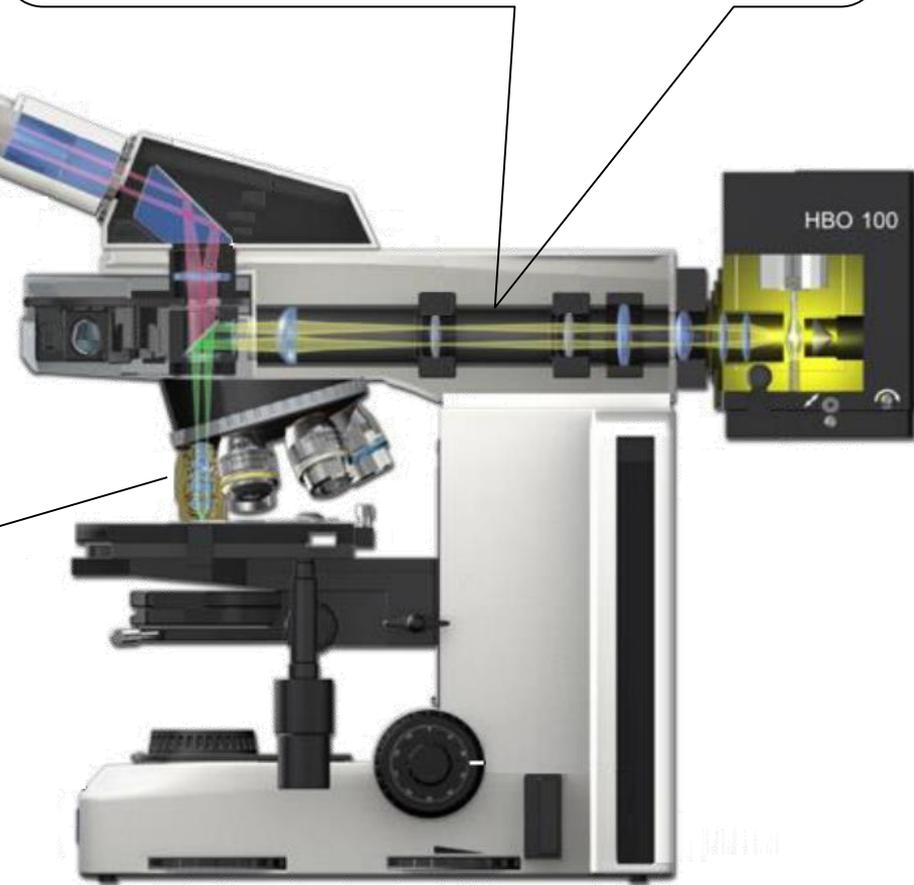
Spezielle Lichtmikroskope

Fluoreszenzmikroskop 1.

Epifluoreszenz-Anordnung:

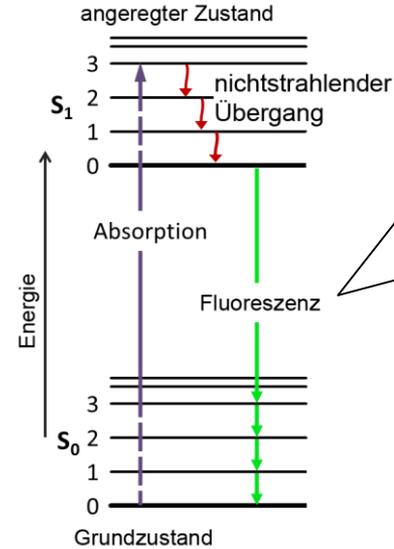
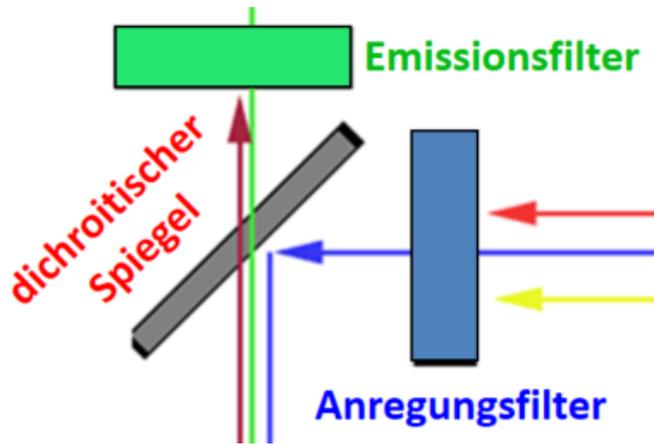


„Auflicht-Fluoreszenzmikroskop“:
Anregungslicht wird über das Objektiv in
das Präparat eingestrahlt.



Fluoreszenzmikroskop 2.

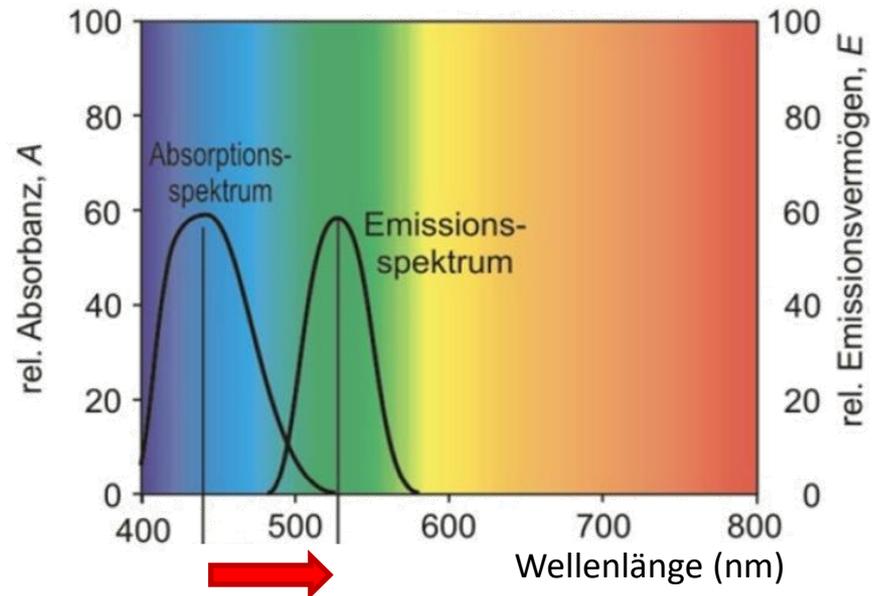
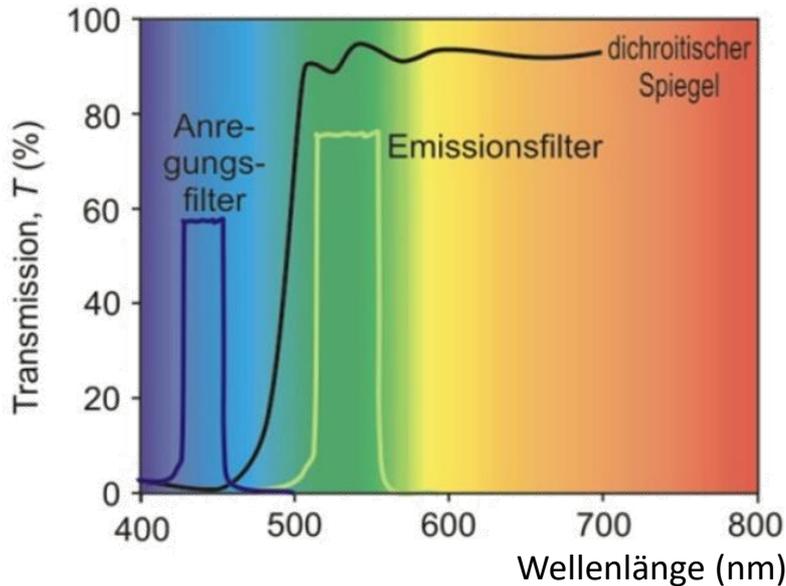
Physikalische Grundlagen:



Stokes-Verschiebung:

$$E_{\text{Abs}} > E_{\text{Fluo}}$$

$$\lambda_{\text{Abs}} < \lambda_{\text{Fluo}}$$



Fluoreszenzmikroskop 3.

Angewandte fluoreszierende Farbstoffe:

Intrinsic Fluorophore: „Eigenfluoreszenz“

- Tryptophan, Tyrosin, Porphyrine

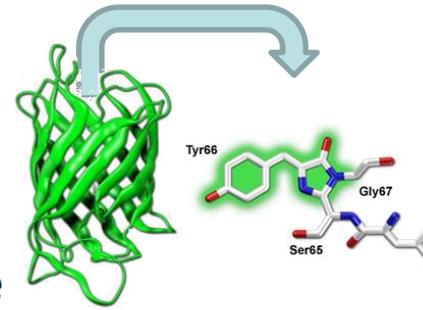
Extrinsic Fluorophore: fluoreszierende Stoffe

- **Der ideale Fluorophor:**

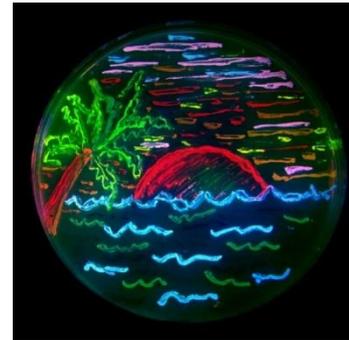
- klein
- hydrophil
- emittiert im sichtbaren Lichtbereich
- große Stokes-Verschiebung
- spezifische Bindung
- verursacht keine photochemische Reaktionen

- **fluoreszierende Proteine:**

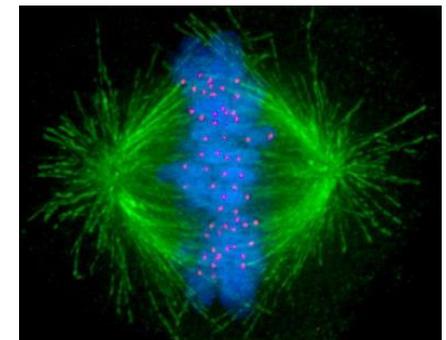
- GFP: Green Fluorescent Protein
- FMN-bindende: Flavinmononukleotid



Grün fluoreszierendes Protein (GFP)



Bakterienkulturen, die verschiedene fluoreszierende Proteine exprimieren

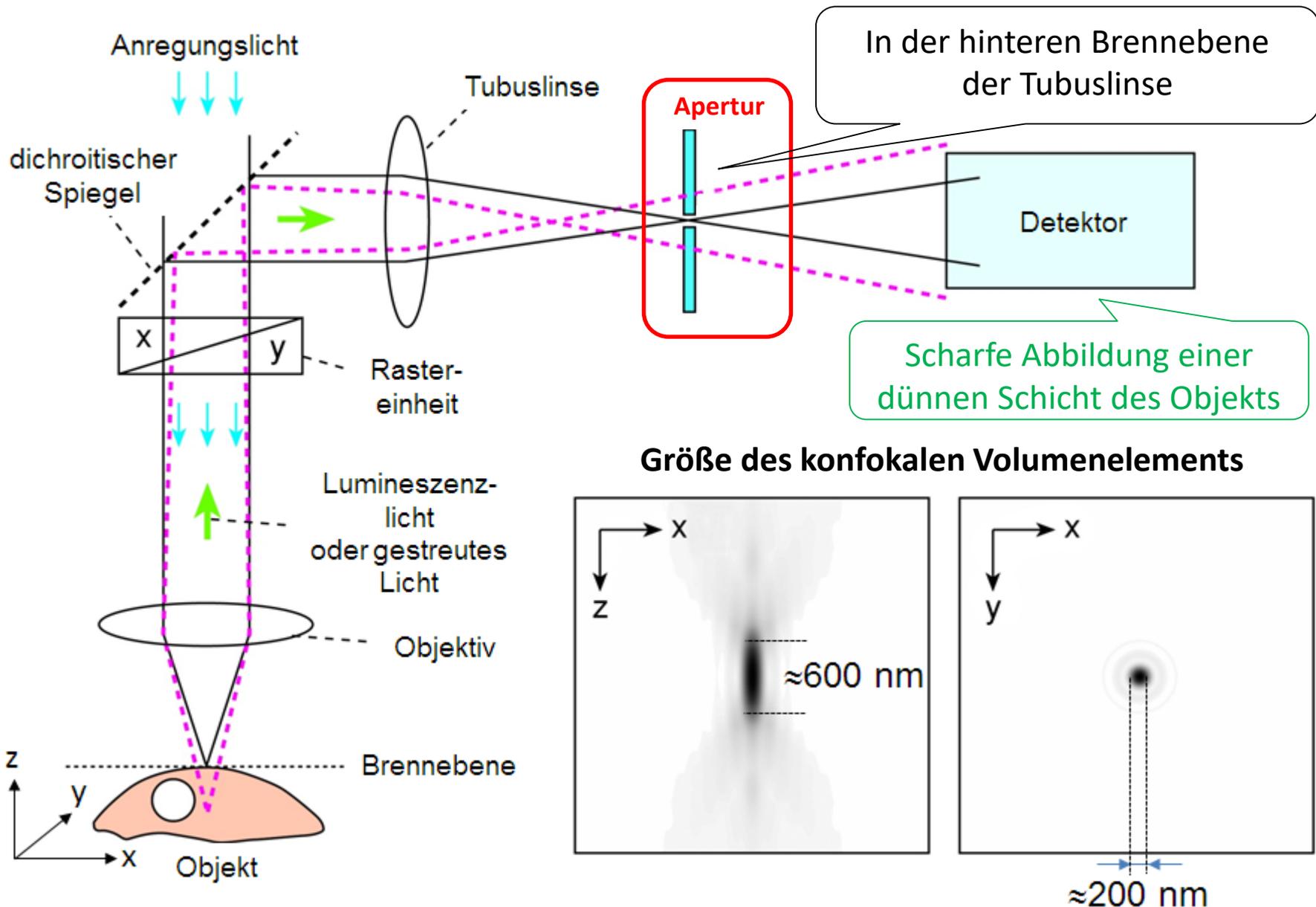


Mikroskopische Aufnahme während der Metaphase einer Mitose (Mikrotubuli: grün, Chromosomen: blau, Kinetochoren: rosa).

Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM): Funktionsprinzip

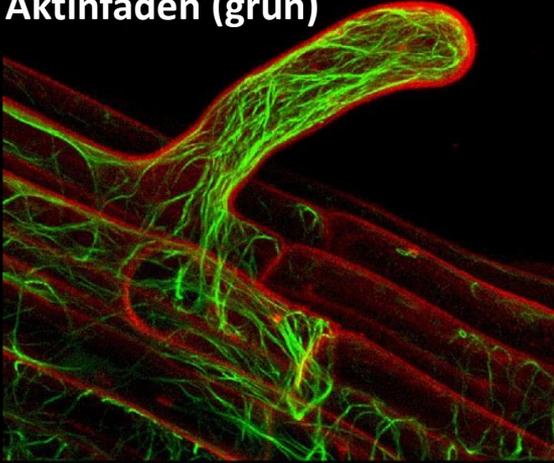
Fluorescence and confocal microscopes

Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)

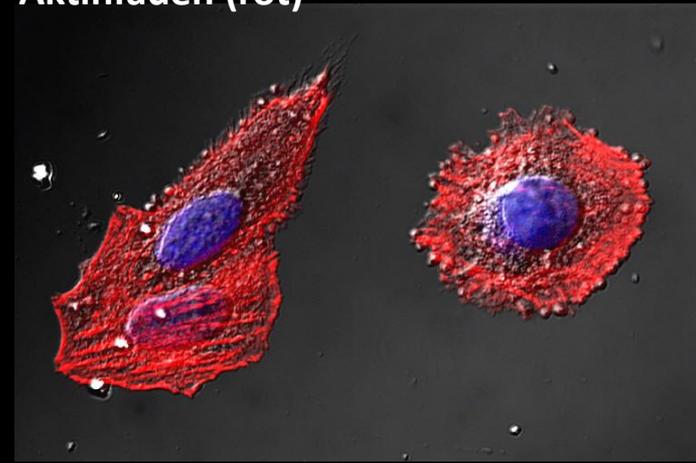


Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 1.

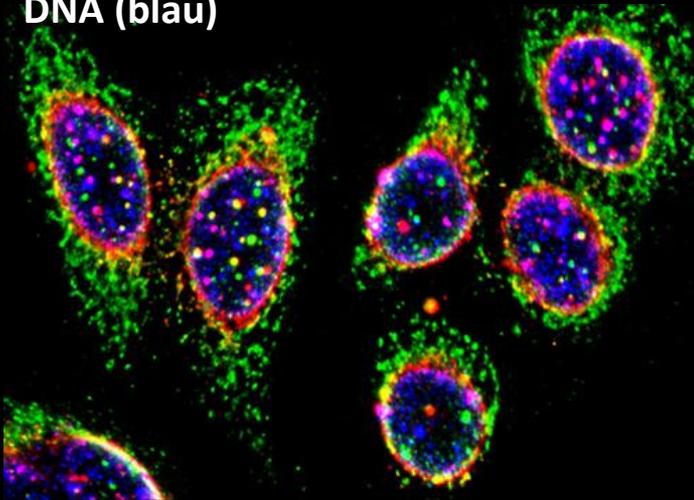
Aktinfaden (grün)



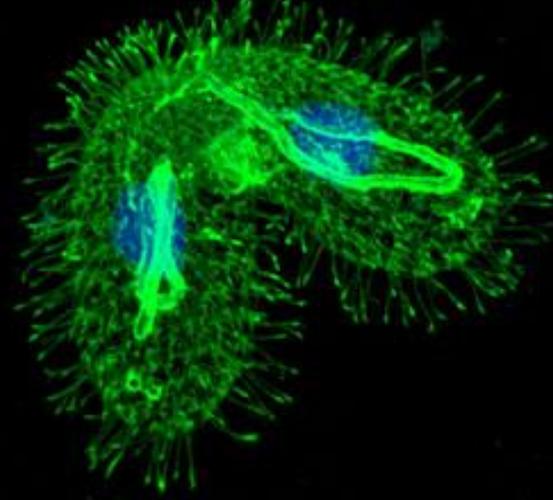
Aktinfaden (rot)



DNA (blau)



Mikrotubuli (grün)



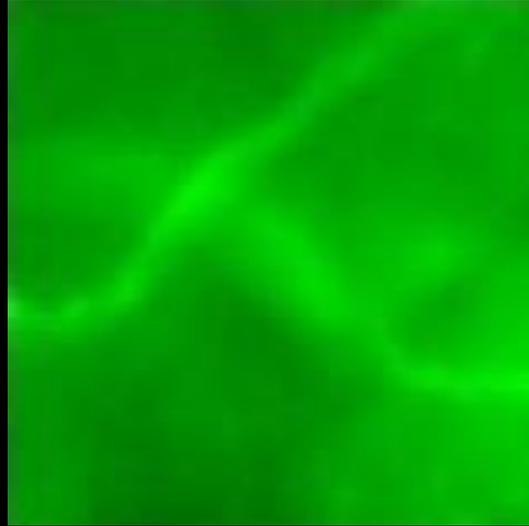
Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 2.

Fluoreszenzmikroskop

Medulla



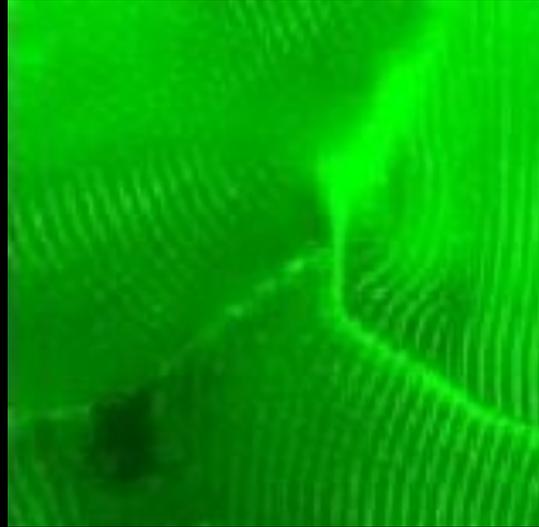
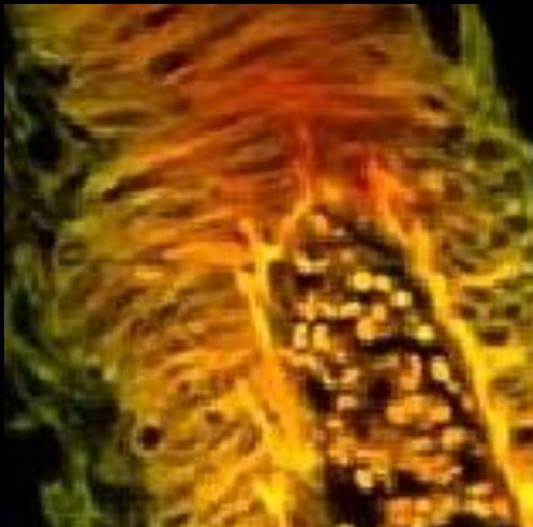
Skelettmuskel



Pollen



CLSM



Superresolutionsmikroskope

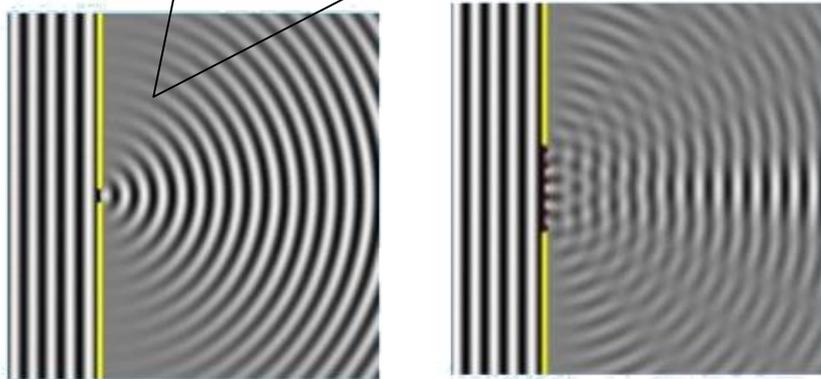
Zur Erinnerung!

Grundproblem – 1.

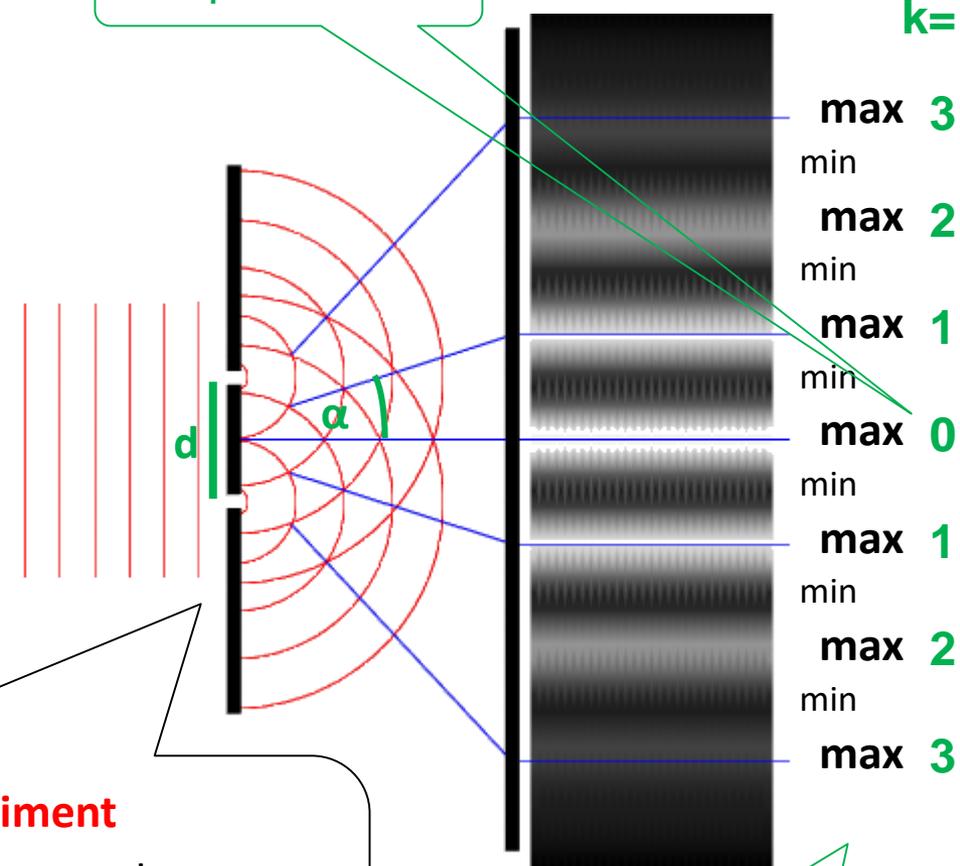
Beugung des Lichtes:

Huygensches Prinzip:

jeder Punkt einer Wellenfront dient als Ausgangspunkt einer neuen Welle



Hauptmaximum



Thomas Young: Doppelspaltexperiment

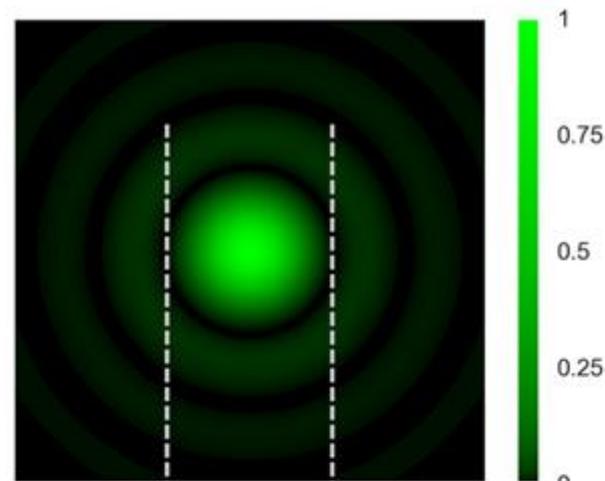
Interferenzmuster entsteht durch Beugung der Wellenausbreitung am Doppelspalt. Bei monochromatischem Licht besteht dieses Muster auf dem Schirm aus **hellen Streifen (Maxima)** und **dunklen Streifen (Minima)**.

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

Zur Erinnerung!

Grundproblem – 2.

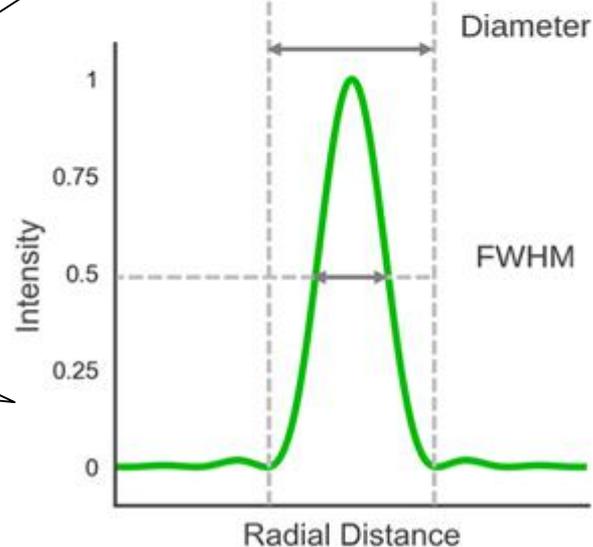
Entstehung der Beugungsscheiben:



Airy-Scheibe:

zentrales Maximum, umgeben von Ringen abnehmender Intensität.

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



Zur Erinnerung!

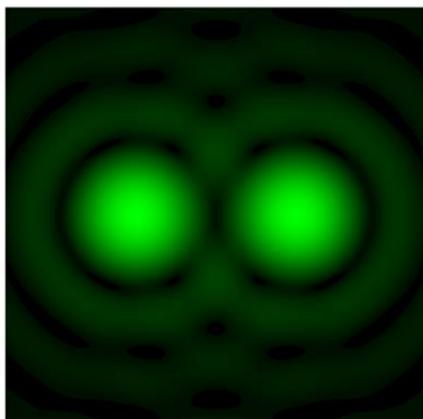
Grundproblem – 3.

Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

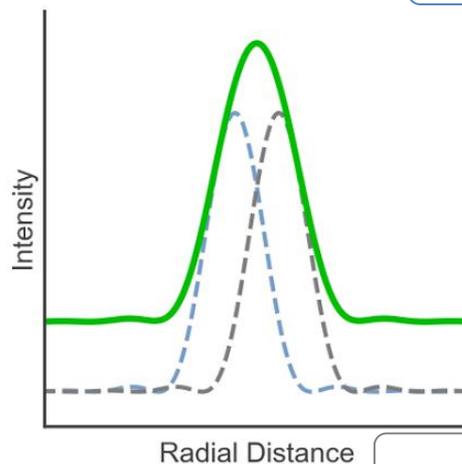
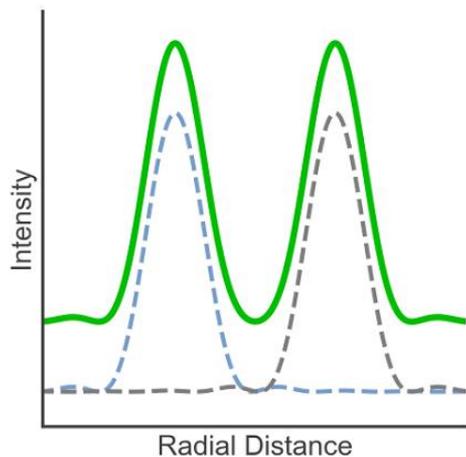
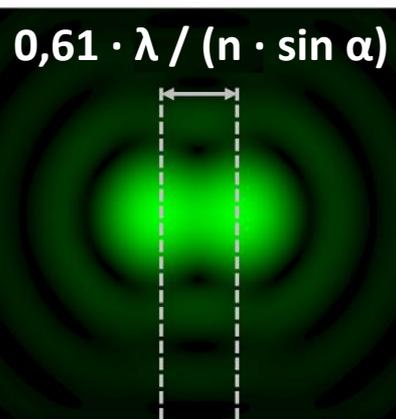
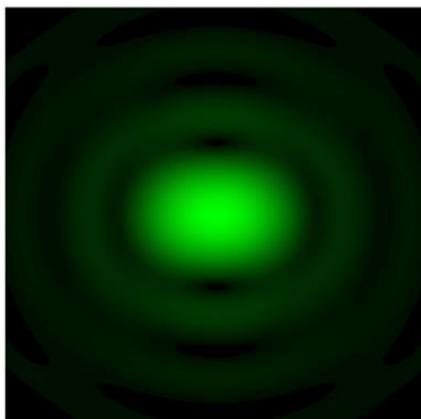
Rayleigh-Grenzfall:

Hauptmaximum stimmt mit dem ersten Minimum der benachbarten Beugungsscheibe

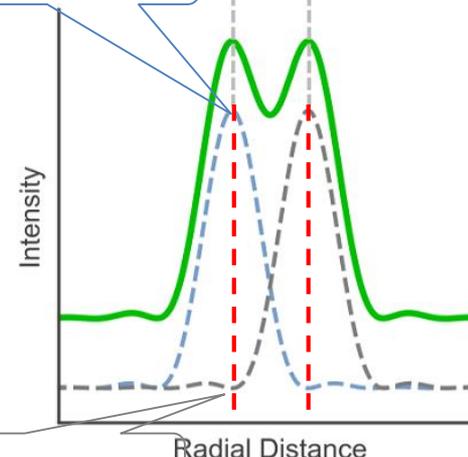
auflösbar



nicht mehr auflösbar



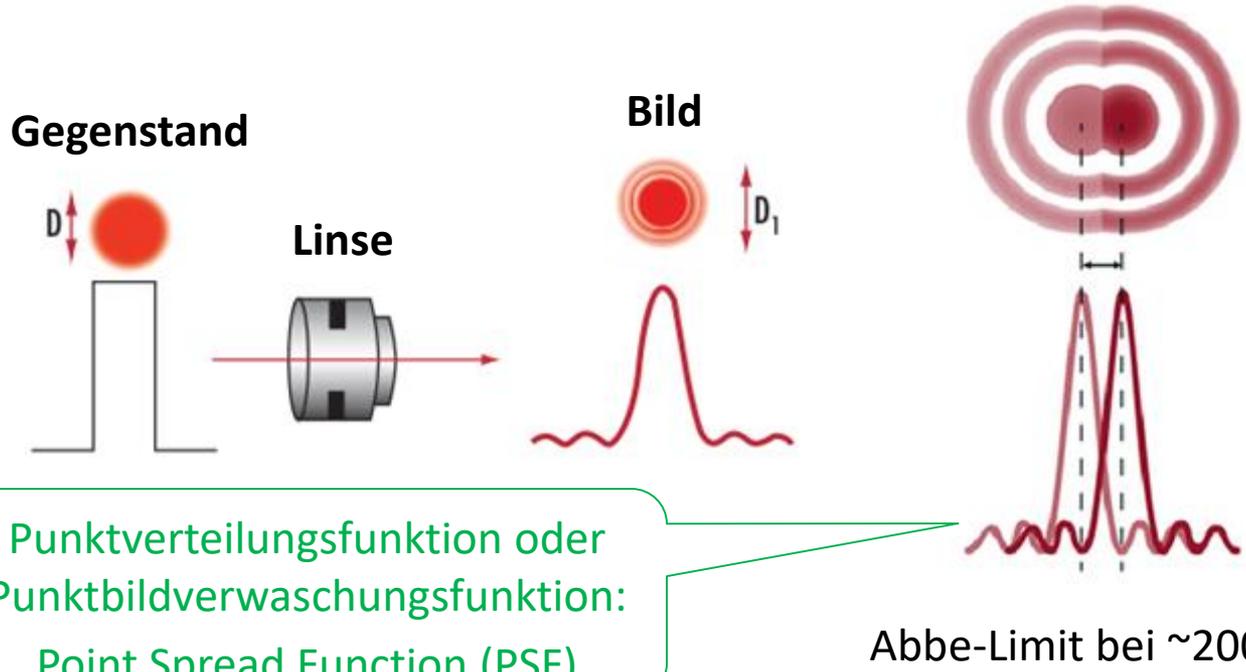
Hauptmaximum



erstes Minimum

Zur Erinnerung!

Lichtmikroskop



Das Abbesche Prinzip:

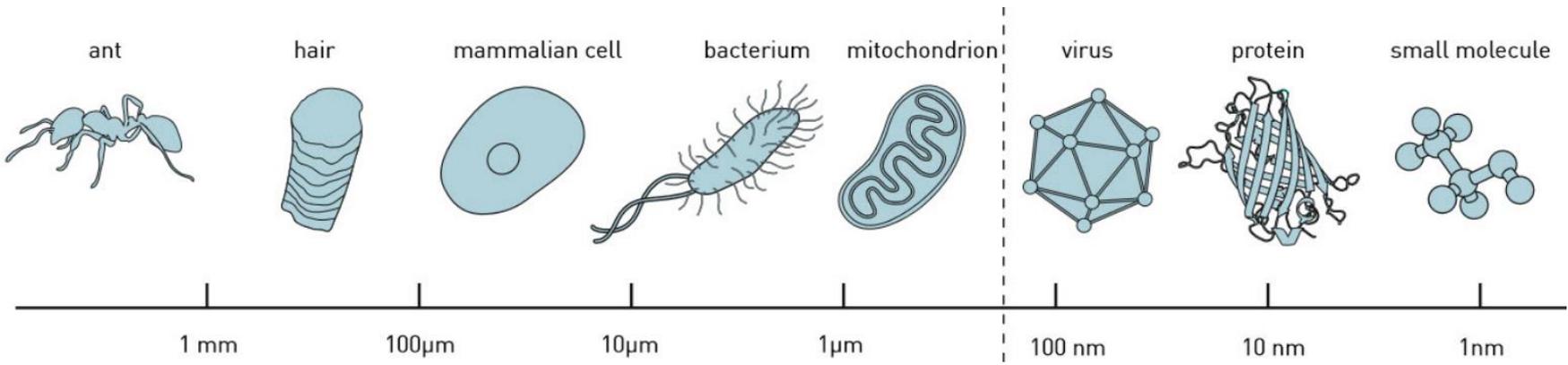
Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

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

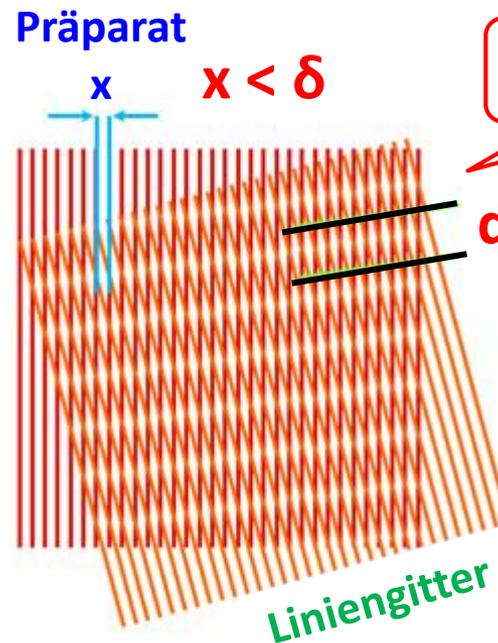
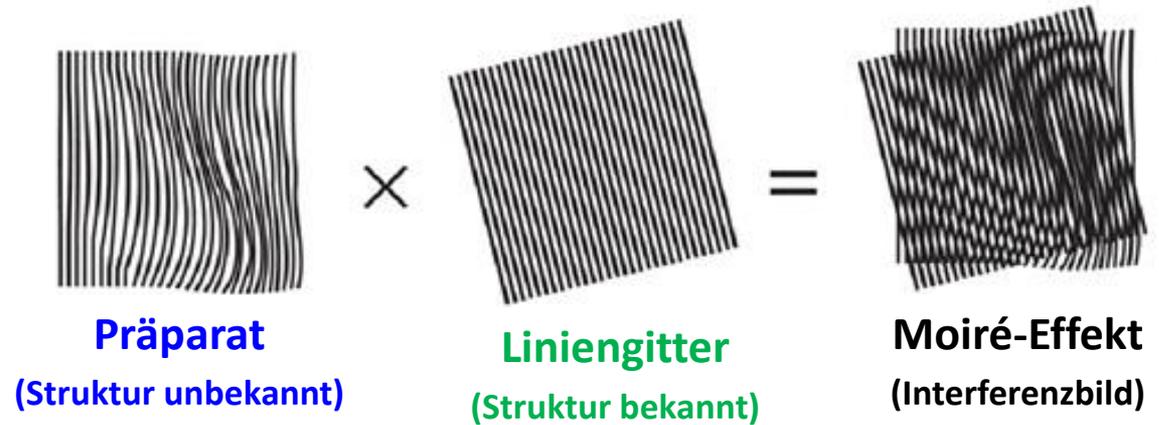
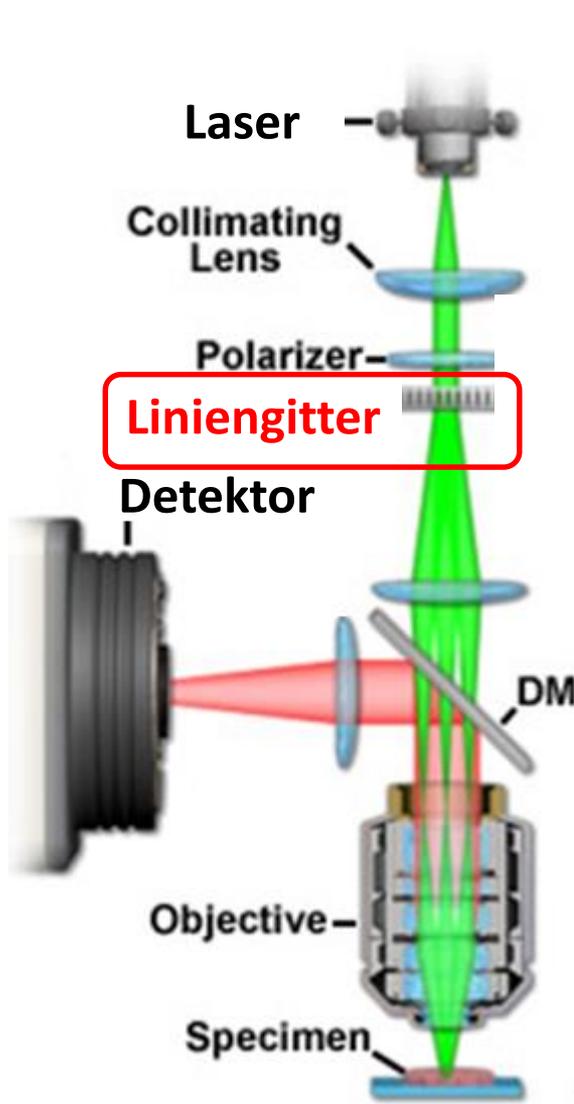
Numerische Apertur (NA)

Punktverteilungsfunktion oder Punktbildverwaschungsfunktion: Point Spread Function (PSF)

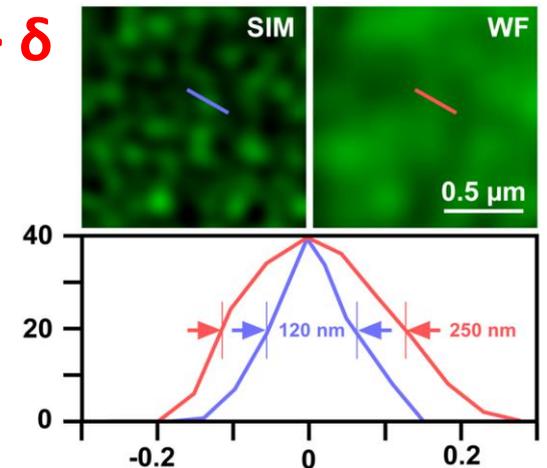
Abbe-Limit bei ~200 nm



Strukturierte Beleuchtung Mikroskopie (SIM)



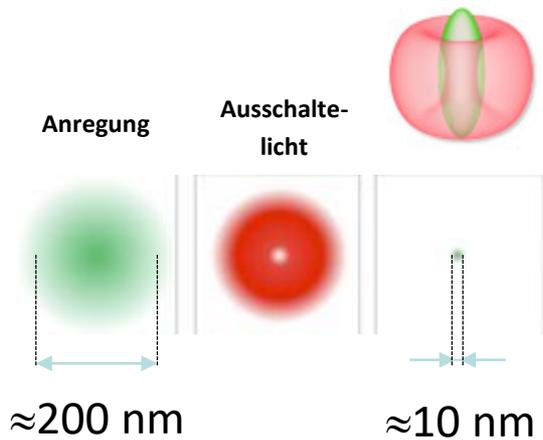
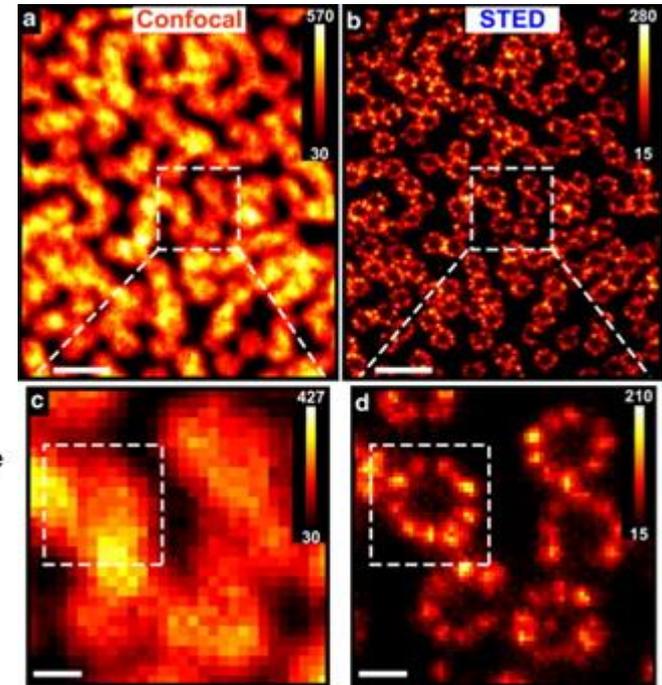
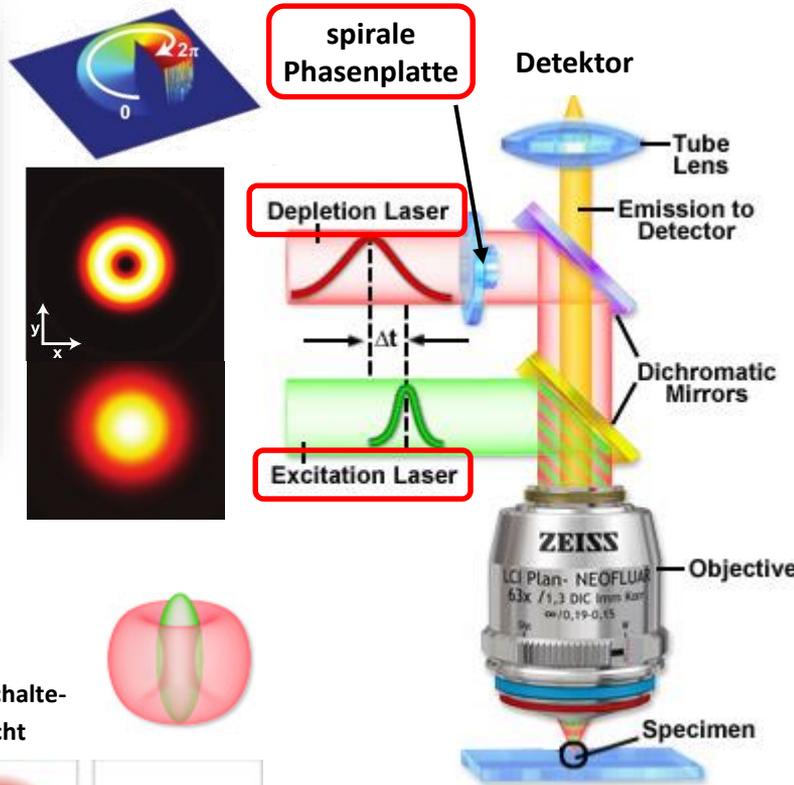
Struktur auflösbar



Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)



Stefan W. Hell
Nobel Preis 2014

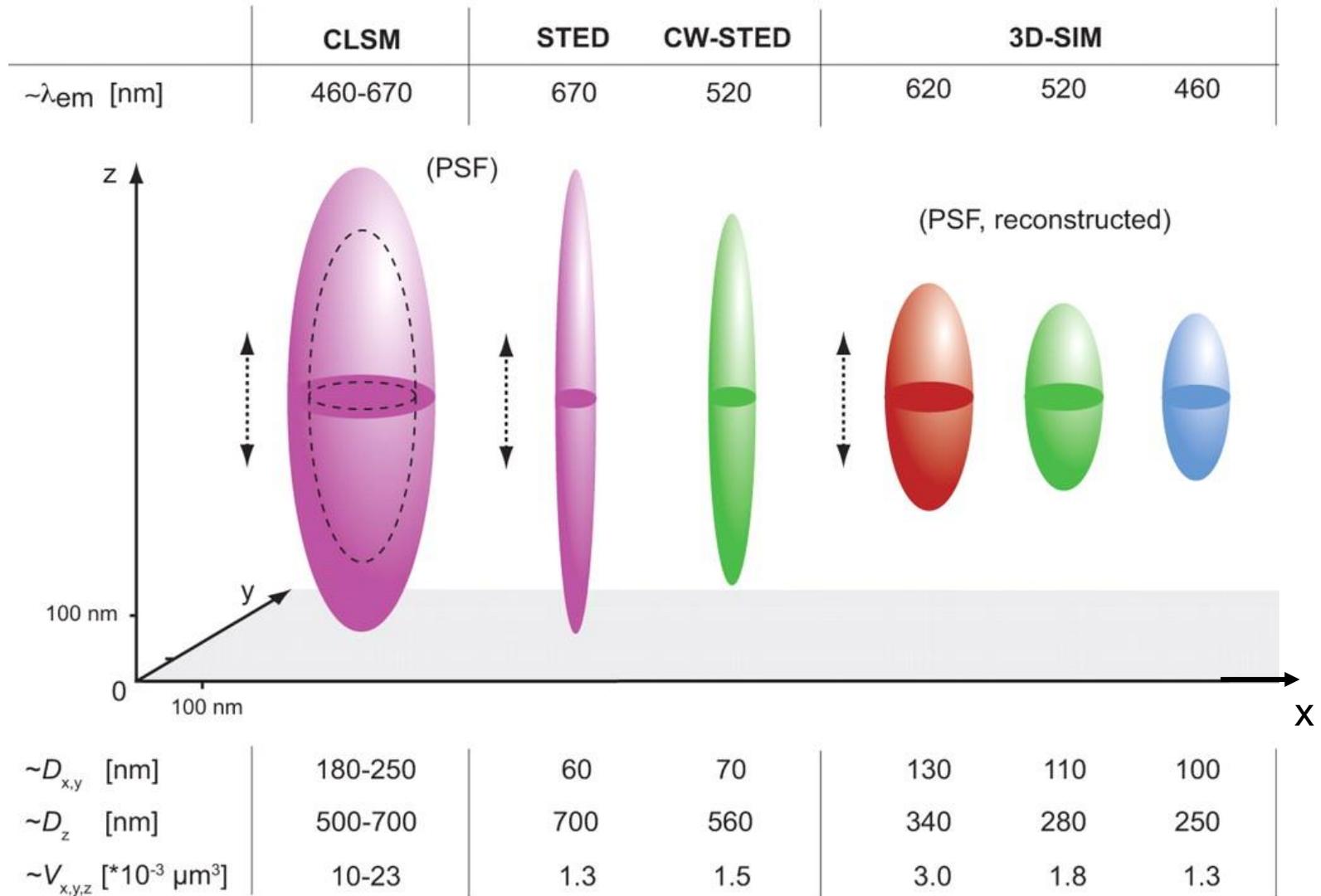


Abbe-Grenze

Superresolution

- Anregung gleich nach der „Ausschaltung“ der Fluorophoren
- Stimulierte Emission in einer sehr kleinen Raumteil: **Spirale Phasenplatte**
- **Abtastung** ist notwendig

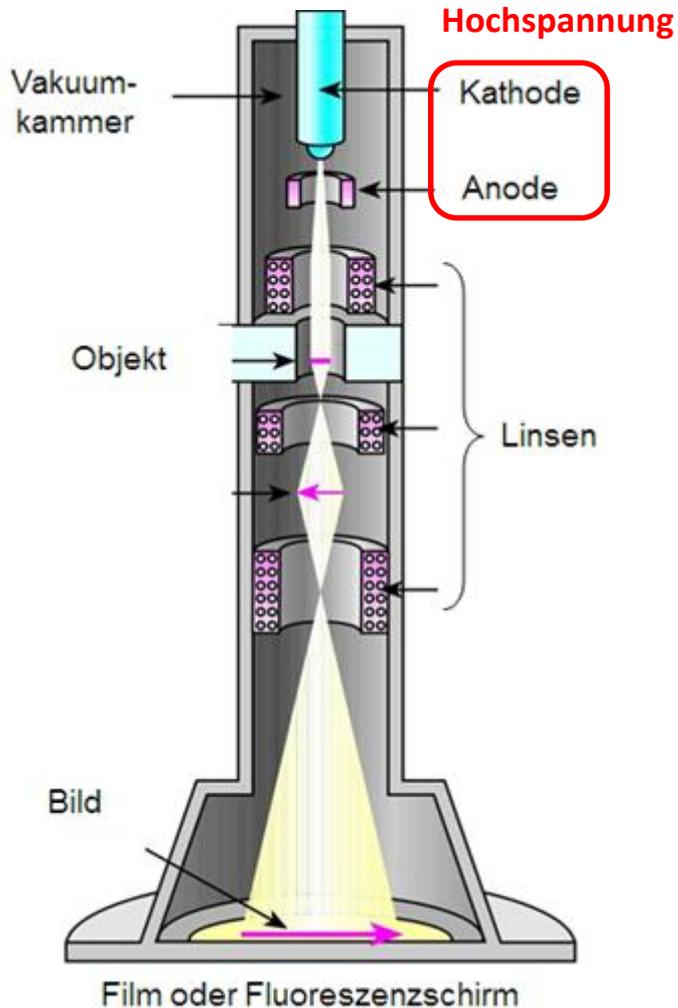
3D-Auflösung der Spezialmikroskope



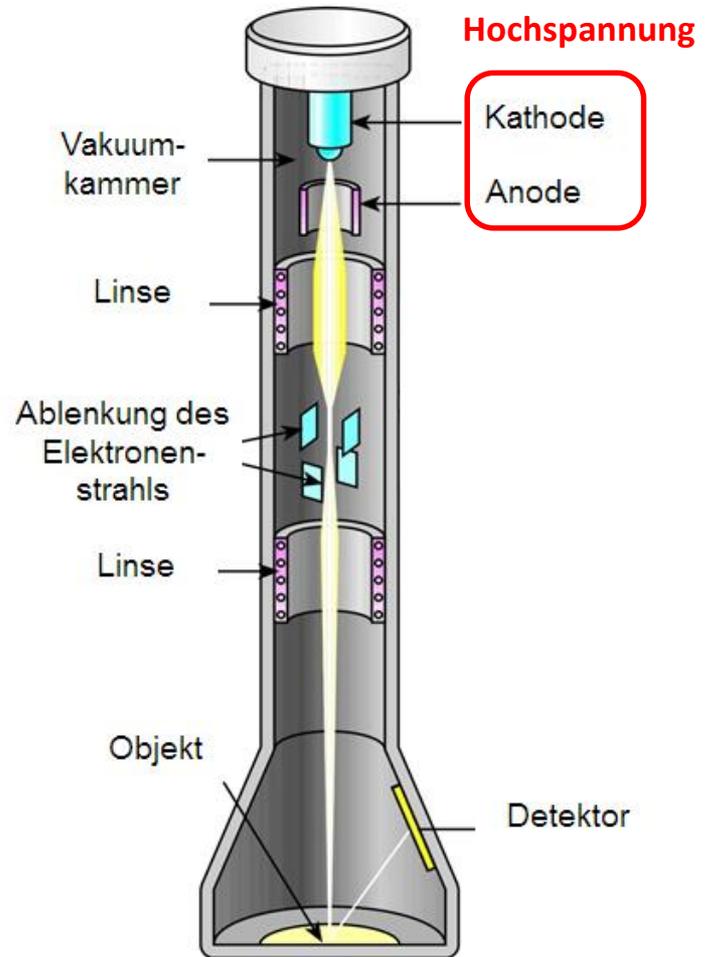
Elektronenmikroskope

Elektronenmikroskope

Transmissions- Elektronenmikroskop (TEM)

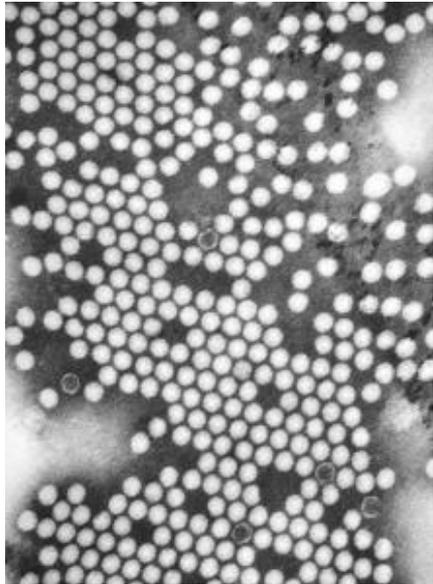


Raster- Elektronenmikroskop (SEM)

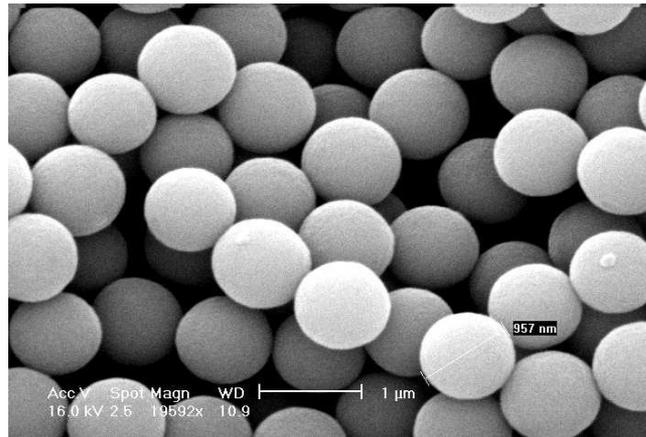


Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugelchen (SEM)



Auflösungsgrenze (δ):

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

$$NA \approx 0,03$$

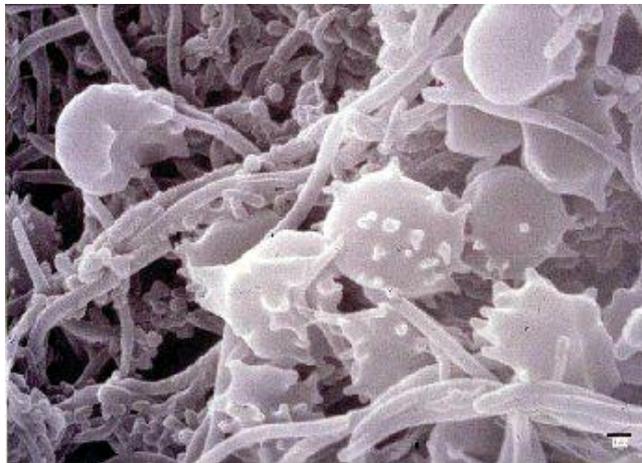
$$\lambda \approx 0,005 \text{ nm}$$

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

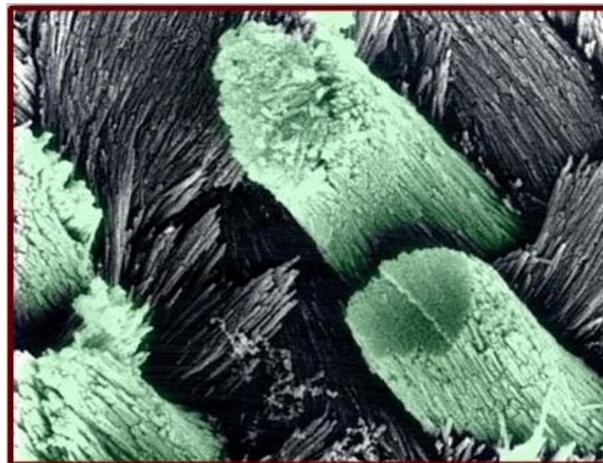
Materiewelle

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

Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den Apatitkristallen (SEM)



Dentin mit den Odontoblasten (SEM)



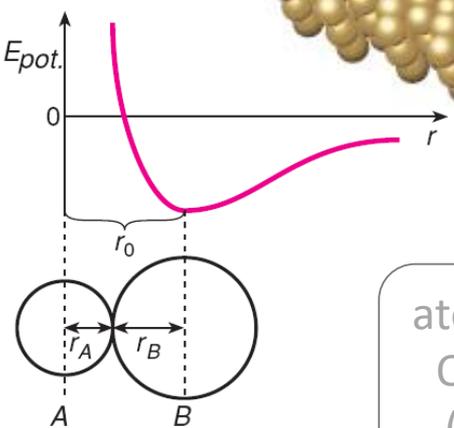
Rastersondenmikroskopie

Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM)

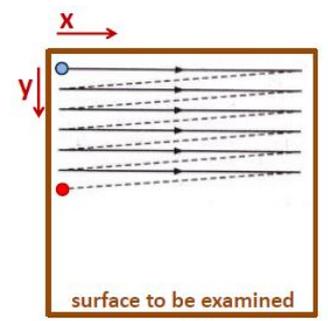
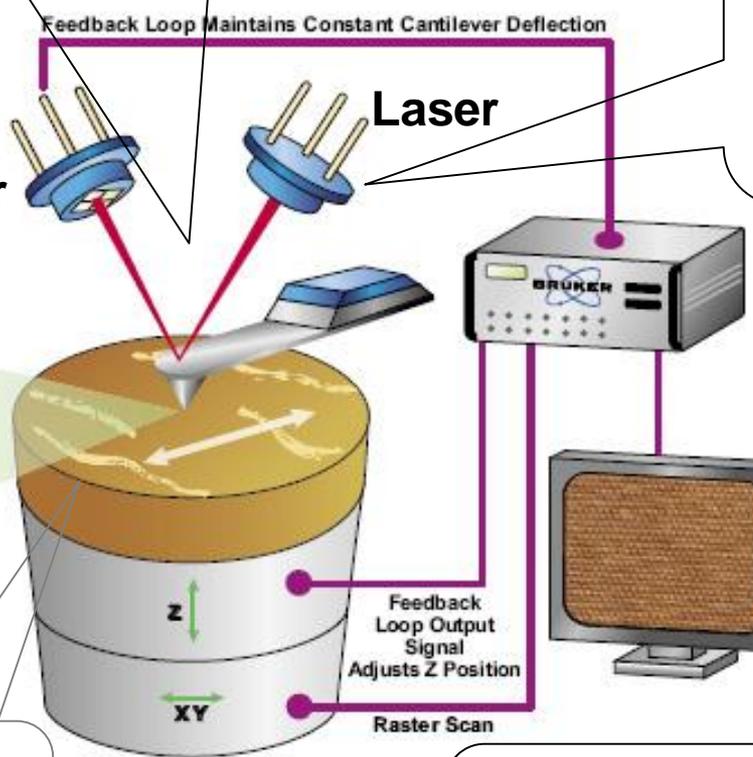
1. **Van der Waals Wechselwirkung** zwischen der Atome der Nadel und des Präparats.

2. Die **Blattfeder wird** wegen der Van der Waals Kräfte **verbogen**.

3. Die Verbiegung einer Blattfeder wird mit einem **Laserstrahl** gemessen.

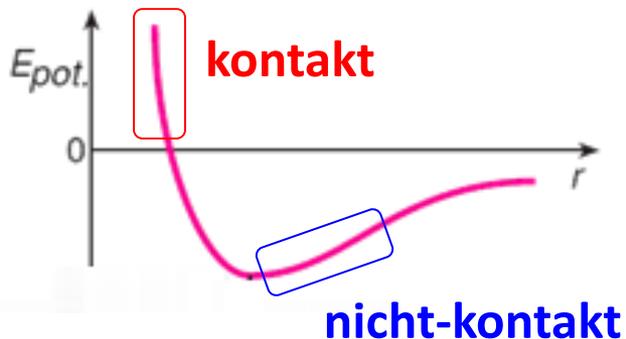
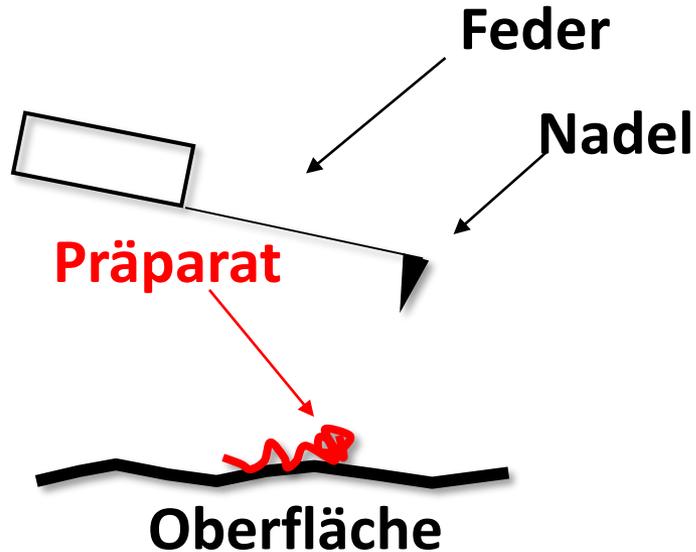


atomar glatte Oberfläche (Glimmer)



4. **Rasterprinzip:** die Probe (oder das Präparat) wird in X-Y-Z Richtungen bewegt.

AFM Betriebsarten



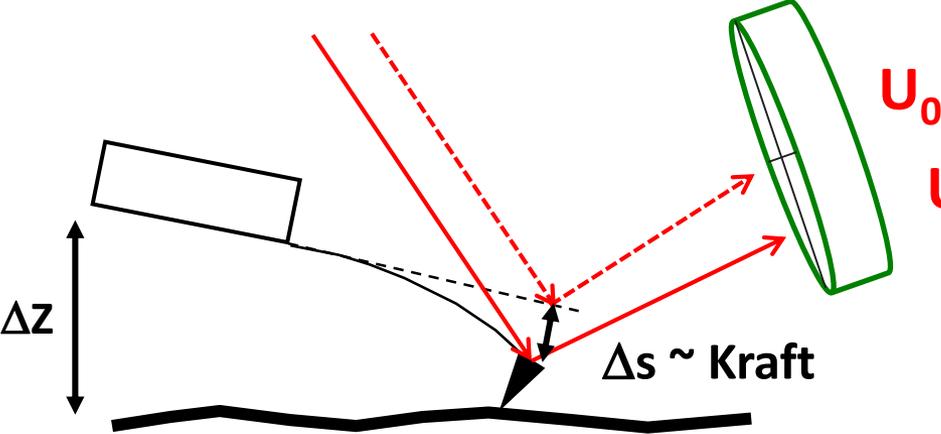
- **Kontakt:** die Messspitze steht in direktem mechanischem Kontakt mit dem Präparat, die **Auslenkung der Feder** liefert die topographische Information.
 - **Z-Rückkopplung:** die Auslenkung des Cantilevers und damit die Kraft zwischen Spitze und Probe wird mit dem „Setpoint“ verglichen. Die Regelung bewirkt dann eine Höhenänderung bis die Auslenkung dem Setpoint entspricht.
 - **Die topographische Information** (zB. Höhe) wird in jedem X;Y Bildpunkt aus der 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 Z-Höhenänderung des Cantilevers.

AFM: Kontakt-Modus

eignet zur Untersuchung von weichen biologischen Strukturen (z.B. Zellen)

Laserstrahl

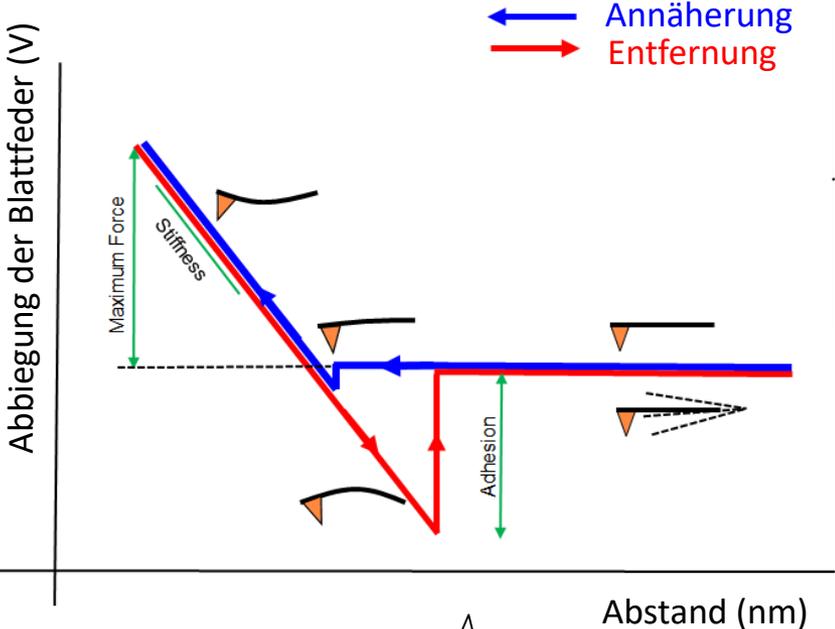
Detektor (Photodiode)



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

Δs : Abbiegung der Blattfeder

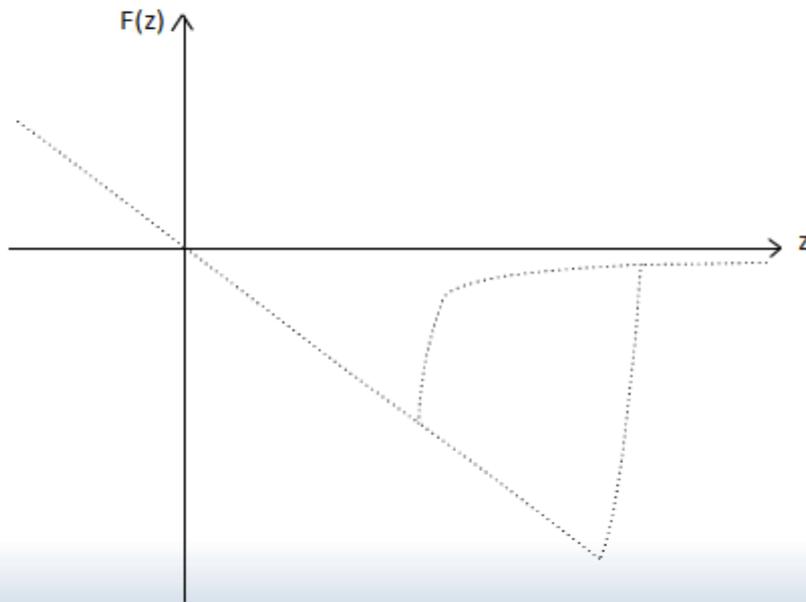
D: Federkonstante



Kraftmessung / Elastizitätsmessung an biologischen Präparaten

AFM: Kontakt-Modus

Force-displacement curve



This is a force-displacement curve, showing the change in the force acting on the tip as it approaches and withdraws from the surface.

The horizontal axis is the extension of the piezo in the z -direction.

The y -axis is the force experienced by the cantilever. Since force is calculated from Hooke's law: $F = -kx$, the y -axis can also be considered as cantilever deflection.

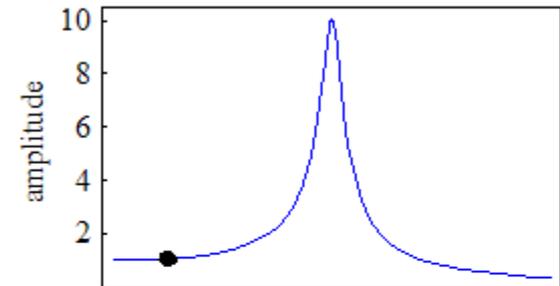
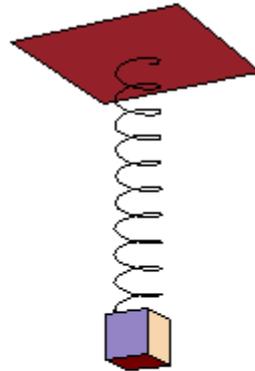
Start 



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.

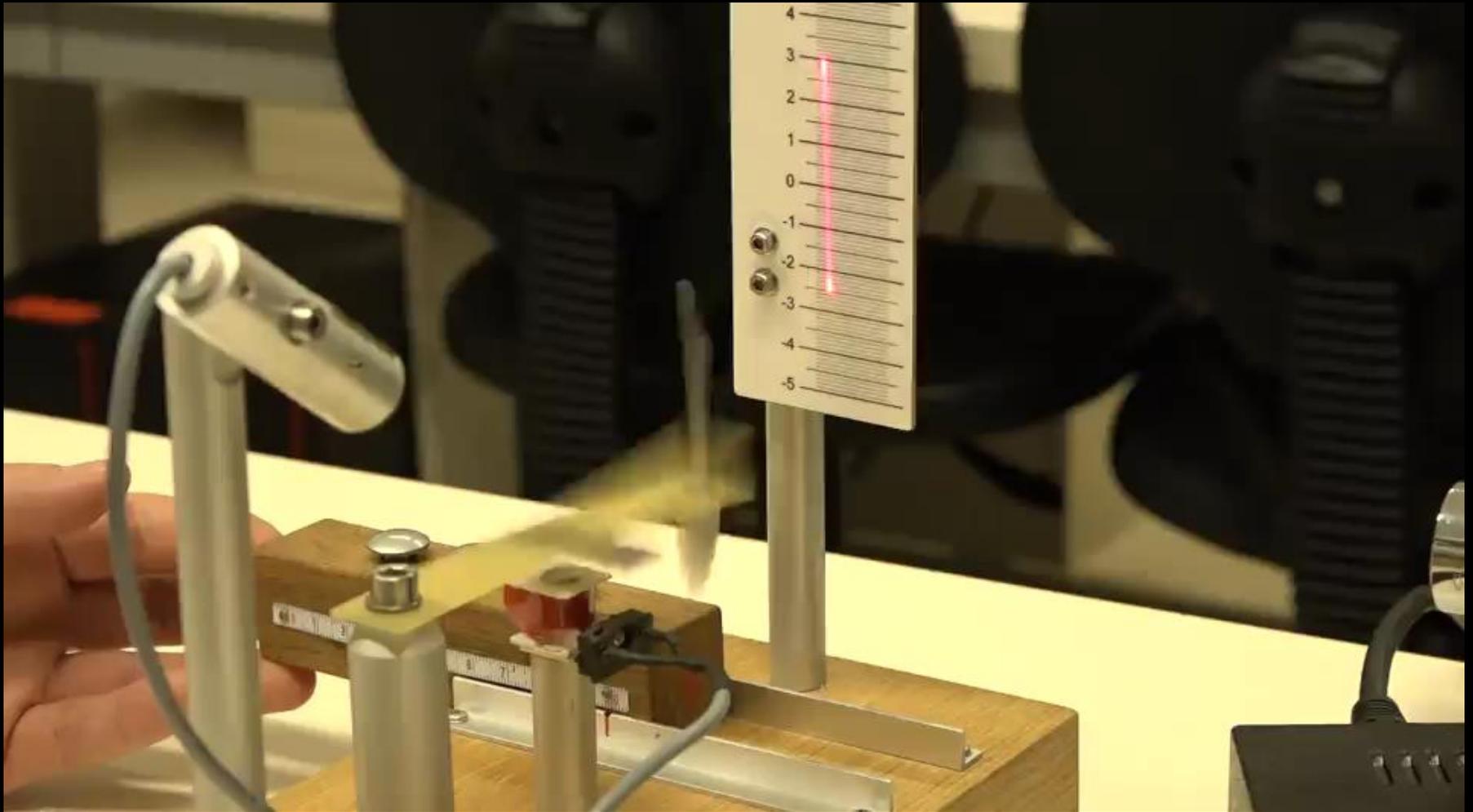
Erzwungene Schwingung



$$f_{\text{erreger}} = f_{\text{eigen}}$$

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

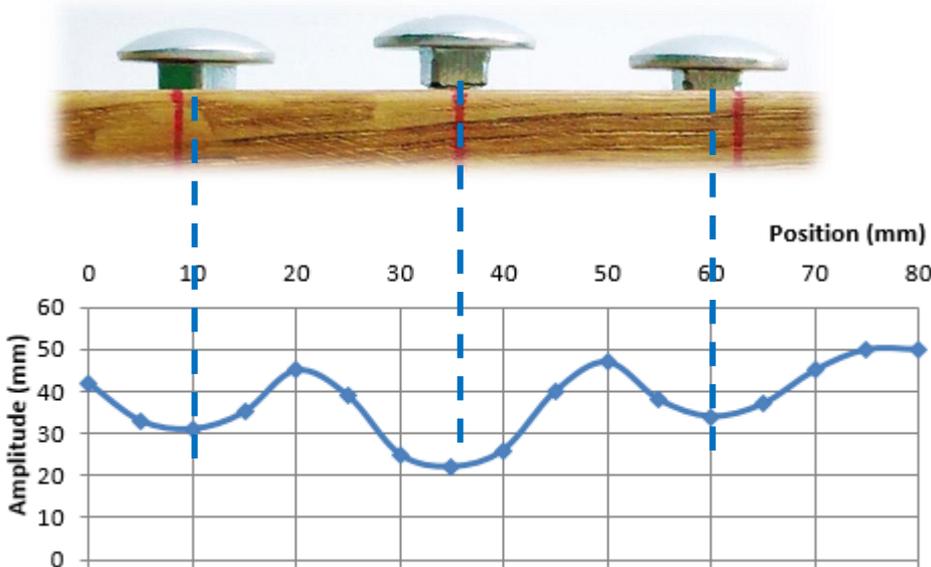
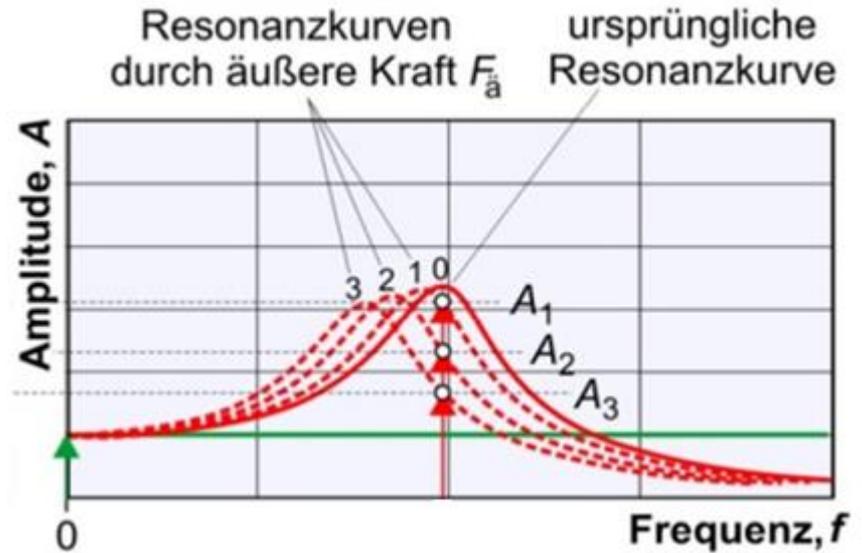
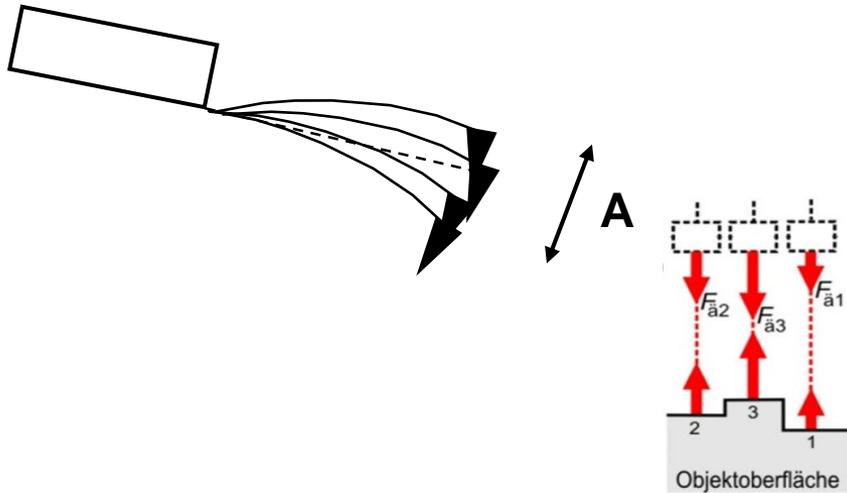
AFM Modell: Nicht-Kontakt-Modus



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

Zur Erinnerung!

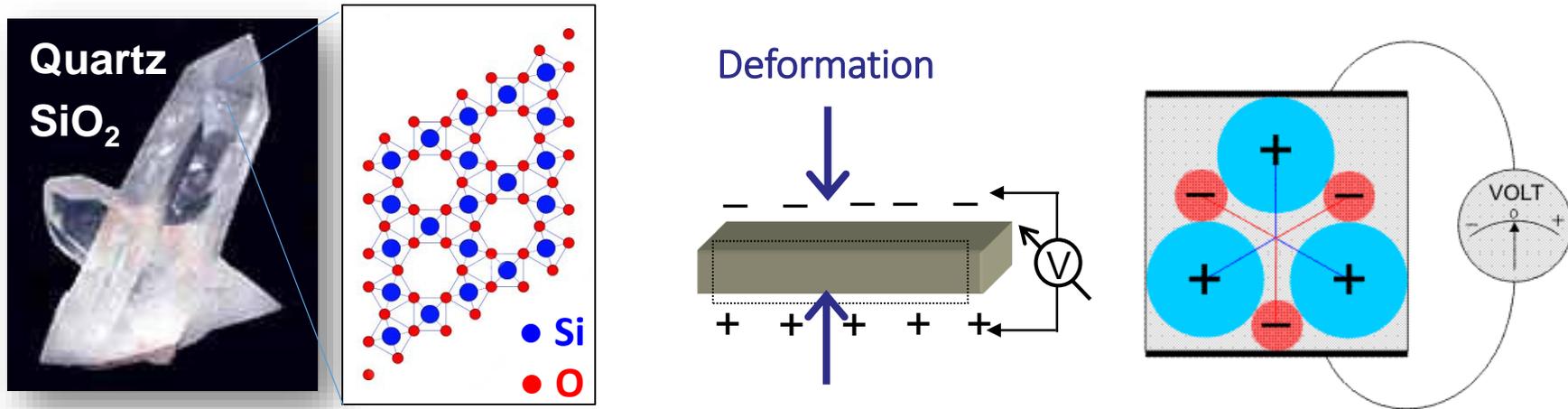
AFM: Nicht-Kontakt-Modus



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

- **Objekthöhe** kann **nur mit Rückkopplung** gemessen werden.

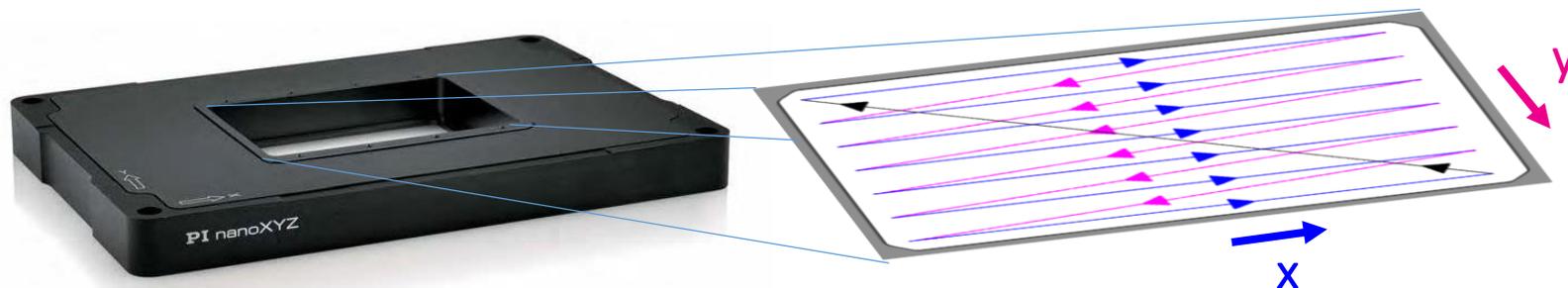
Das Rasterprinzip: Piezoelektrizität



- **Inverser piezoelektrischer Effekt: Spannung → Deformation**

- X, Y, Z Piezotransducer: 150 V → 40 μm

präzise Schrittgröße:
0,1 nm



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:**

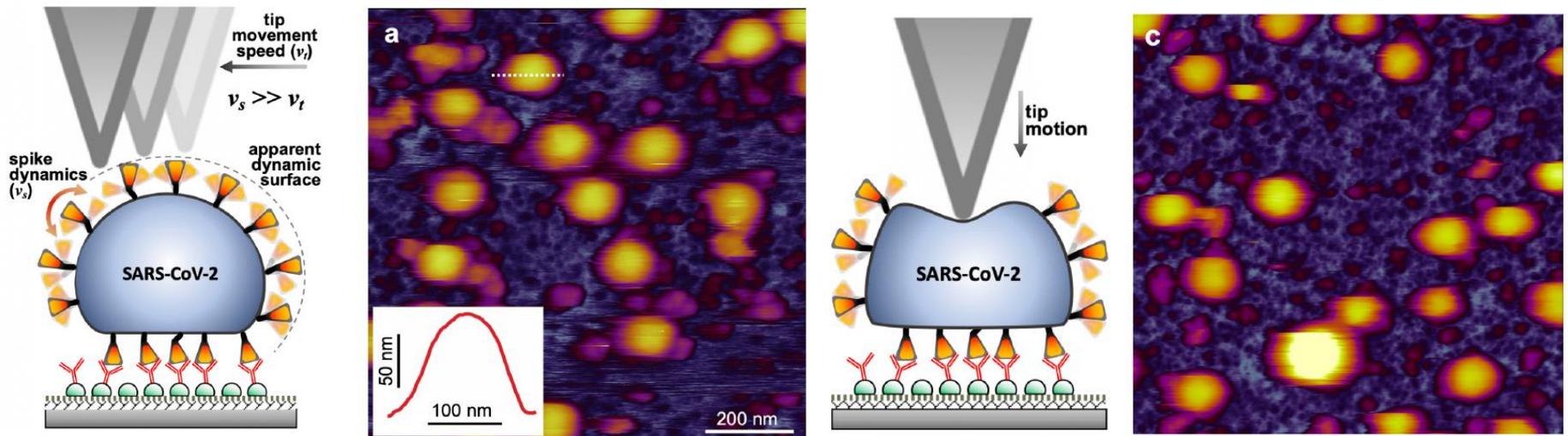
- Das Präparat soll zur Tragfläche konjugiert werden, dabei ändert sich eventuell seine Struktur.
- Langsame Abtastung.
- Maximale Abtasthöhe ist im μm -Bereich.
- Maximale abtastbare Oberfläche liegt im $100 \mu\text{m}^2$ -Bereich ($10 \cdot 10 \mu\text{m}$ Rechteck).
- Teuer (Instrument, Vorbereitung des Präparats, Cantilever).

Natives SARS-CoV-2 Virus

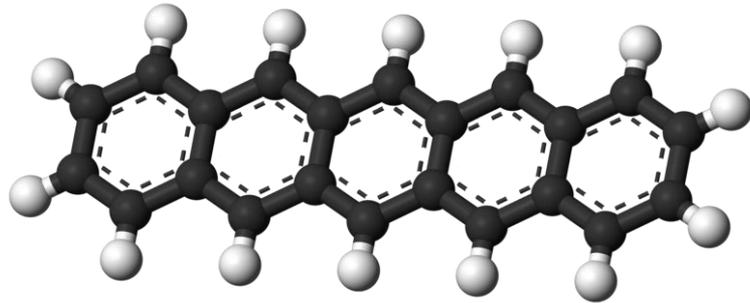
Topography, spike dynamics and nanomechanics of individual native SARS-CoV-2 virions

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

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



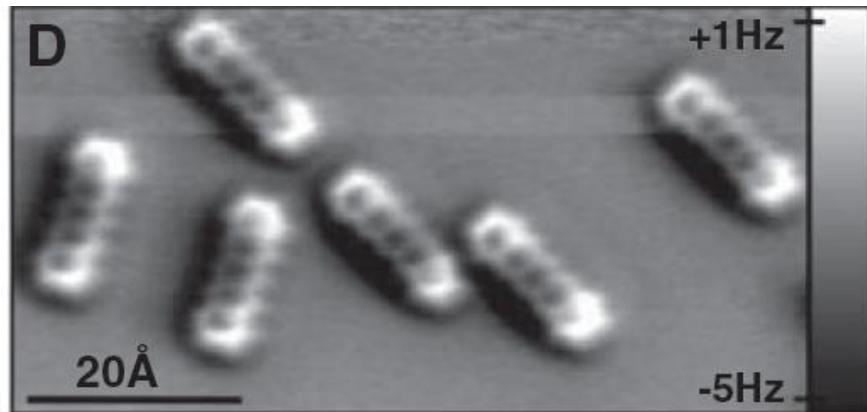
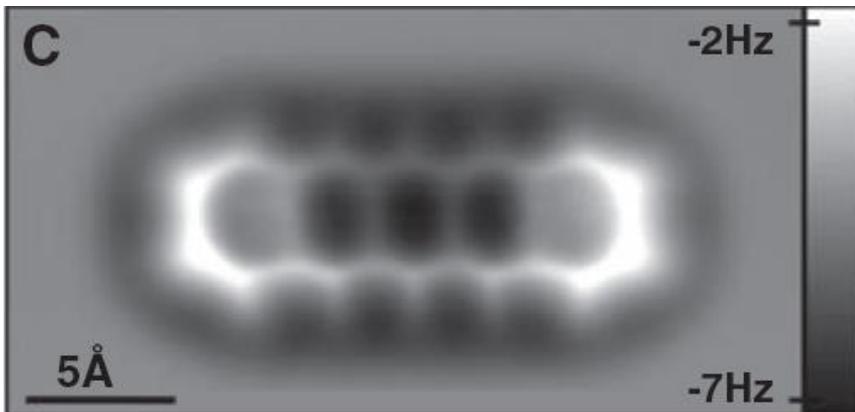
Pentacen Molekül



Tunnelstromstärke durch die Nadel



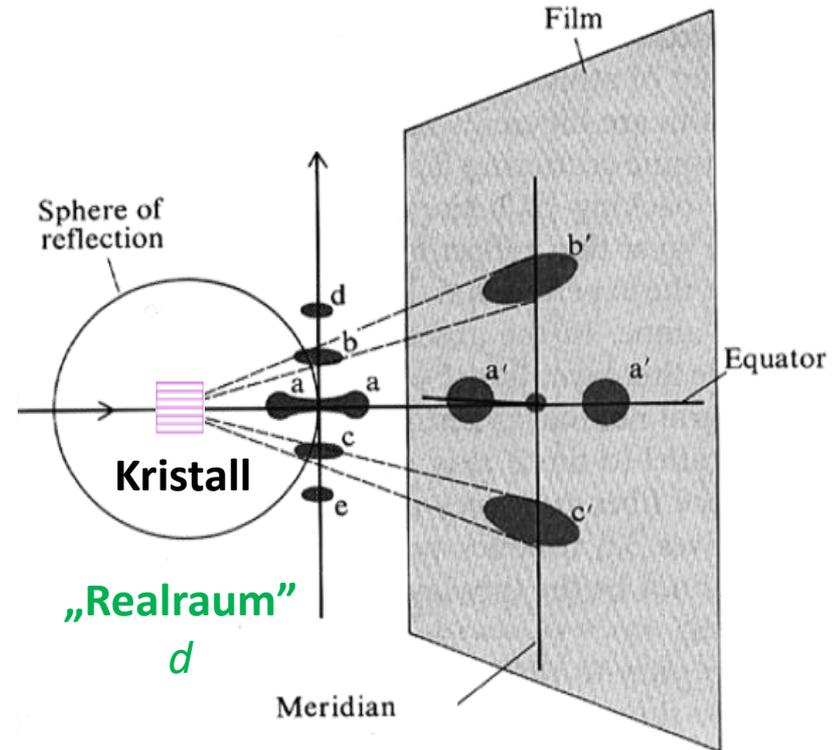
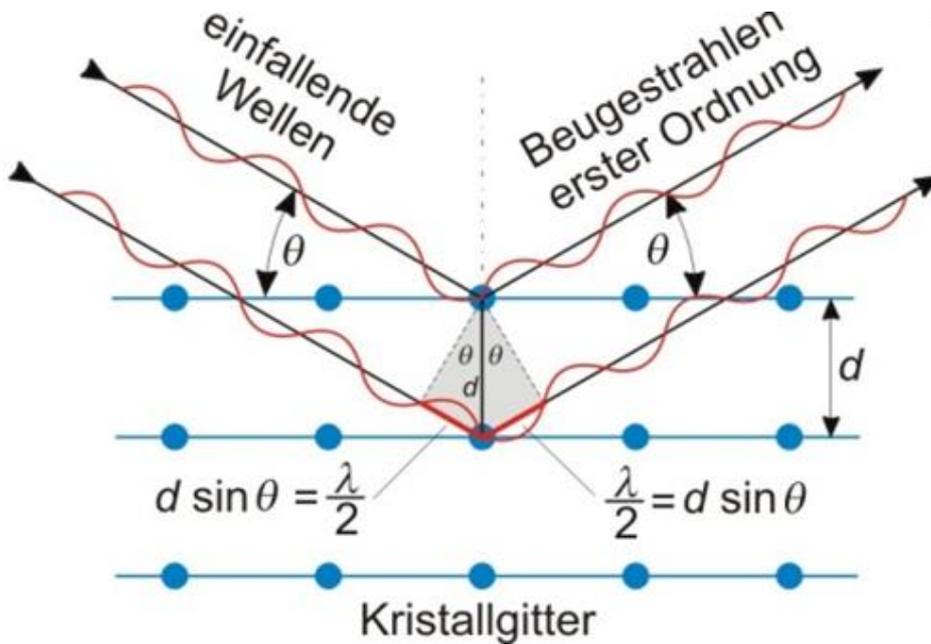
Topographie (AFM, die Spitze der Nadel ist mit CO-bedeckt)



Nature Chemistry 1, 597 - 598 (2009)

Diffraktionsmethoden

Röntgendiffraktion - Grundlagen



Bragg-Gleichung:

$$2d \cdot \sin \theta = k \cdot \lambda$$

$$d \sim \frac{1}{\theta} \text{ strukturspezifische Information}$$

$$\text{„Reziprokrum“}$$

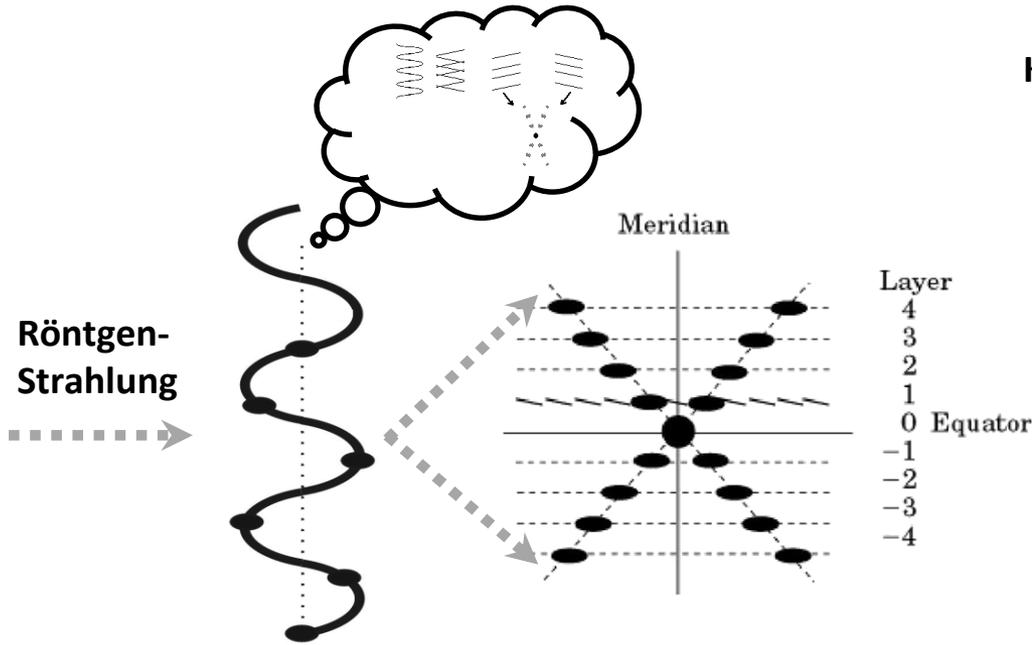
$$\frac{1}{\theta}$$

d : Gitterabstand
 θ : Beugungswinkel
 λ : Wellenlänge

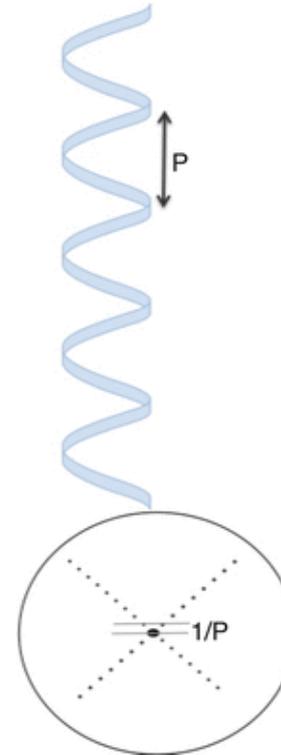
Röntgendiffraktion: 0,01-0,1 nm
 Elektronendiffraktion: 0,1 nm
 Neutronendiffraktion: 0,01 nm

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

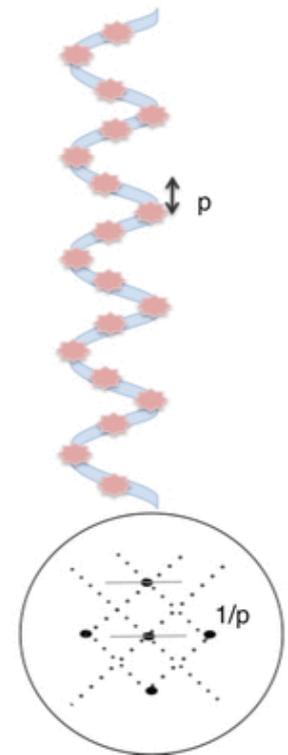
Röntgendiffraktion an Fasern



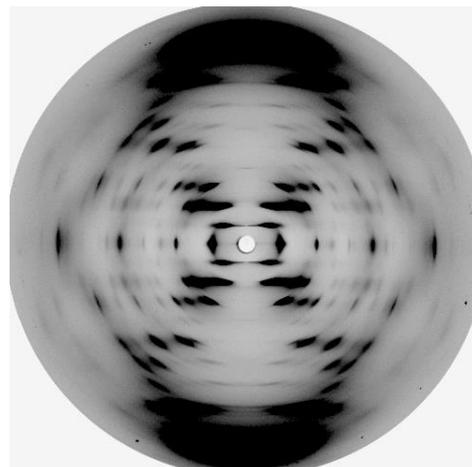
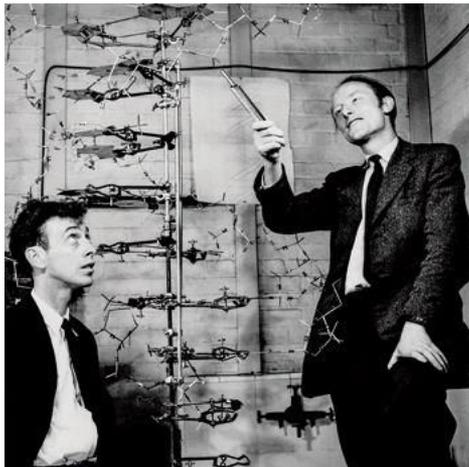
Kontinuierliche Helix



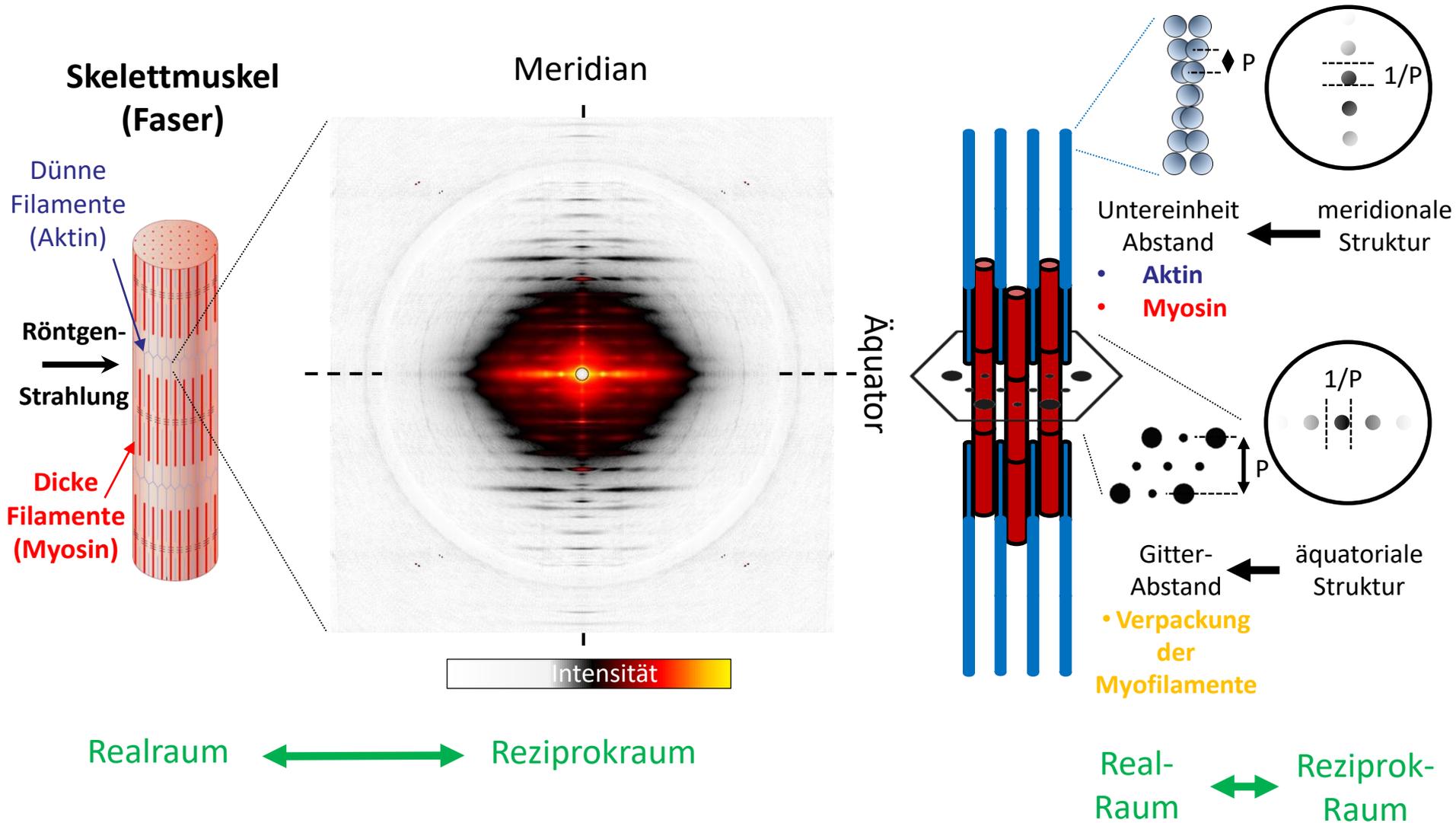
Diskontinuierliche Helix



DNS



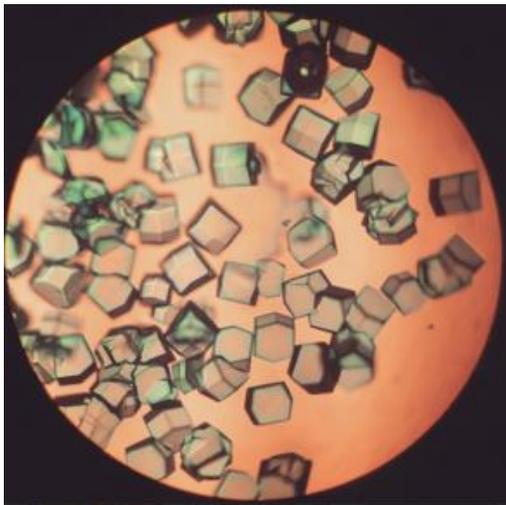
Röntgendiffraktion an Skelettmuskel



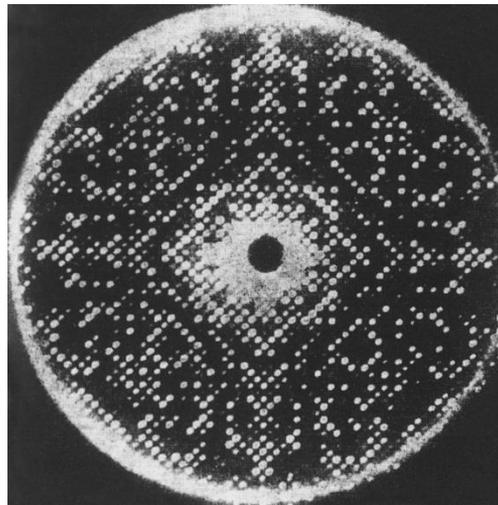
Röntgendiffraktion – weitere Beispiele

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

**Lysozym
Kristalle**



Diffraktionsbild



3D-Struktur

