

Methoden der Strukturenuntersuchung

Lichtmikroskopische Techniken

Rastermikroskope

Elektronmikroskope

Diffraktionsmethode

Typische Grössen

m

10^0

meter

Mann

10^{-3}

millimeter

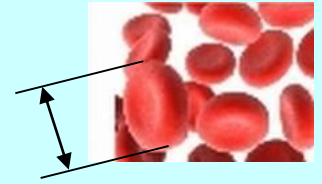
Abstand der man mit Auge sehen kann

10^{-6}

mikrometer

Zelle (z.B. Blutkörpern)

$\varnothing 7\mu\text{m}$



10^{-9}

nanometer

Protein

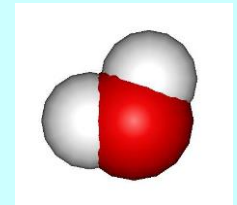


10^{-10}

– Angström

Durchmesser des Atoms,

H Atom $\varnothing \approx 1$ Angström (Å)



10^{-12}

pikometer

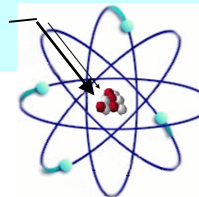
Wellenlänge der Röntgenstrahlung



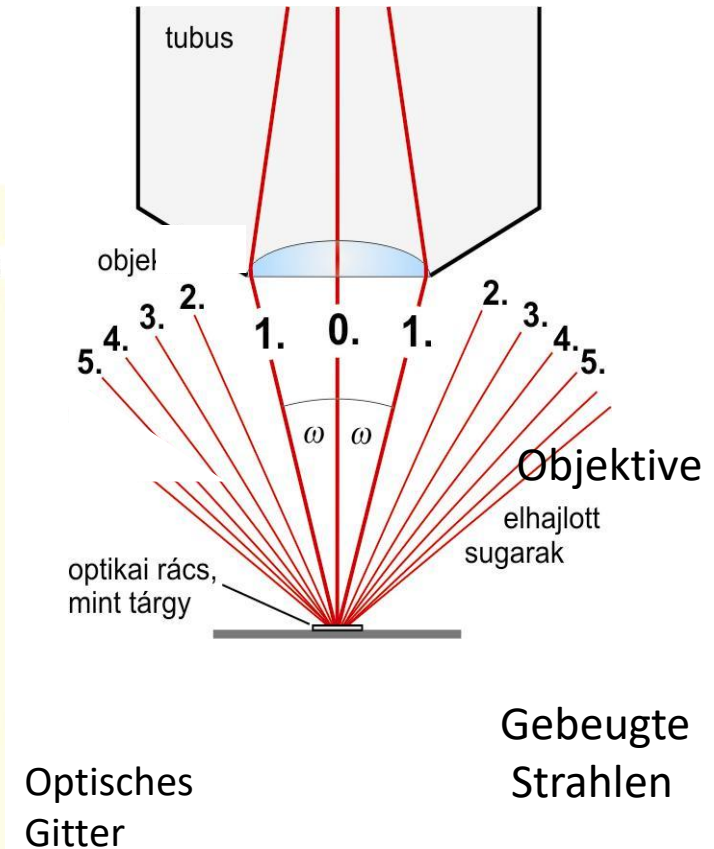
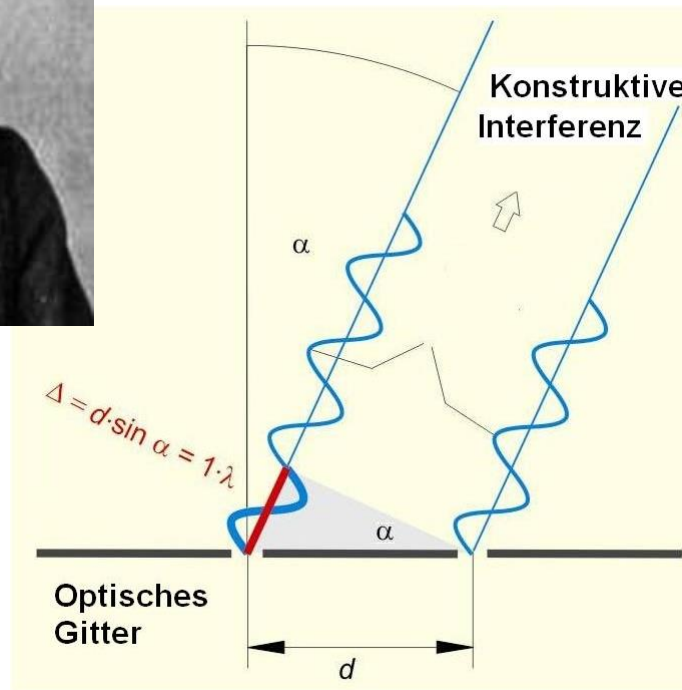
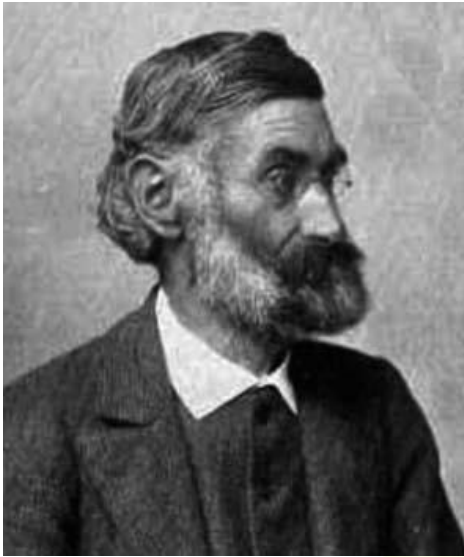
10^{-15}

femtométer

Atomkern



Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops



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

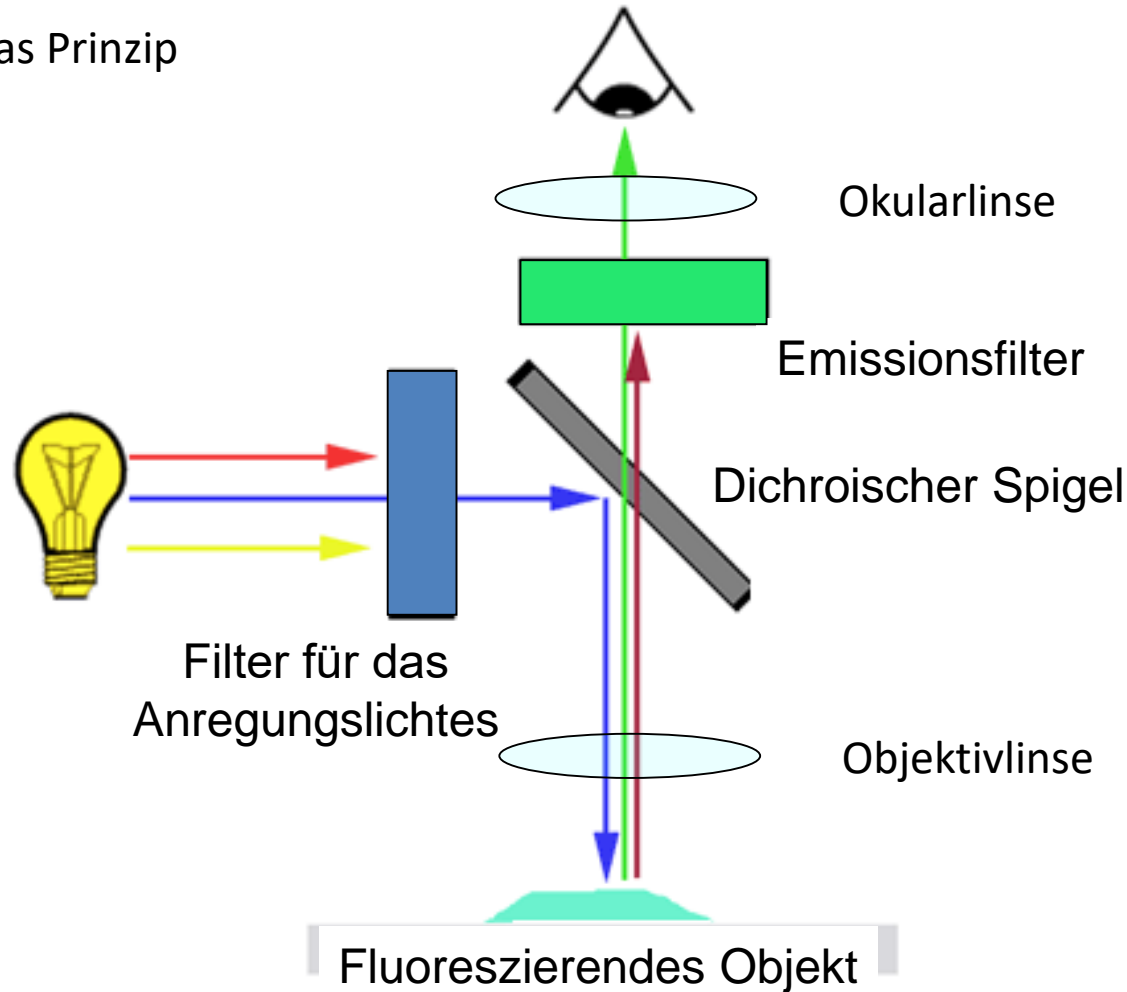
Mit $\lambda=400 \text{ nm}$, $n=1,6$ und $\omega \approx 90^\circ$ ist $d \approx 150 \text{ nm}$

Spezielle Lichtmikroskopische Techniken

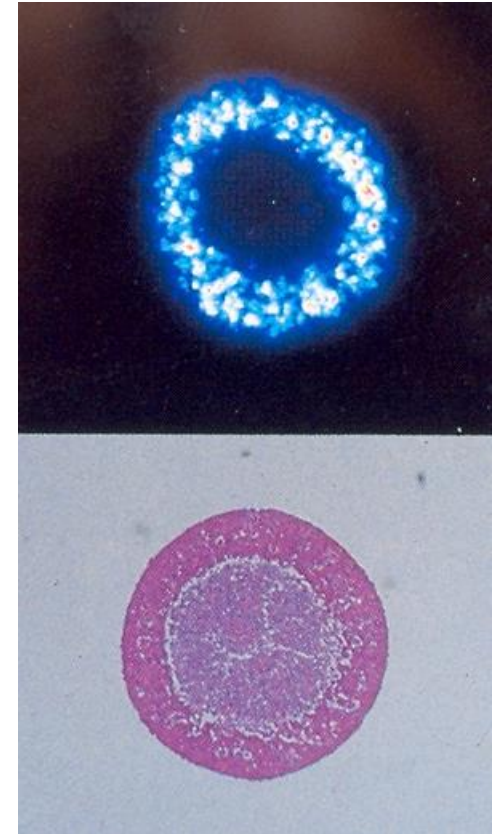
- Schon gelernt beim Praktikum:
 - Stereomikroskop
 - Phasenkontrast Mikroskop
 - Immersionsmikroskop
 - Dunkelfeldmikroskop
- Konfokales Mikroskop
- Zweiphotonenmikroskop
- Fluoreszenzkorrelationsmethode

Fluoreszenzmikroskop

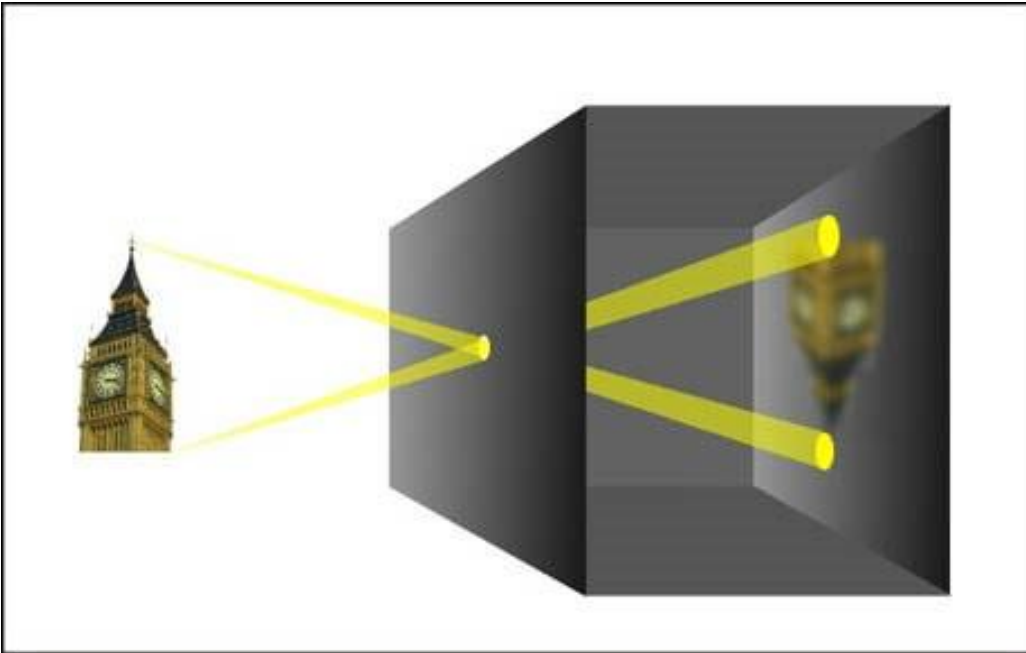
Das Prinzip



ATP-Verteilung
visualisiert mit Luciferin

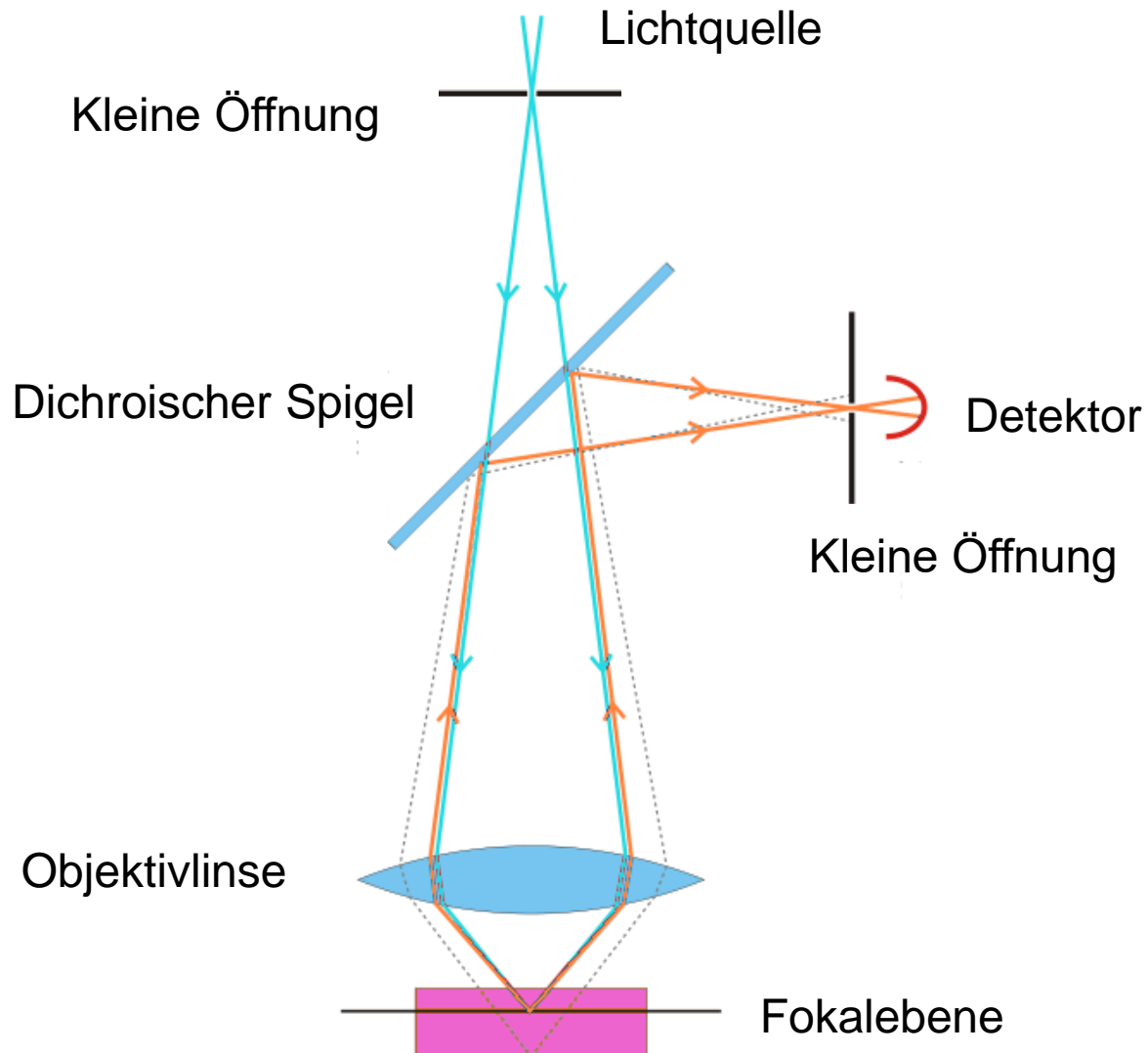


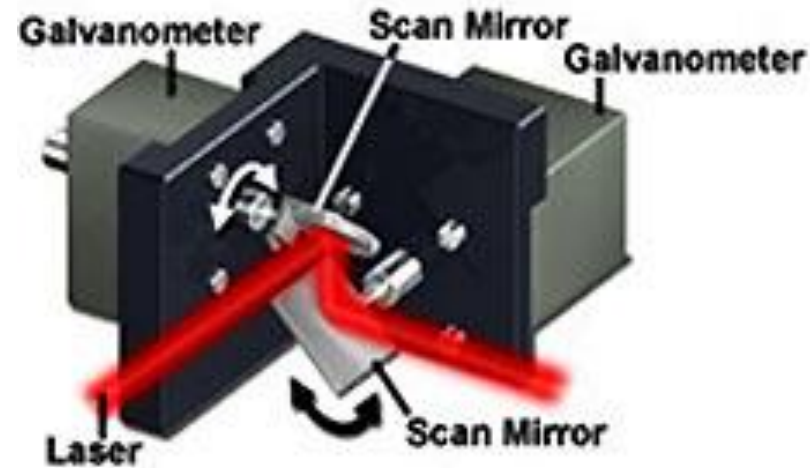
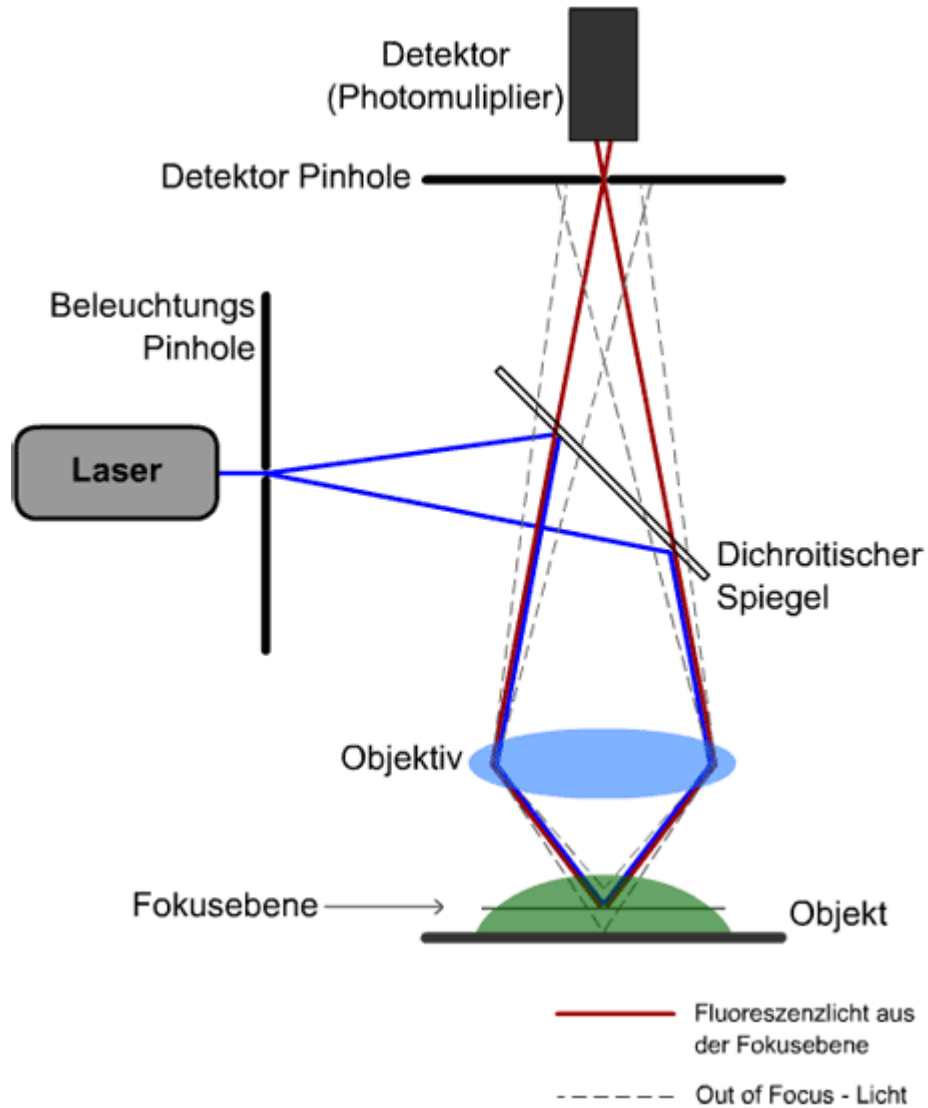
Konventionelle mikros-
kopische Aufnahme

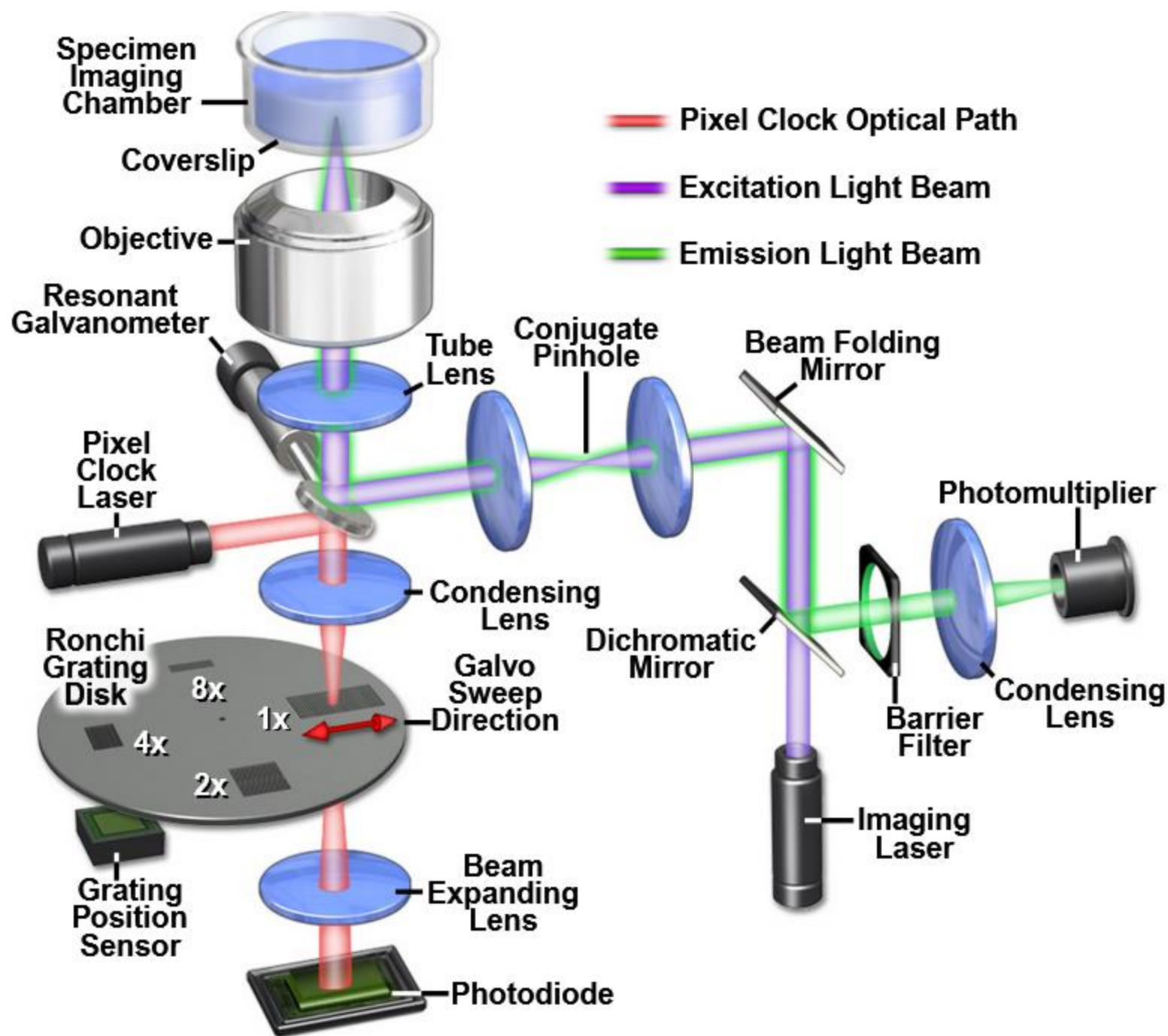


Lochkamera

Konfokales Mikroskop







Airy Disks and Diffraction Pattern Intensity Profiles

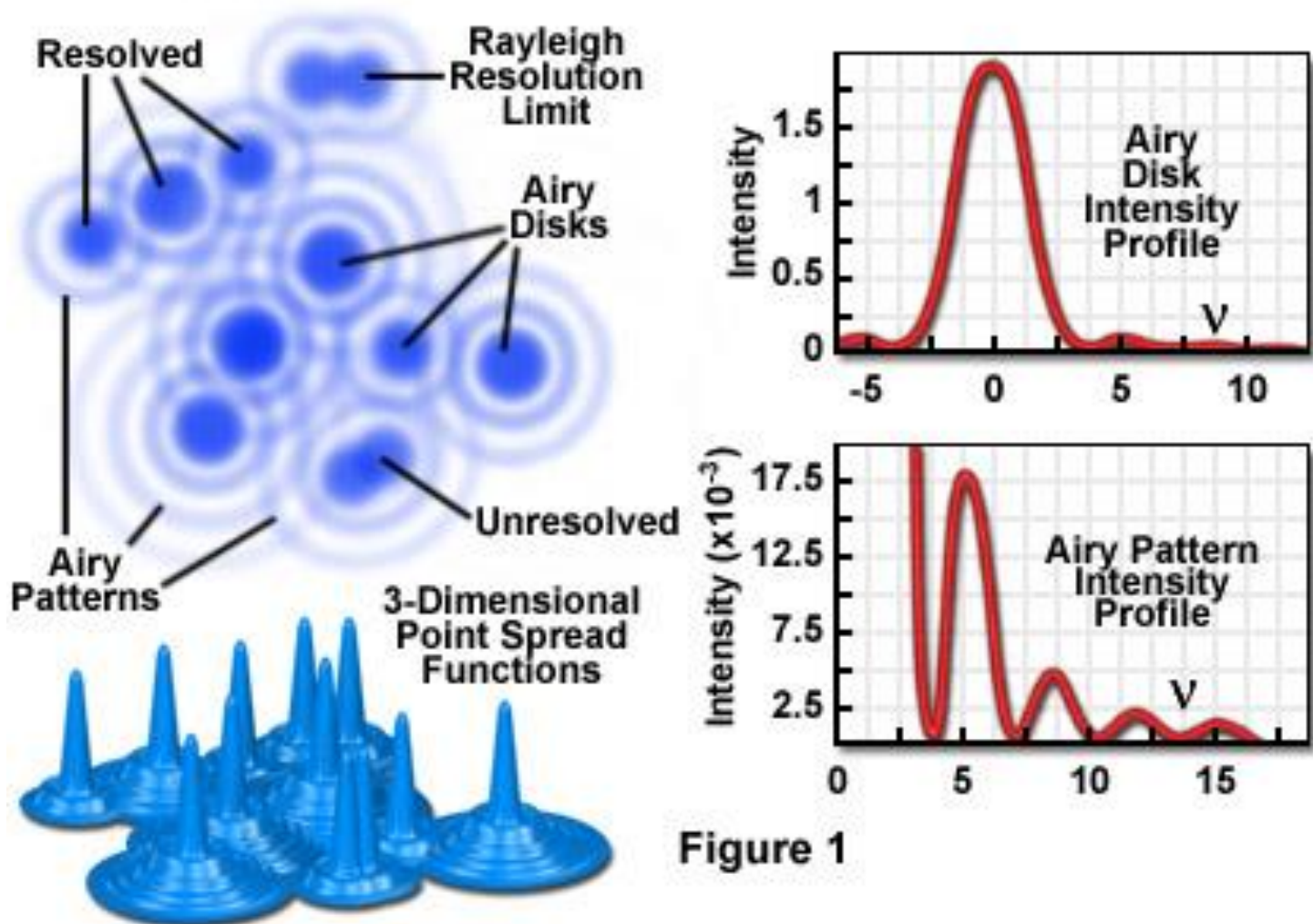
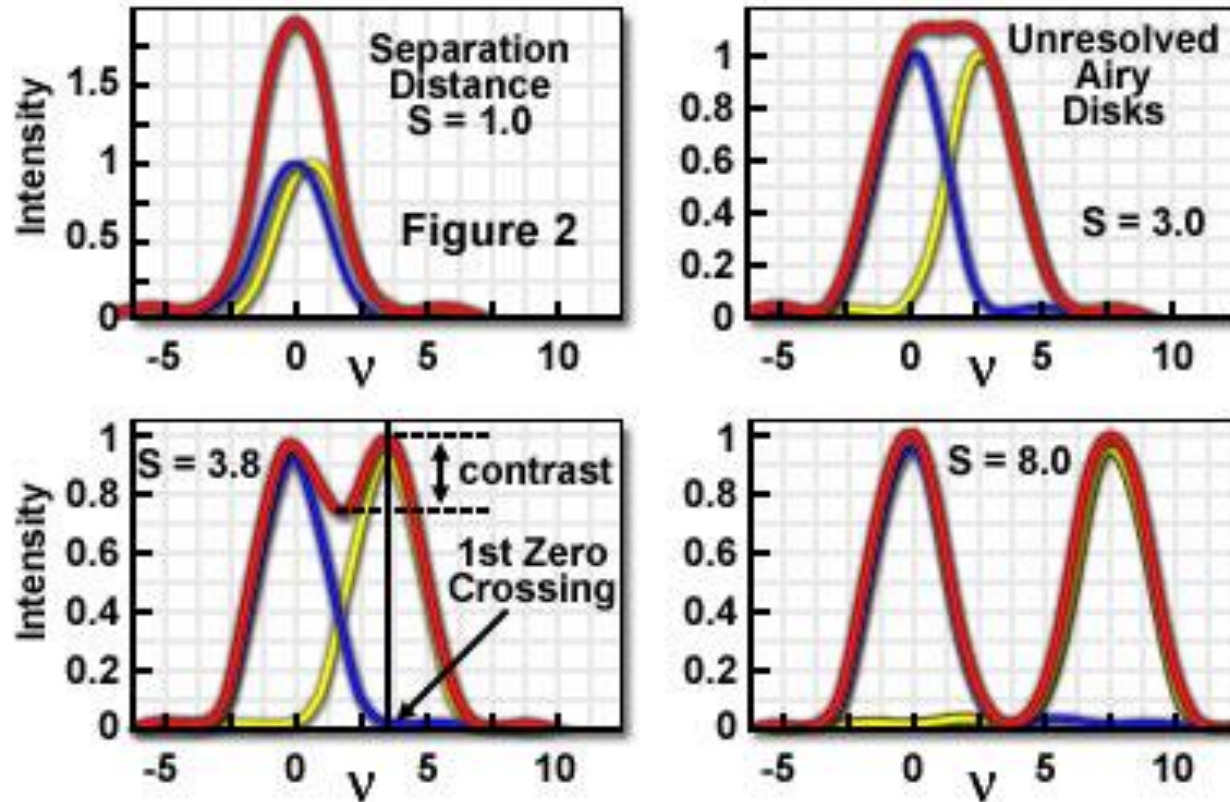


Figure 1

Contrast and Resolution in Fluorescence Microscopy



Axial PSF Intensity Profiles

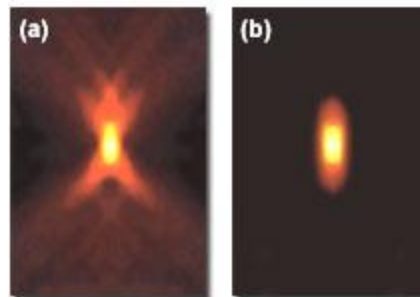


Figure 3

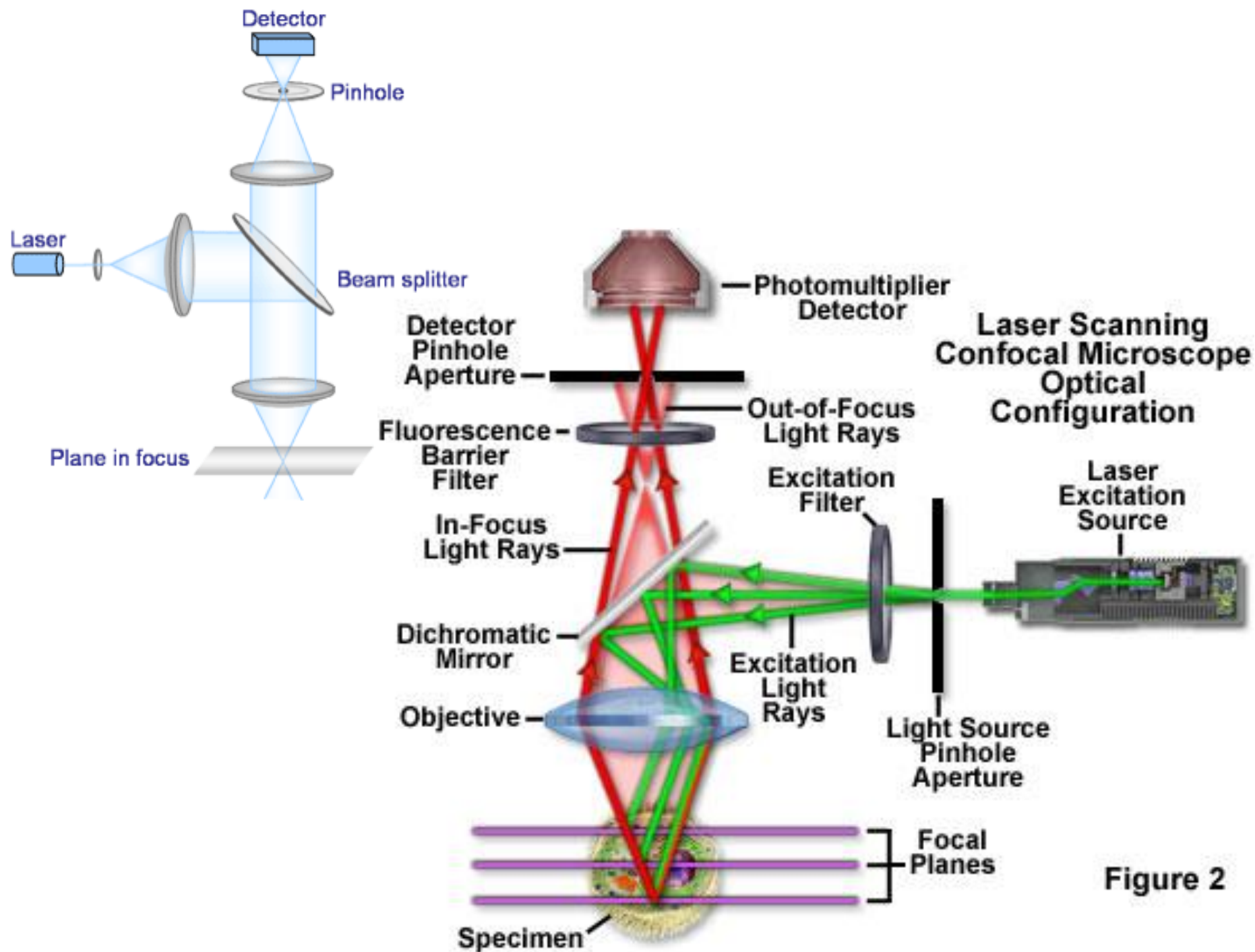


Figure 2

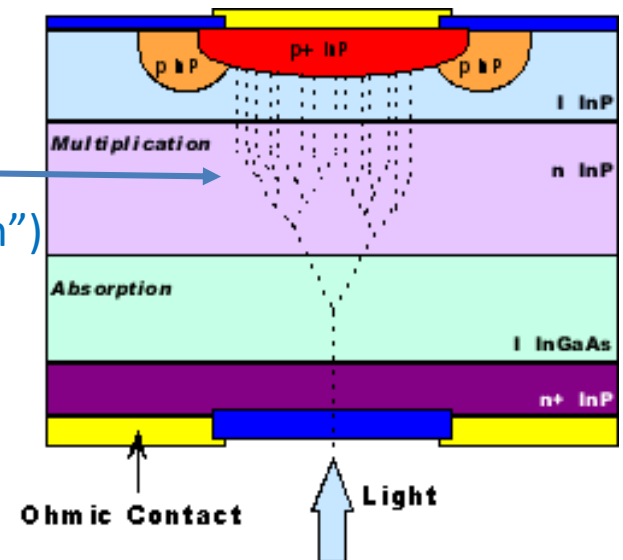
PMT



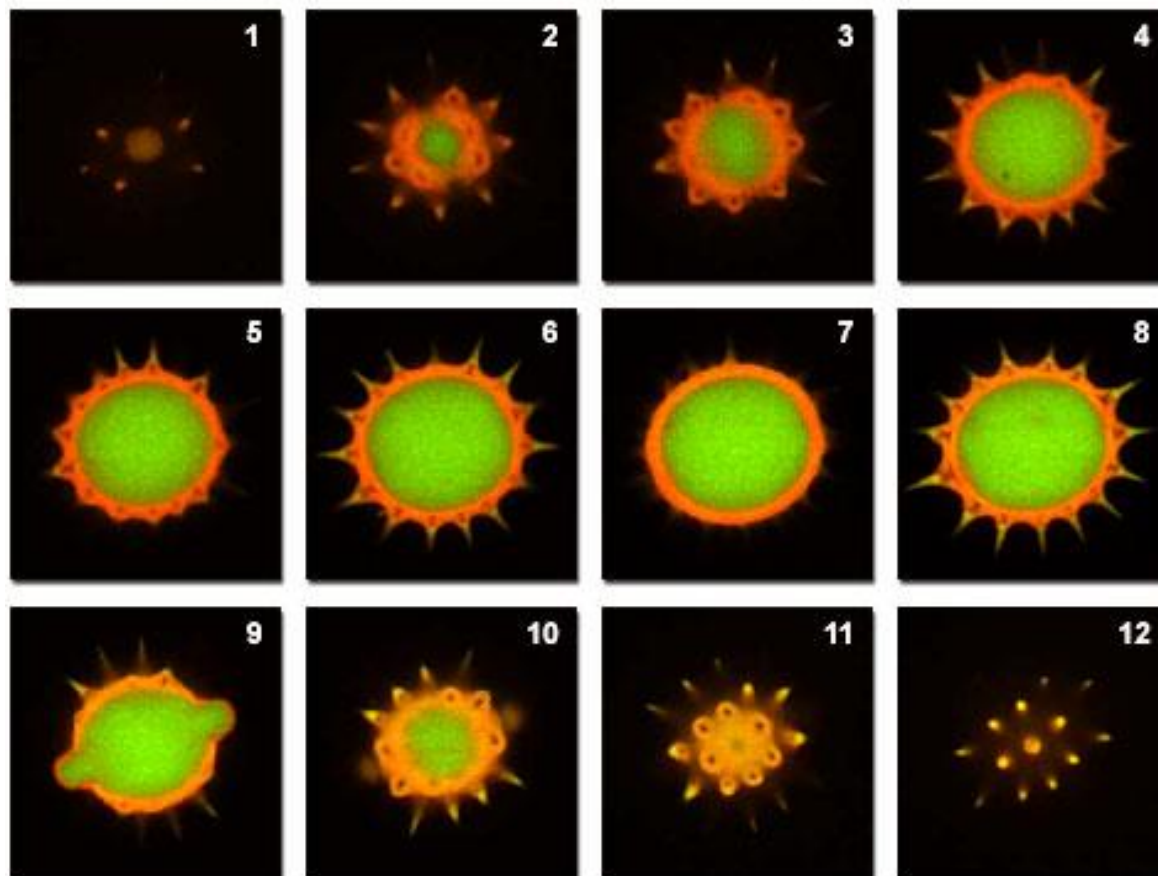
APD: Avalanche Photodiode
(Lavinenphotodiode)



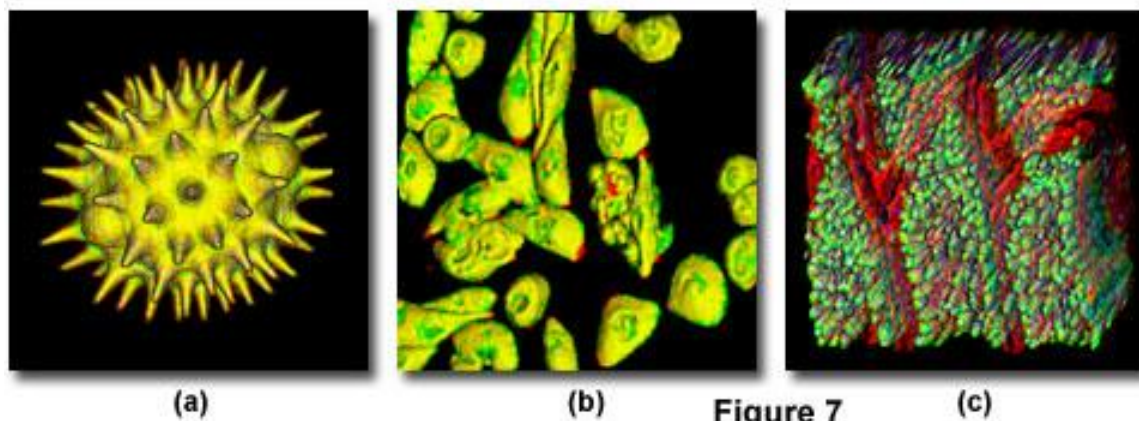
Vervielfachung
(„sekundäre Ionisation“)



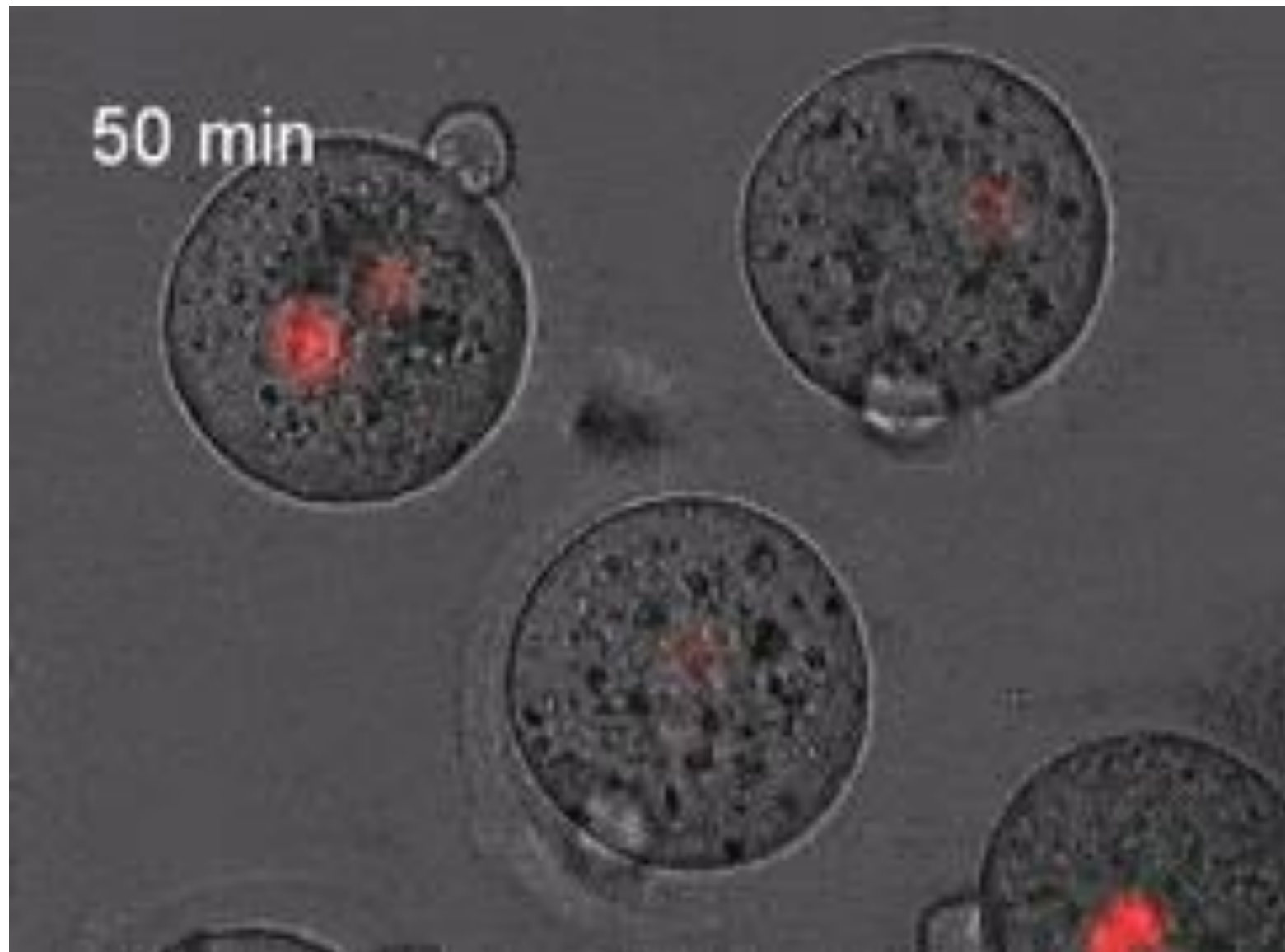
Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy

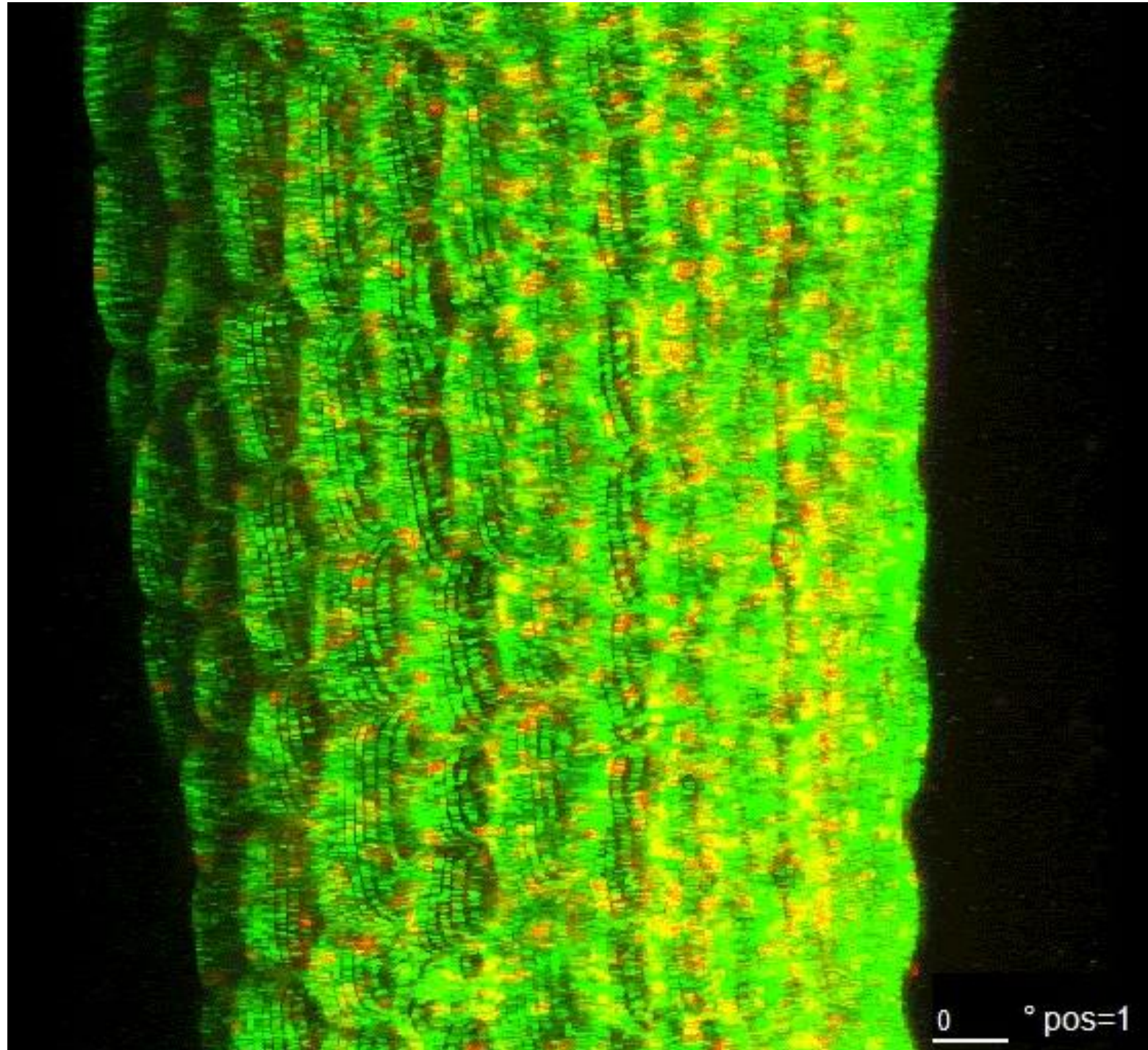


Three-Dimensional Volume Renders from Confocal Optical Sections



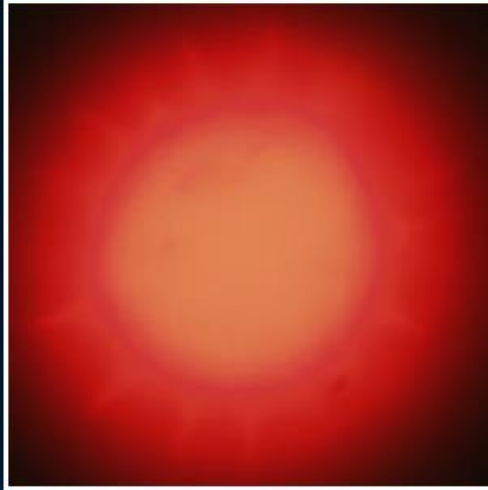
50 min



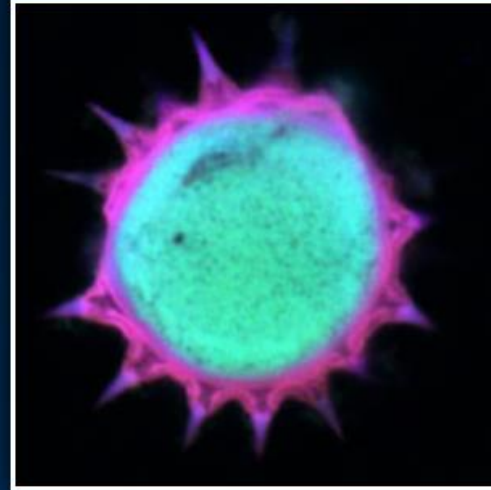


Comparing Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy

Widefield Image



Confocal Image



Red: 25%



Green: 25%



Blue: 25%



Magnification:

100X

Specimen Set:

Specimen Set 1

Specimen Set 2

Specimen Set 3

Lock Button



Focus



Brightness



Z-Axis Position



Choose A Specimen

Pollen Grain

Pinhole Aperture Size:

Small Medium Large

Scan Line Speed: Medium



Spectral Overlap in Paired Alexa Fluor Probes

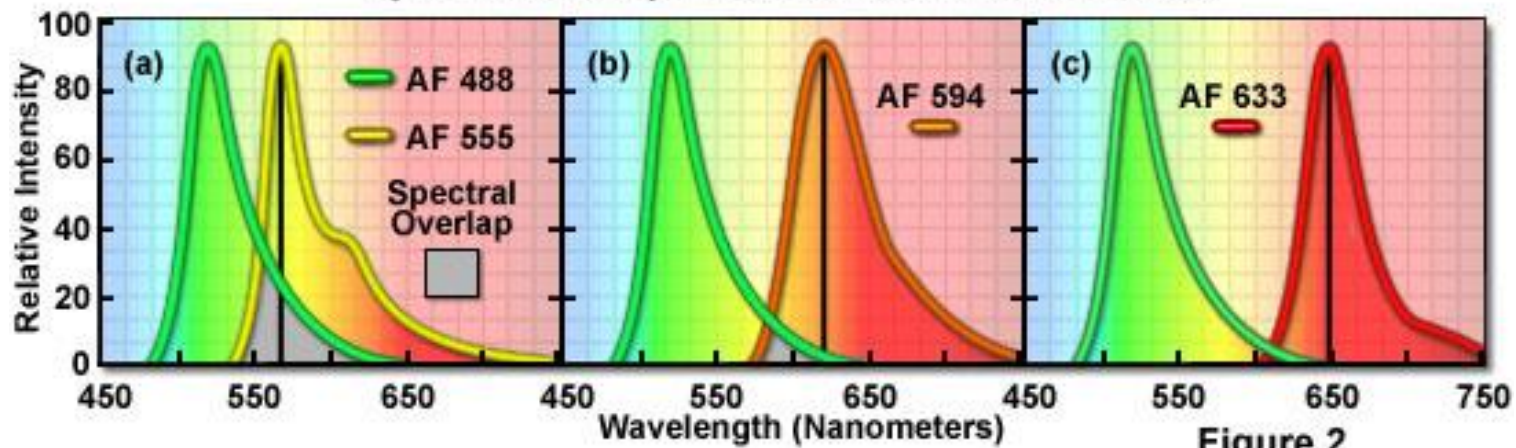


Figure 2

Fluorophore Emission Bleed-Through in Confocal Microscopy

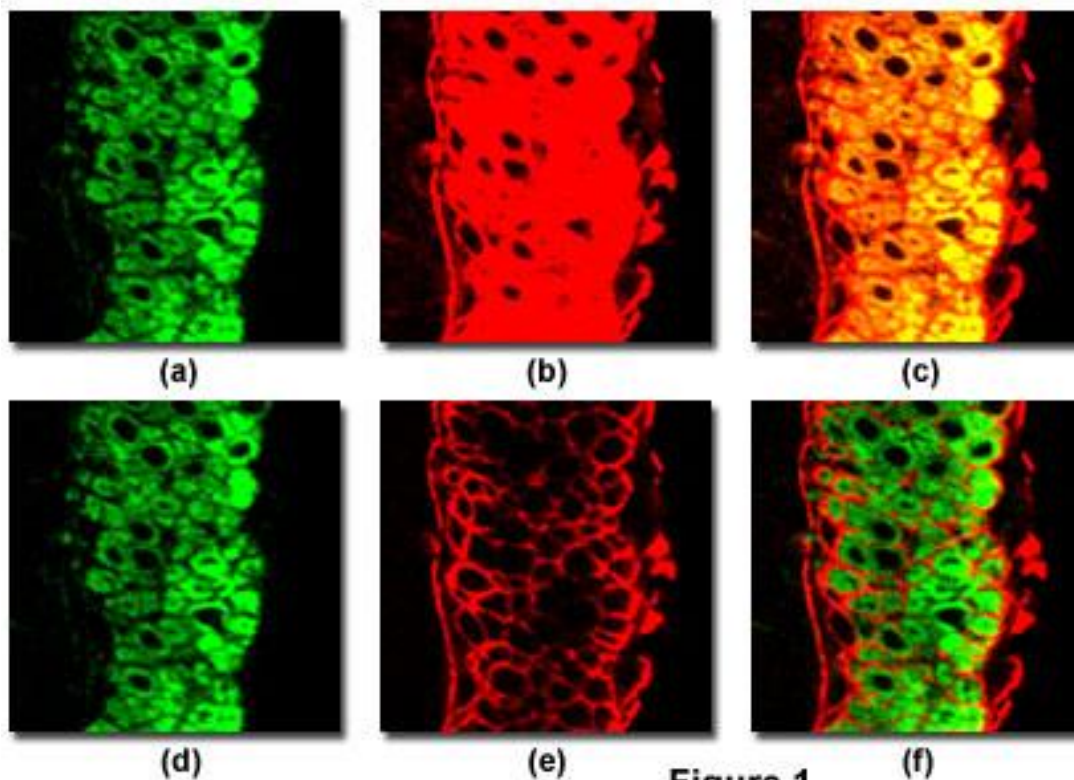
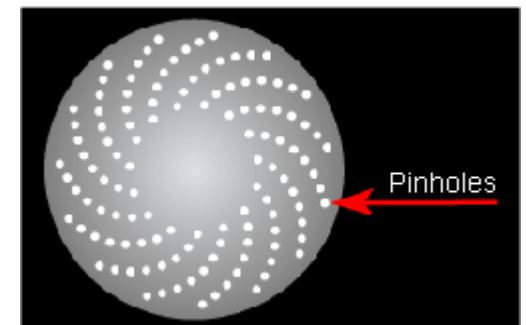
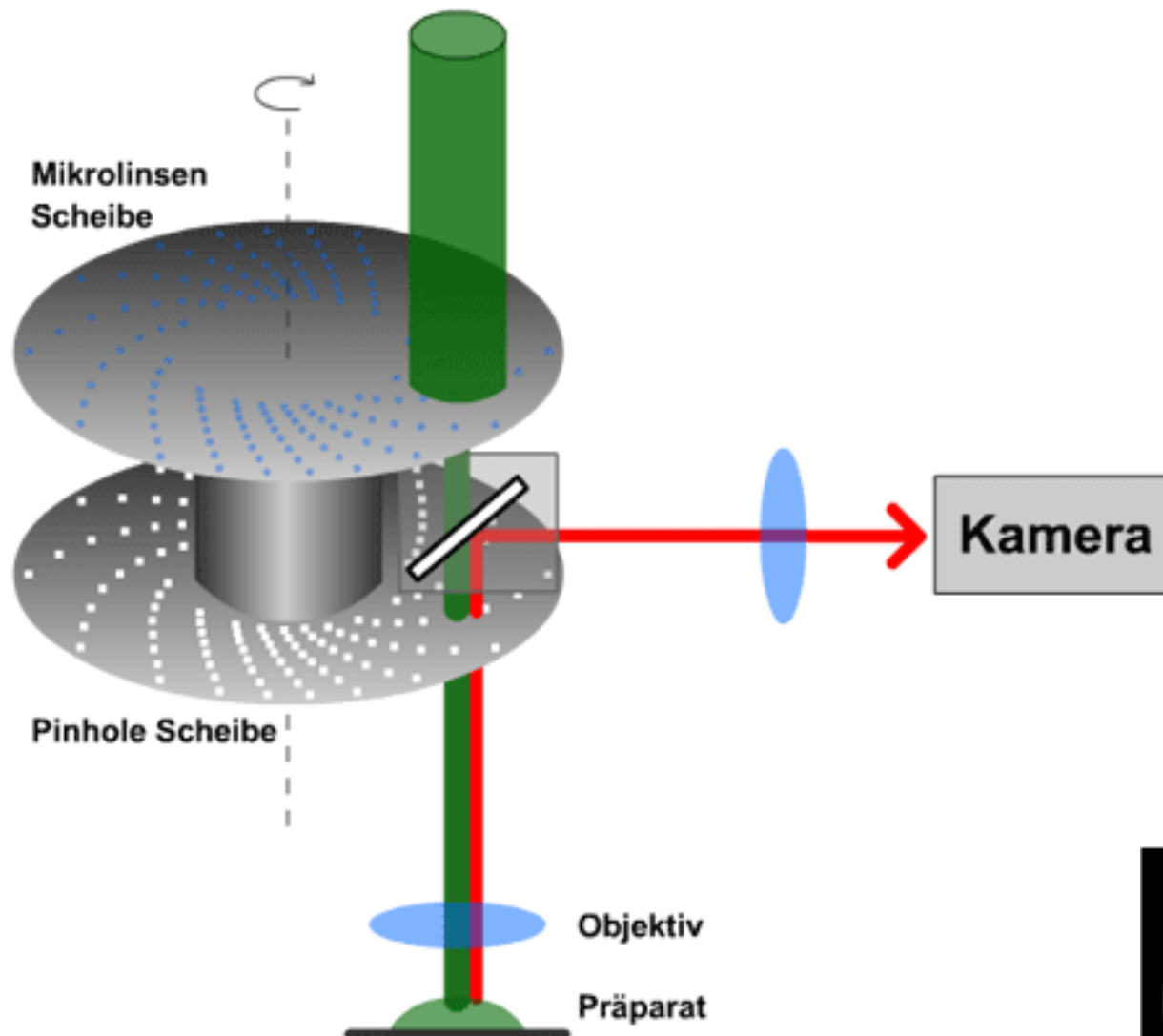
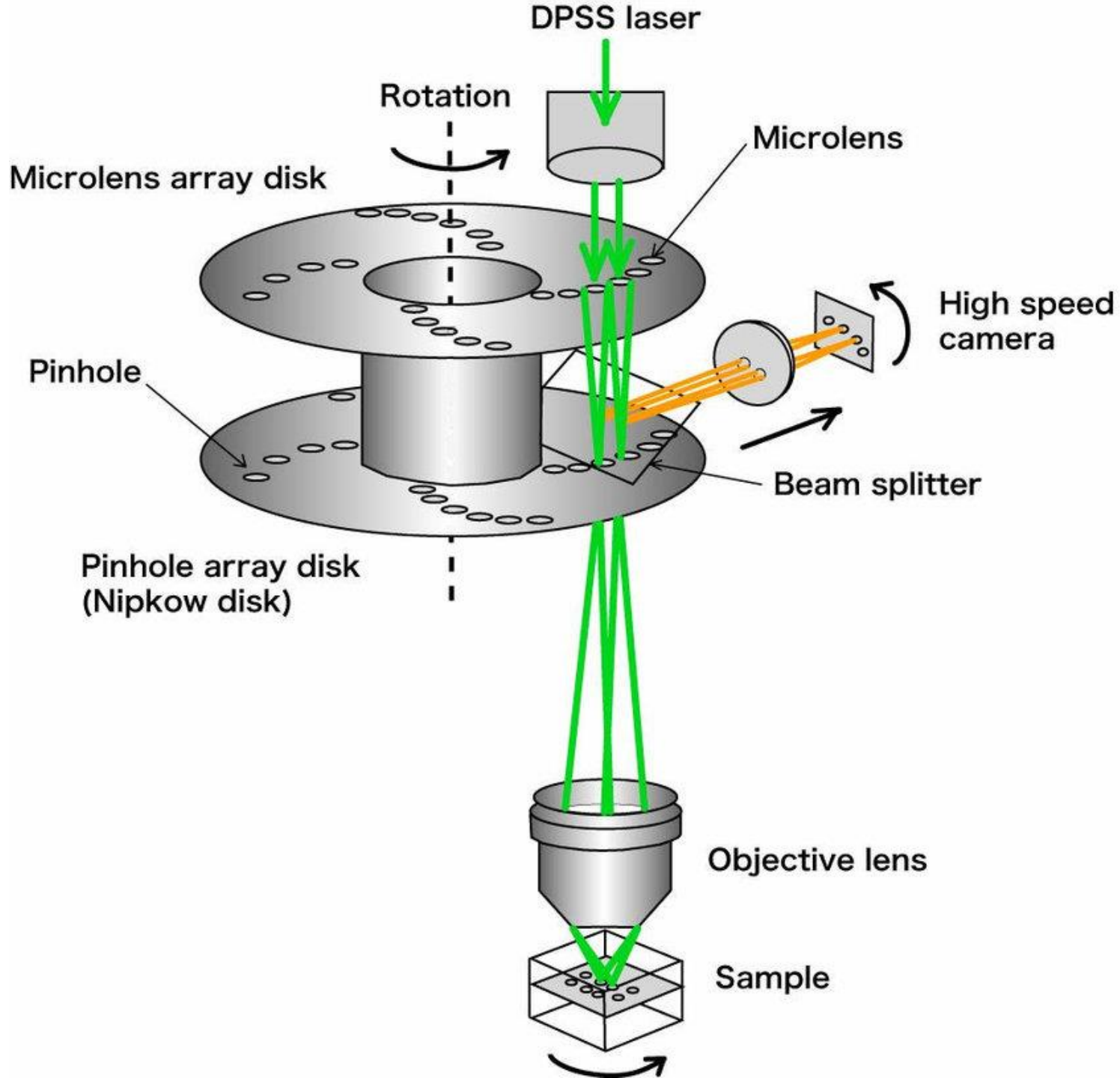


Figure 1

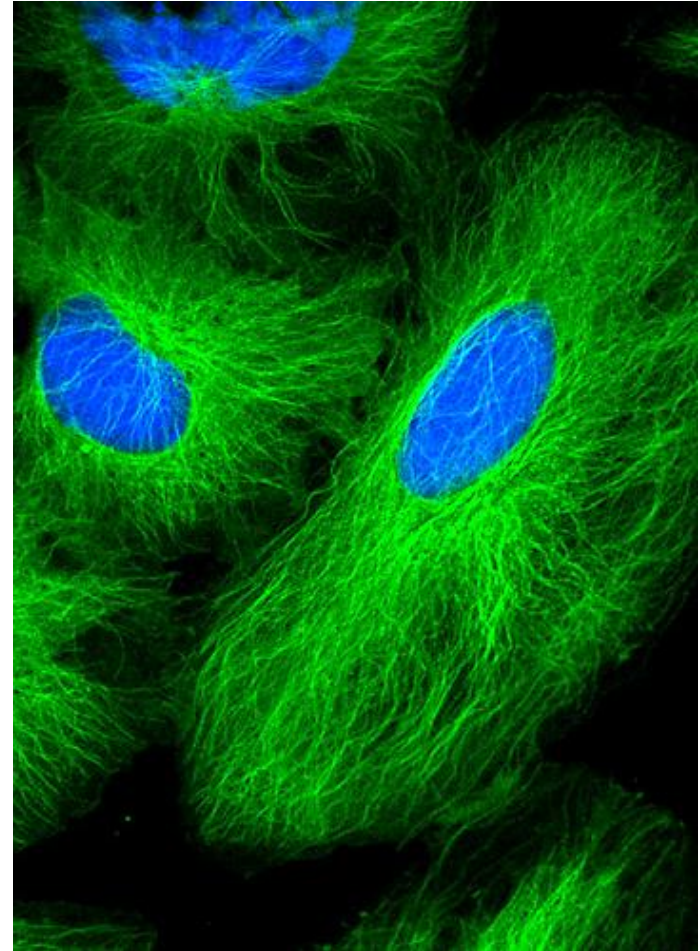


Nipkow-Disk



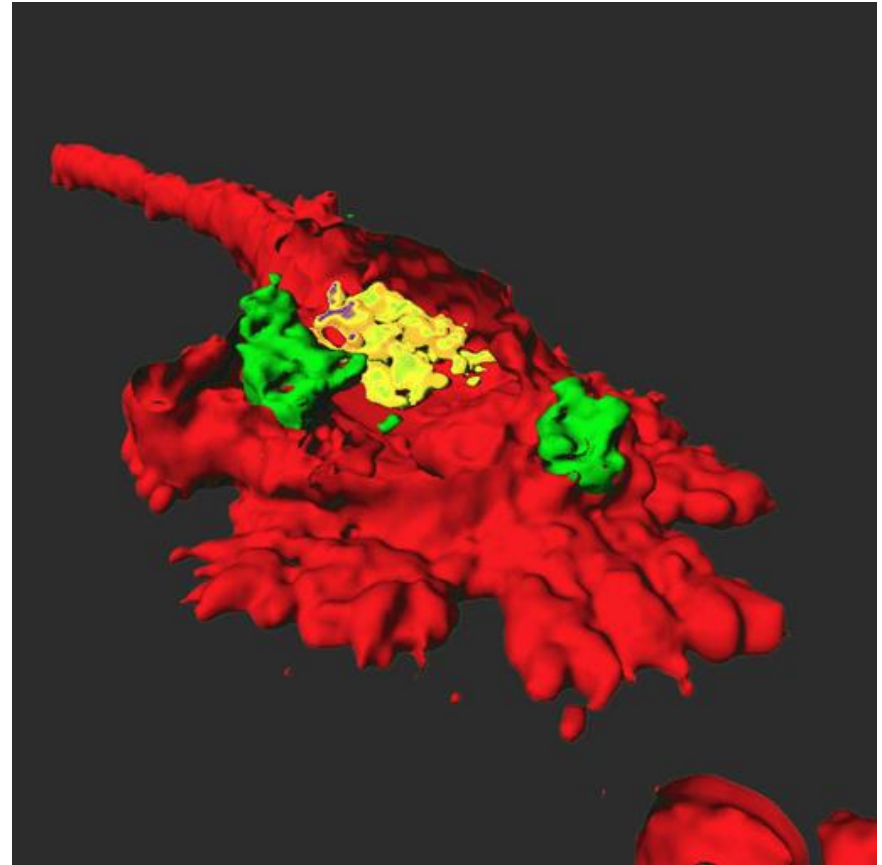
Konfokales Mikroskop

Aus Tubulin bestehende
Mikrotubuli in Zellen

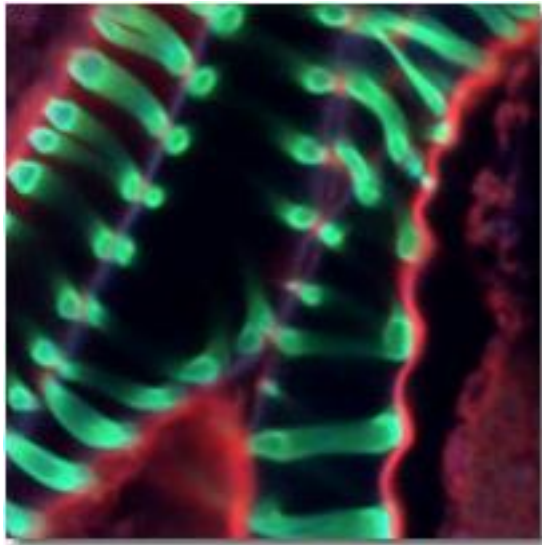
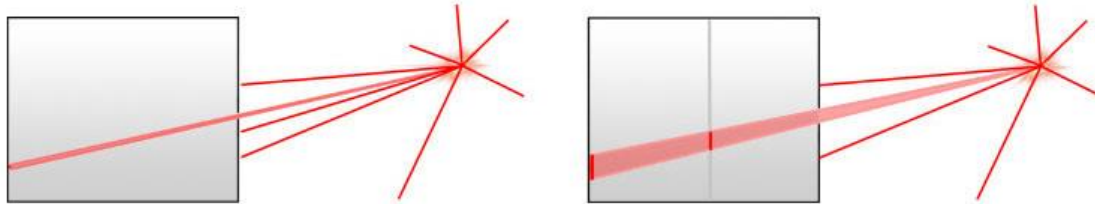


Konfokales Mikroskop

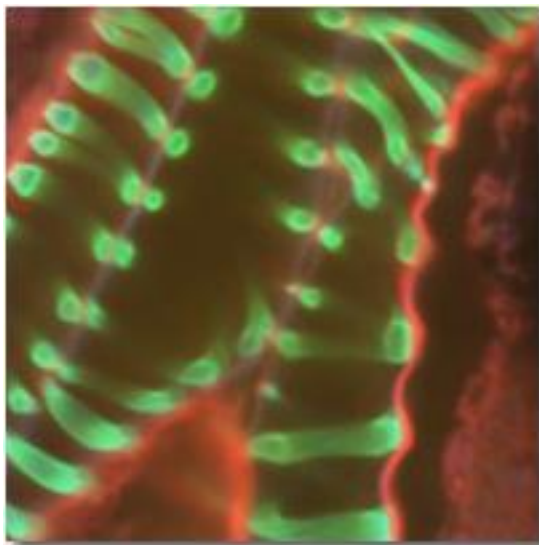
Dendritische Zelle mit
Pollenteilchen.
3D Aufnahme mit konfokalem
Mikroskop.



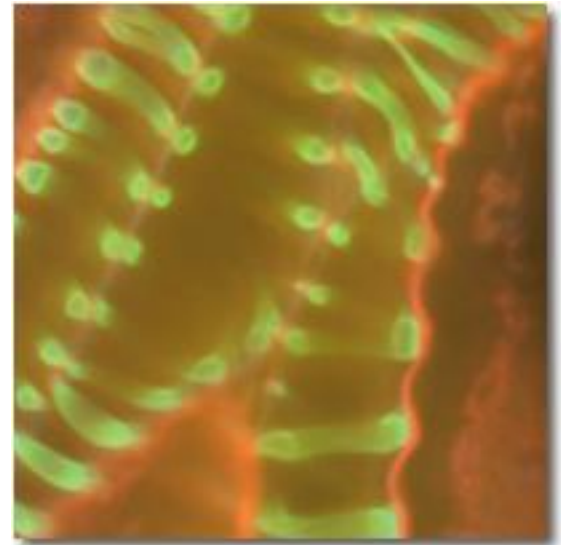
Lochblendengrösse (pinhole size)



1 Airy-Einheit



4 Airy-Einheiten



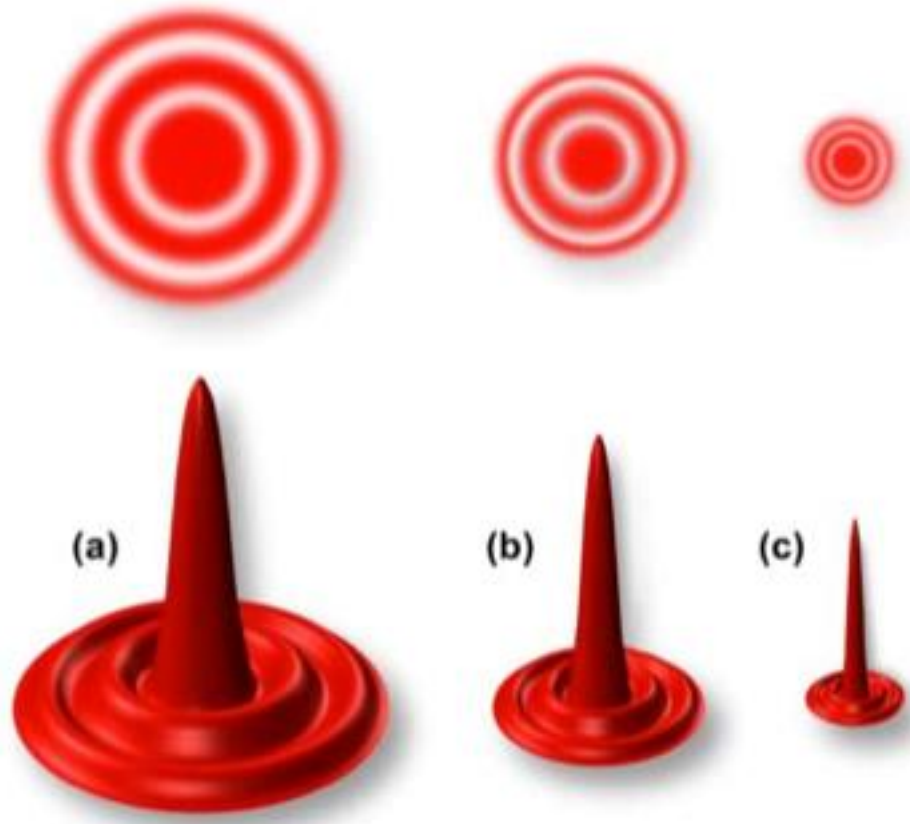
20 Airy-Einheiten

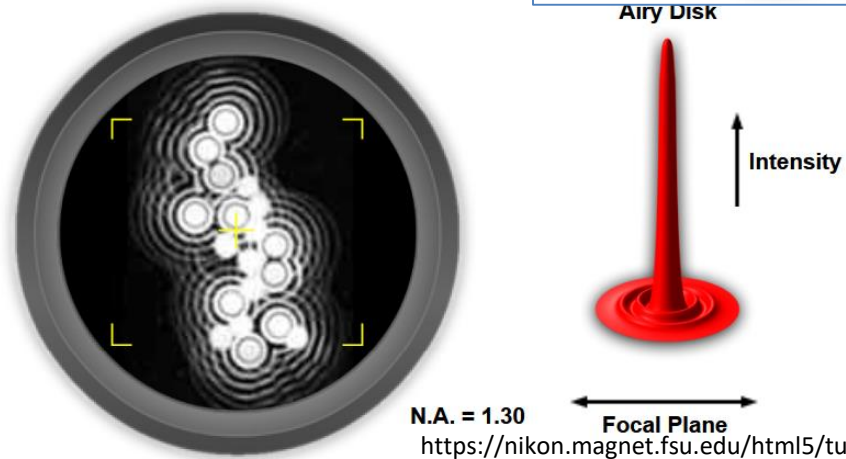
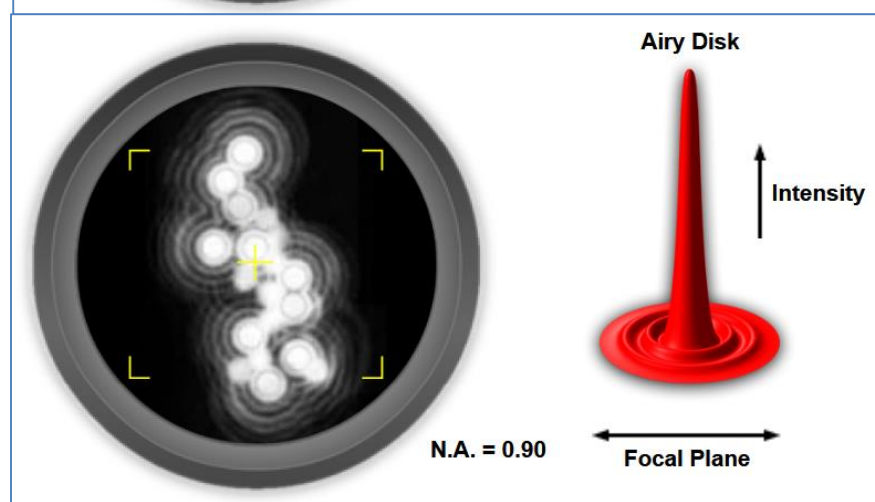
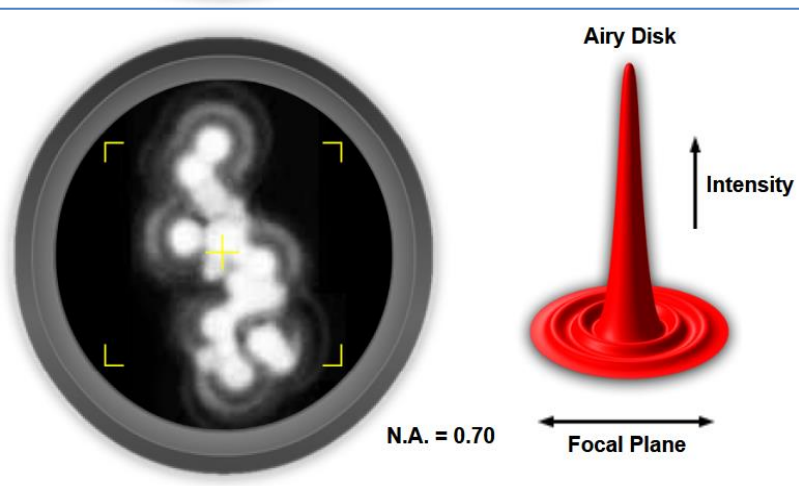
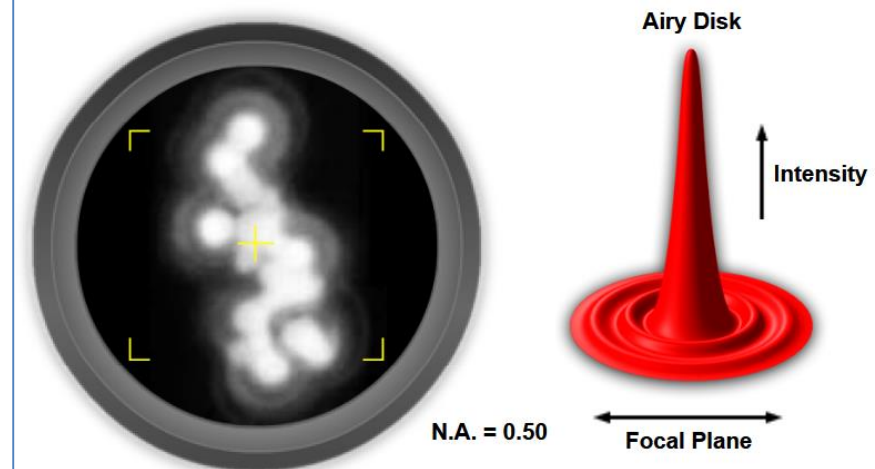
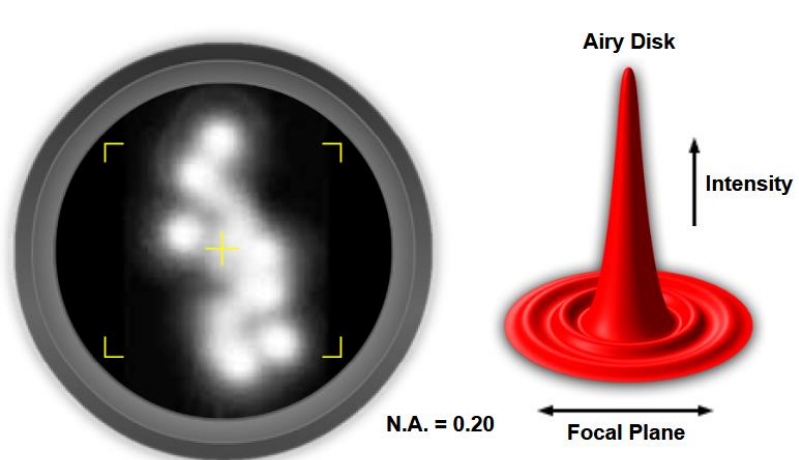
Airy-Einheit

$$1AE = \frac{1.22 \cdot \lambda}{NA}$$

Die Numerische Appertur beeinflusst die Scheibengrösse:

$$\Delta r_E = \frac{1.22 \cdot \lambda}{NA}$$



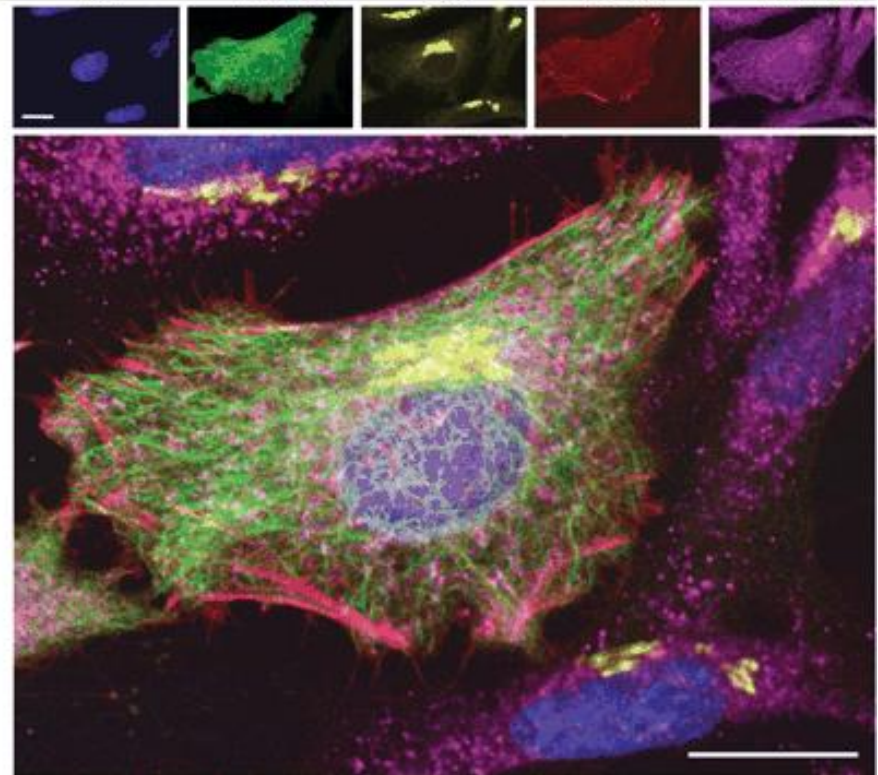


Gleichzeitige Anwendung von mehreren fluoreszierenden Markierungen

He-La Zellen markiert mit fünf unterschiedlichen Fluoreszenzmethoden.

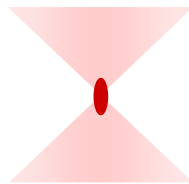
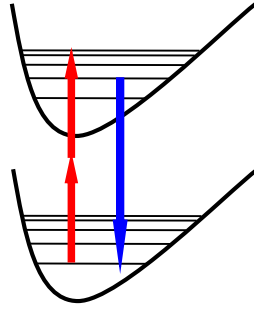
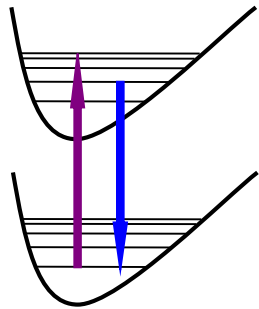
Der Masstab ist 20 μm .

| | | | | | |
|------------------|-----------------|-------------------|---------|----------------|--------------|
| Excitation (nm): | 800 (2 photon) | 488 | 432 | 568 | 637 |
| Emission (nm): | 410-490 | 500-530 | 555-565 | 580-620 | >660 |
| Fluorophore: | Hoechst | GFP | QD565 | ReAsH | Cy5 |
| Targeting: | direct affinity | genetic | immuno | genetic | immuno |
| Target: | DNA | α -tubulin | giantin | β -actin | Cytochrome c |
| Structure: | nuclei | microtubules | golgi | stress fibers | mitochondria |

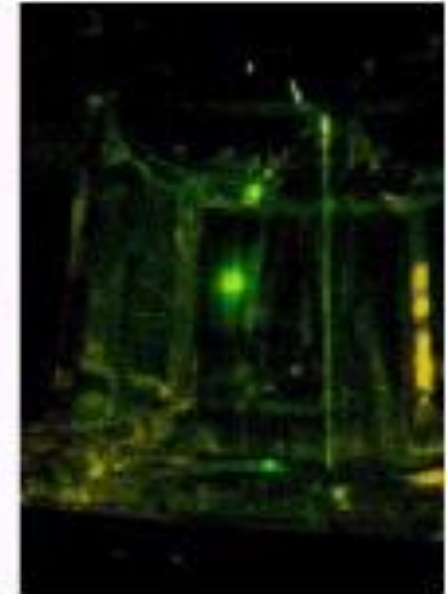


Fluoreszenzanregung mit zwei Photonen

Zweiphotonenmikroskop



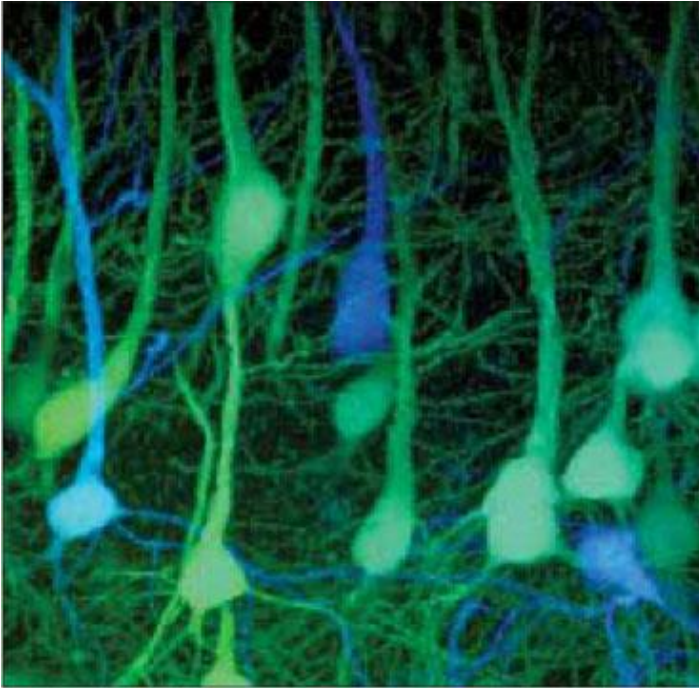
IR Laser



Fluoreszenzmission bei
Einphoton- und
Zweiphotonenanregung.

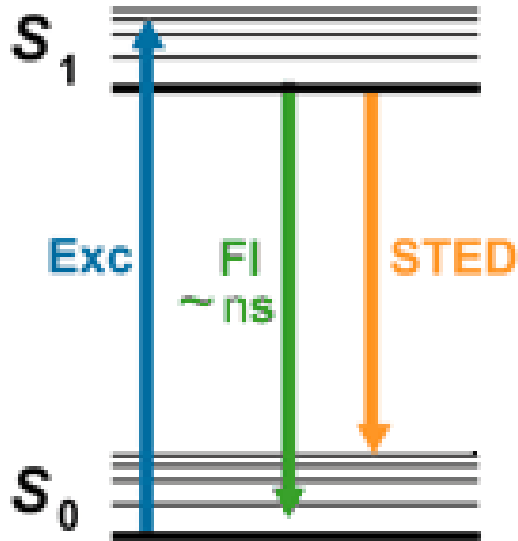
Auflösung!

Zweiphotonenmikroskopie

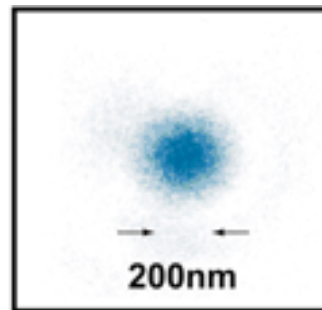


Visual Cortex von genetisch manipulierten Mause die GFP produzieren.

STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop

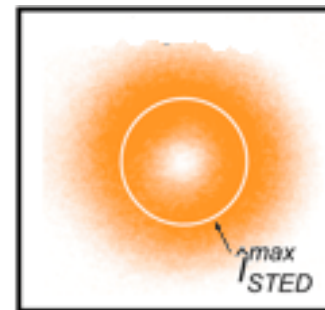


Stefan Hell (Nobelpreis 2014)



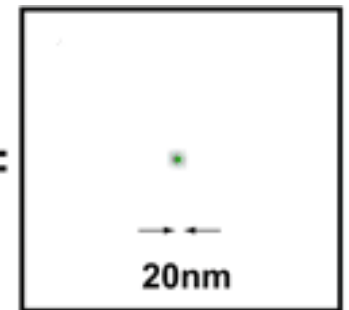
Anregung

+



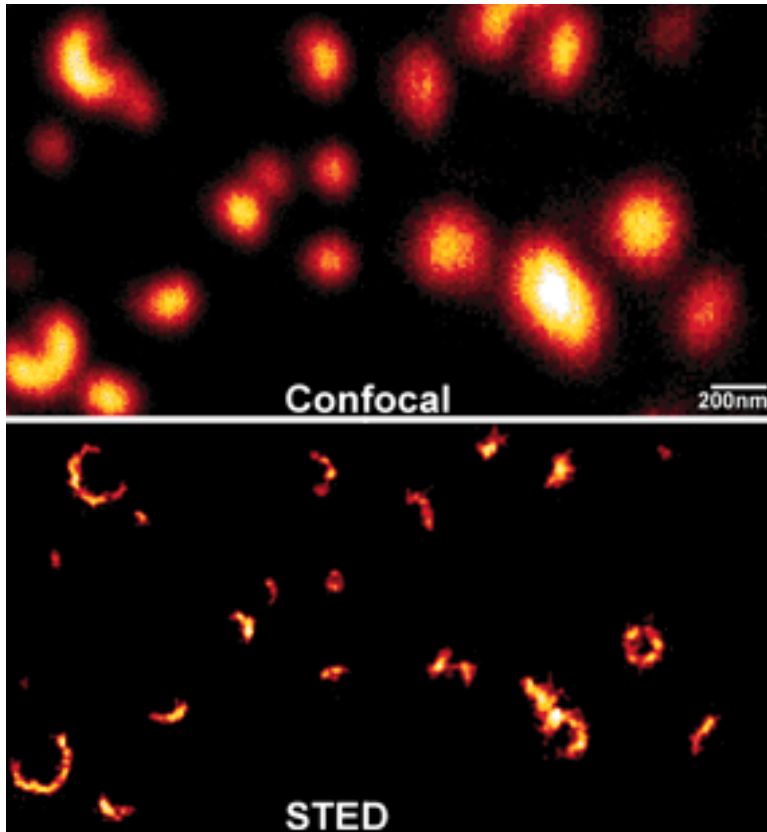
Auslöschung

=



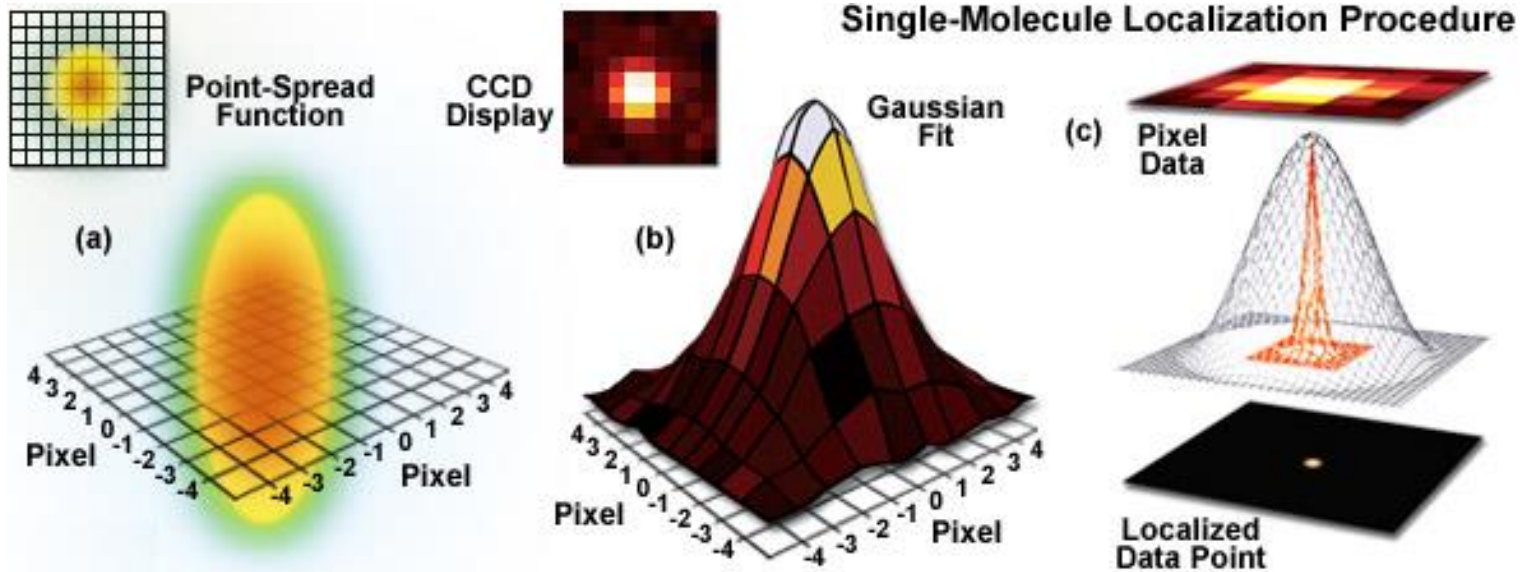
Lumineszenz nach dem Auslöschung

STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop

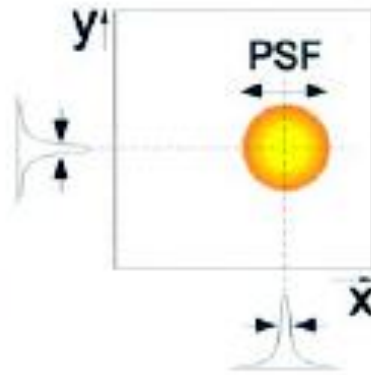
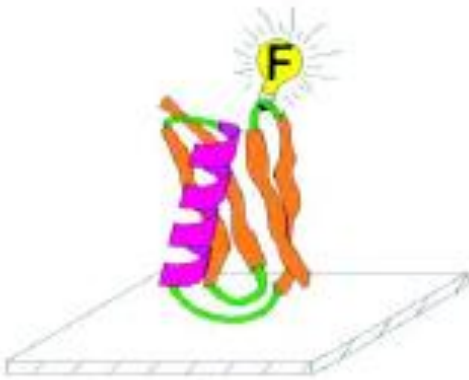


**Reorganization des
Synaptolysins in
synaptischen Vesikeln**

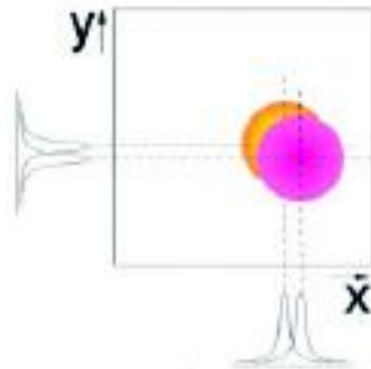
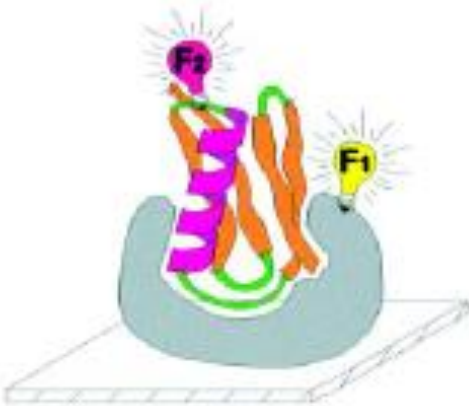
STED: Localization



STED: Lokalization und Kolokalisierung



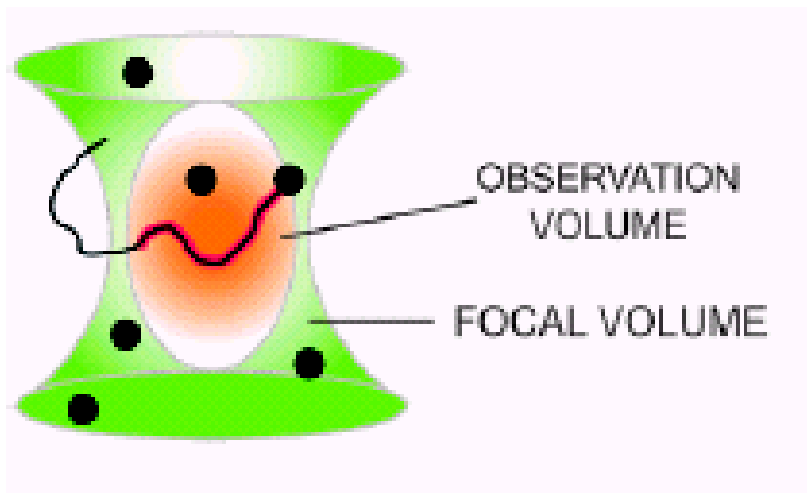
Die Position des Eiweisses kann mit nm Genauigkeit angenommen werden.



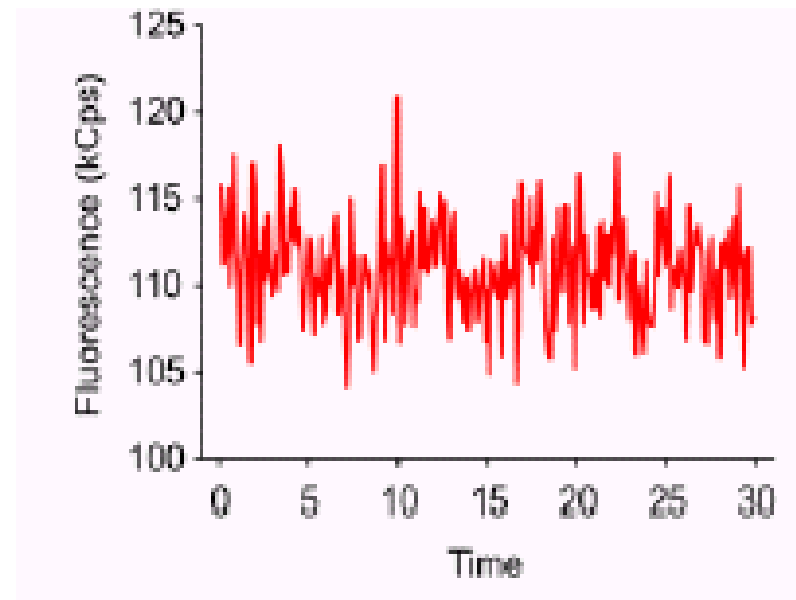
Kolokalization bedeutet nicht unbedingt eine Wechselwirkung!

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

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



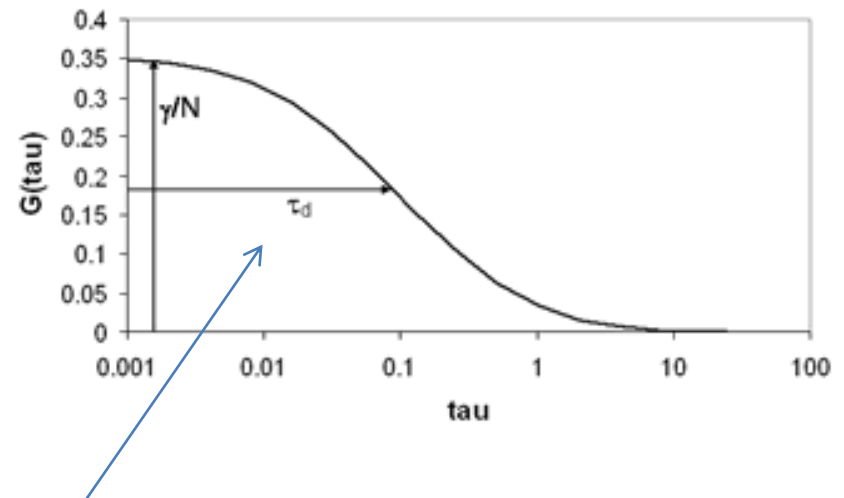
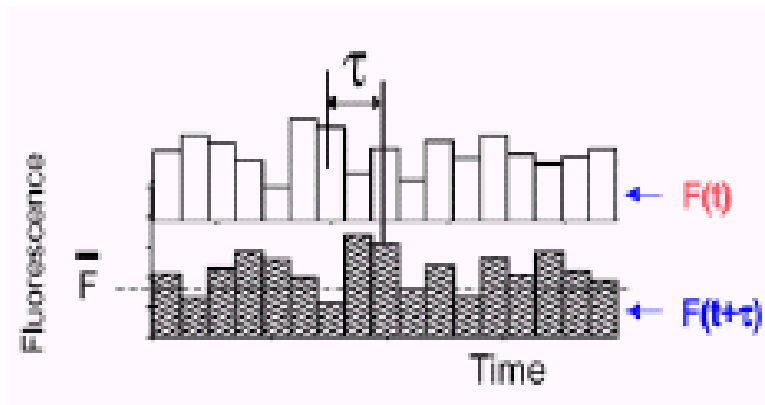
Fluktuationen des
Fluoreszenzlichtes:



Ähnlich zur dynamischen Lichtstreuung, aber mit Fluoreszenz

FCS: Autokorrelationsfunktion

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



τ_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

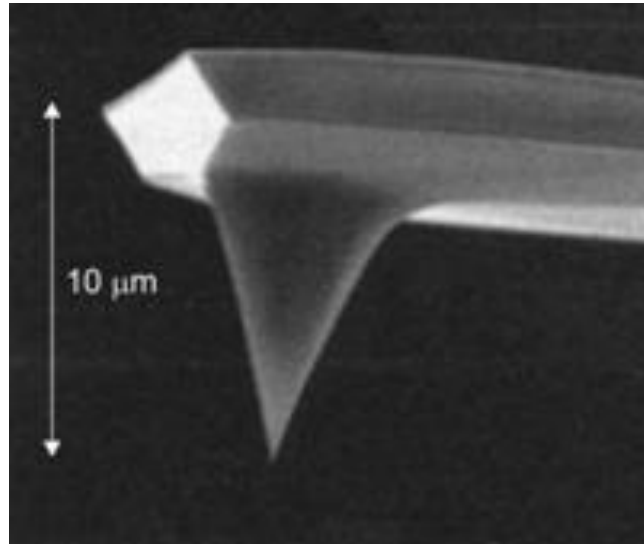
Konzentration

Reaktionsgeschwindigkeit

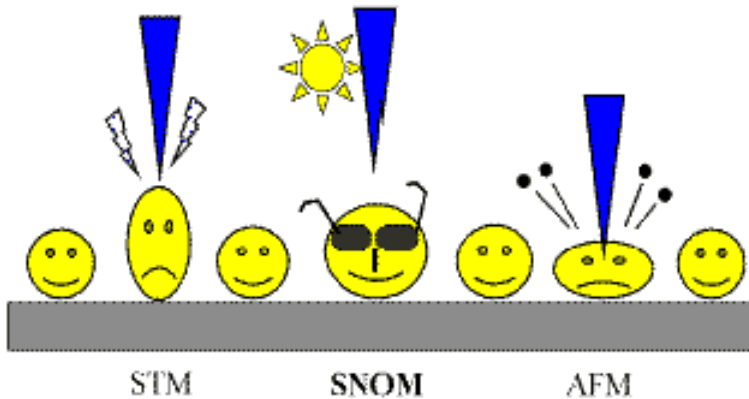
Diffusion in der Inneren der Zellen

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

RASTERSONDENMIKROSKOPE



Rastermikroskope (Scanning Probe Microscopes)



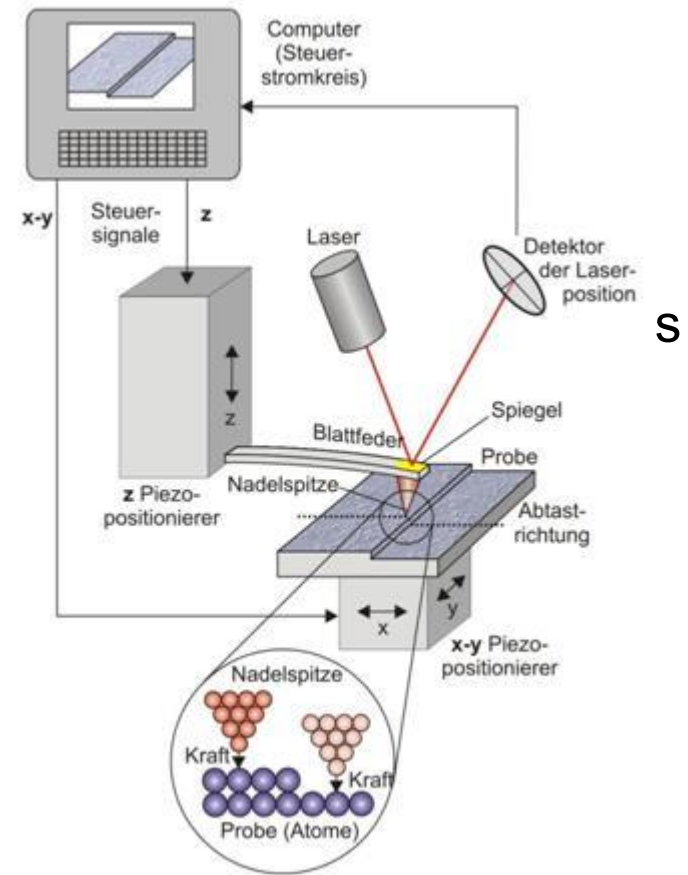
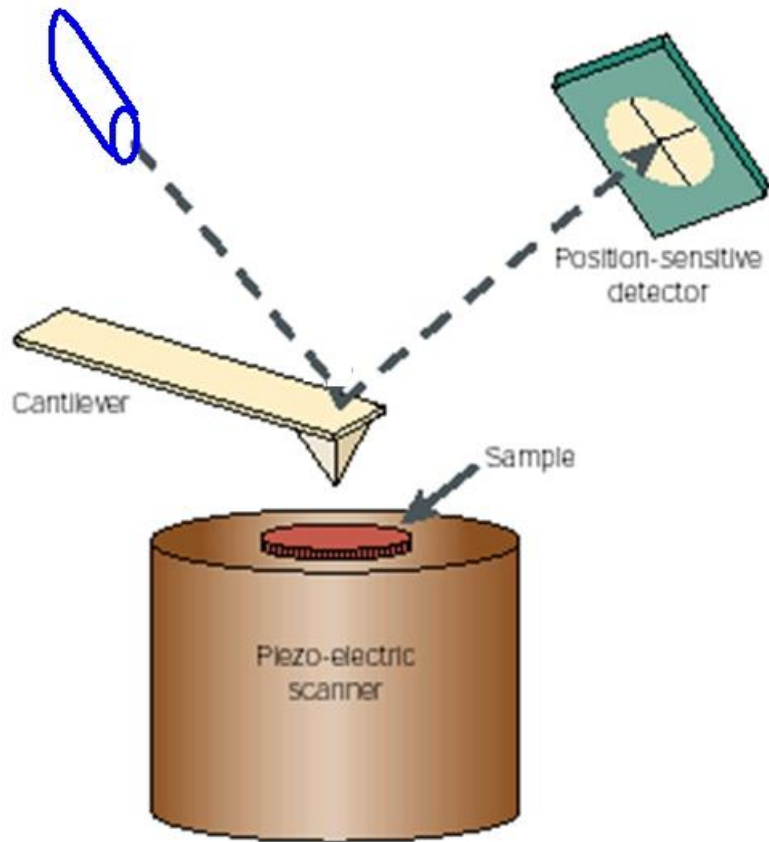
STM:
Scanning Tunneling Microscope
Rastertunnelmikroskop

SNOM:
Scanning Nearfield Optical Microscope

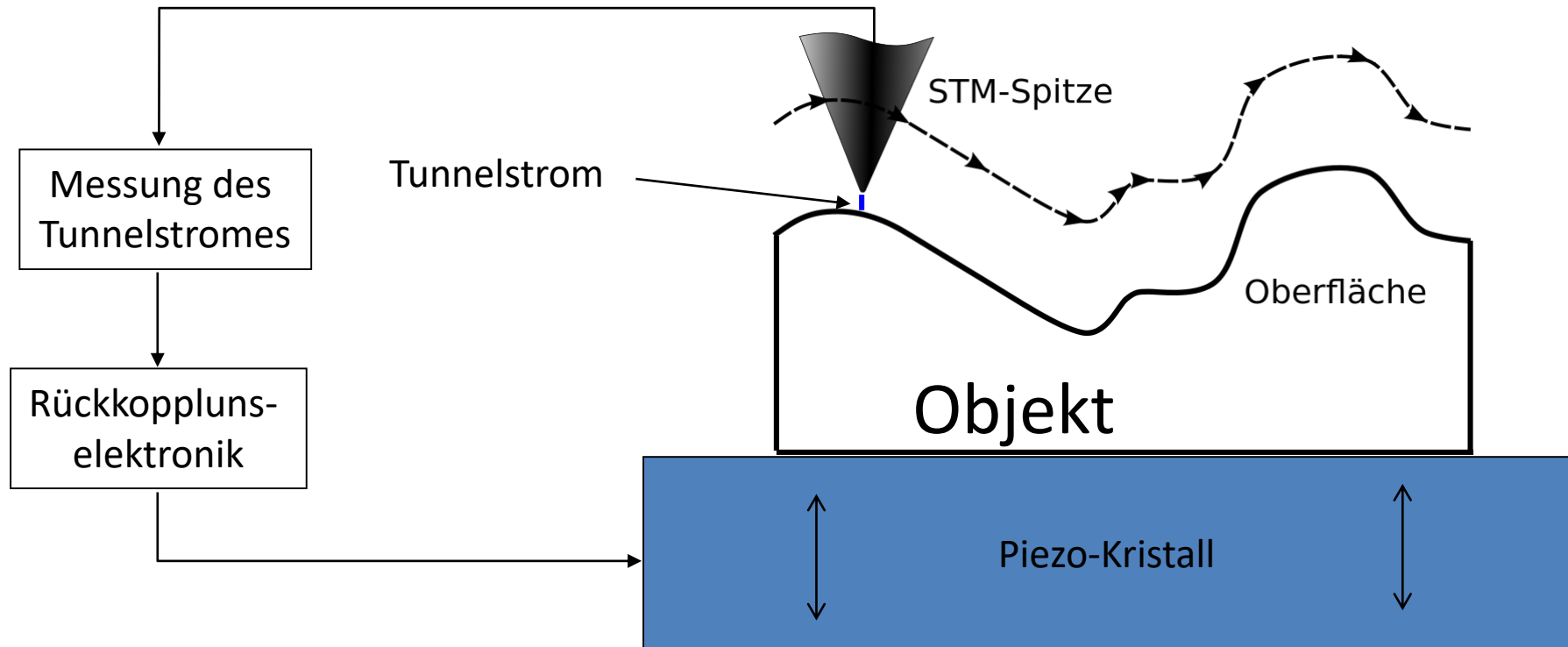
AFM:
Atomic Force Microscope
Rasterkraftmikroskop
(Atomkraftmikroskop)

Das Rastertunnelmikroskop wurde in 1981 von Heinrich Rohrer und Gerd K. Binnig entwickelt. Fünf Jahre später erhielten sie den Nobel-Preis.

Rasterkraftmikroskop (Atomkraftmikroskop) (Atomic Force Microscope-AFM)



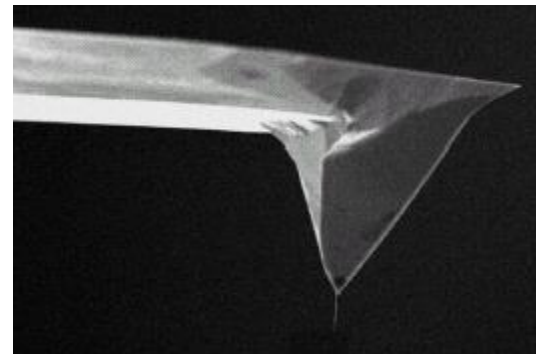
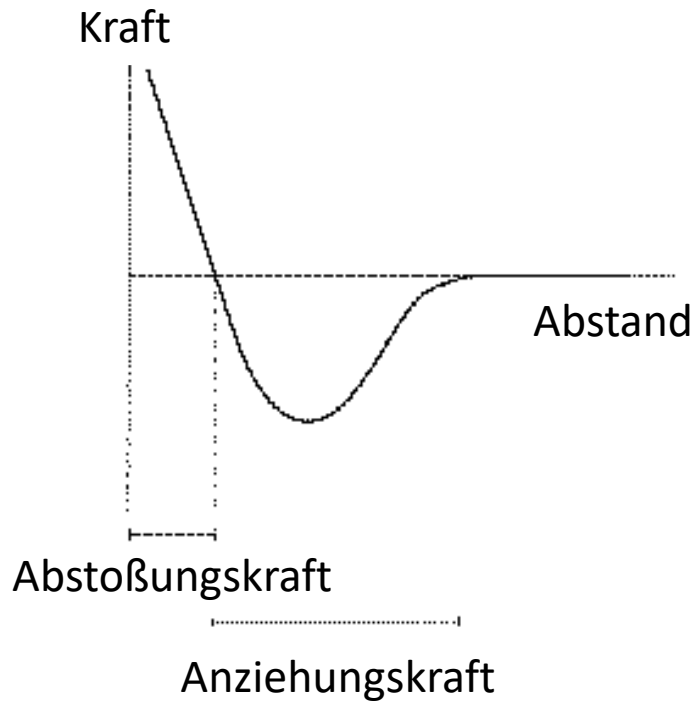
Rastertunnelmikroskop



Der Tunnelstrom ist konstant gehalten mit der vertikalen Bewegung des Objektes.

Die Kraft zwischen der Nadel und dem Objekt

- eine sehr spitze, nadelartige Sonde
- Krümmungsradius bei der Spitze $\approx 10\text{-}20\text{ nm}$ \Rightarrow x-y Auflösung!



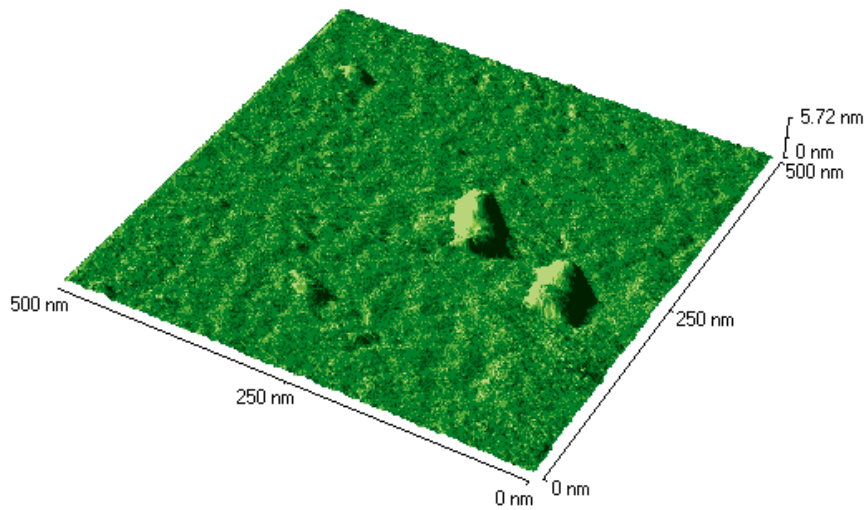
AFM Messmethoden



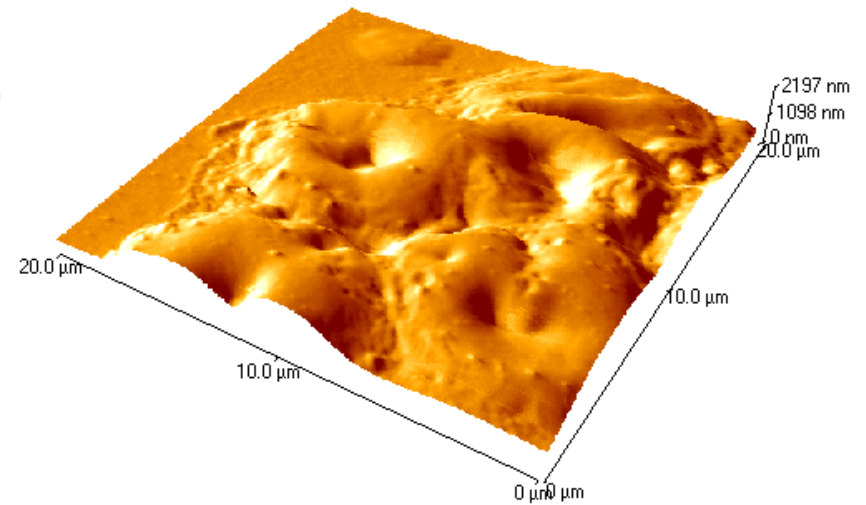
- Kontakt-Modus
- Der intermittierende Modus
(engl.: *intermittent contact mode*, oder *tapping mode* genannt)

AFM Aufnahmen

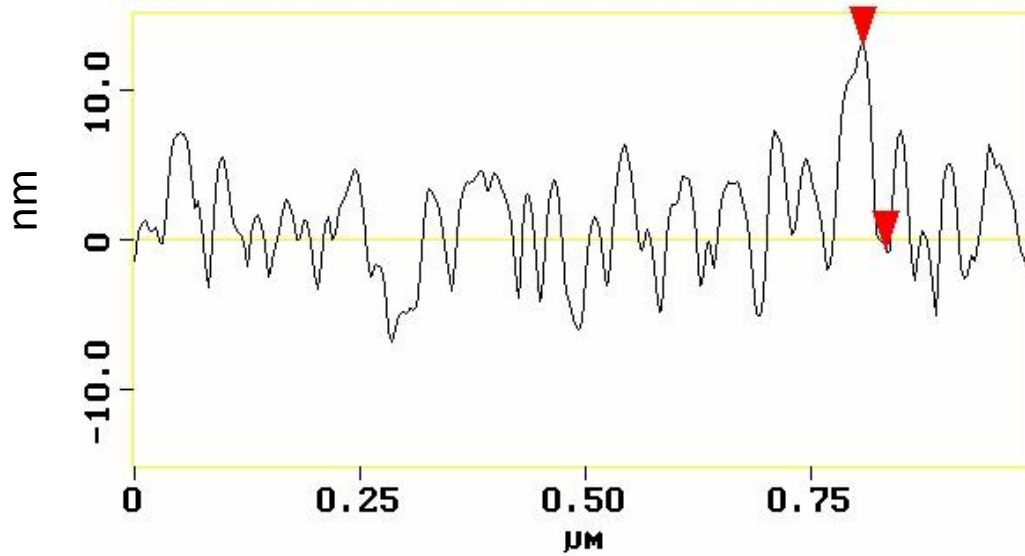
Hitzeschockproteine



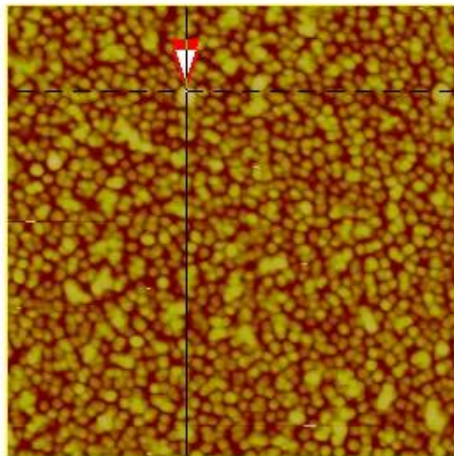
Rote blutzellen



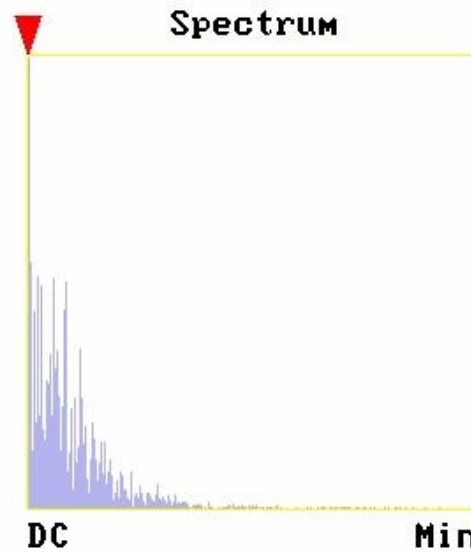
AFM Aufnahmen



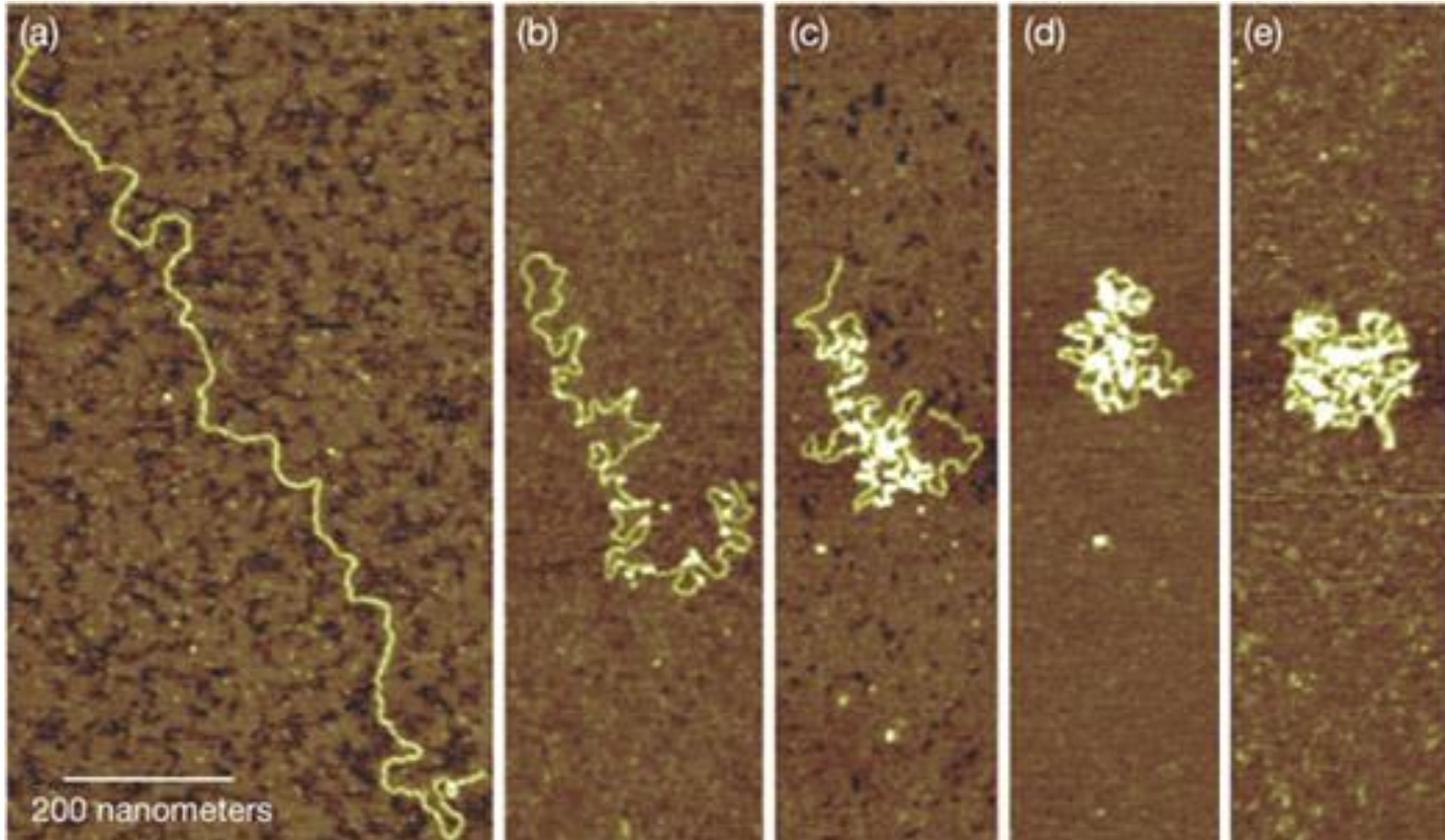
Alpha-Crystallin
Aggregate



acryins1.004



DNA



Progressive images from atomic force microscopy show the compaction of DNA caused by a protein called AbF2. (<https://www.llnl.gov/str/May04/DeYoreo.html>)

ELEKTRONENMIKROSKOPE

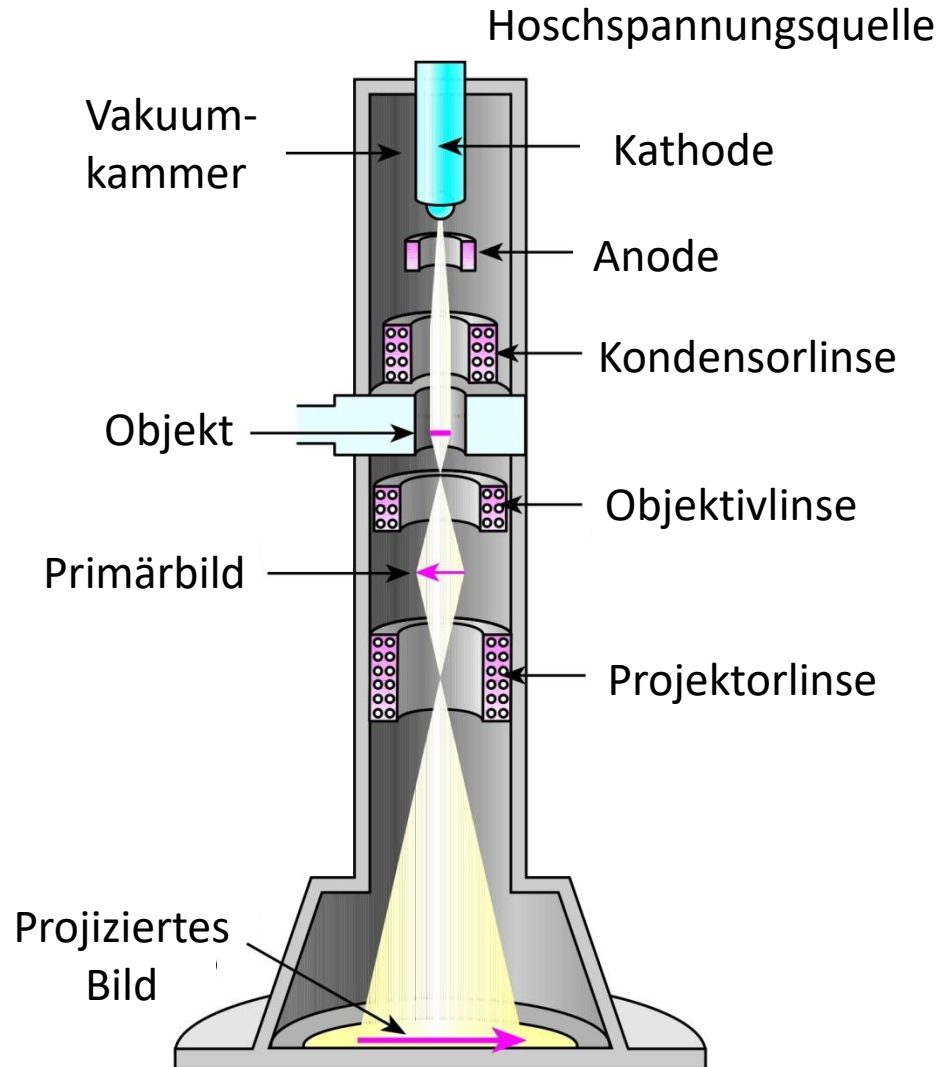
$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

Transmissionselektronenmikroskop

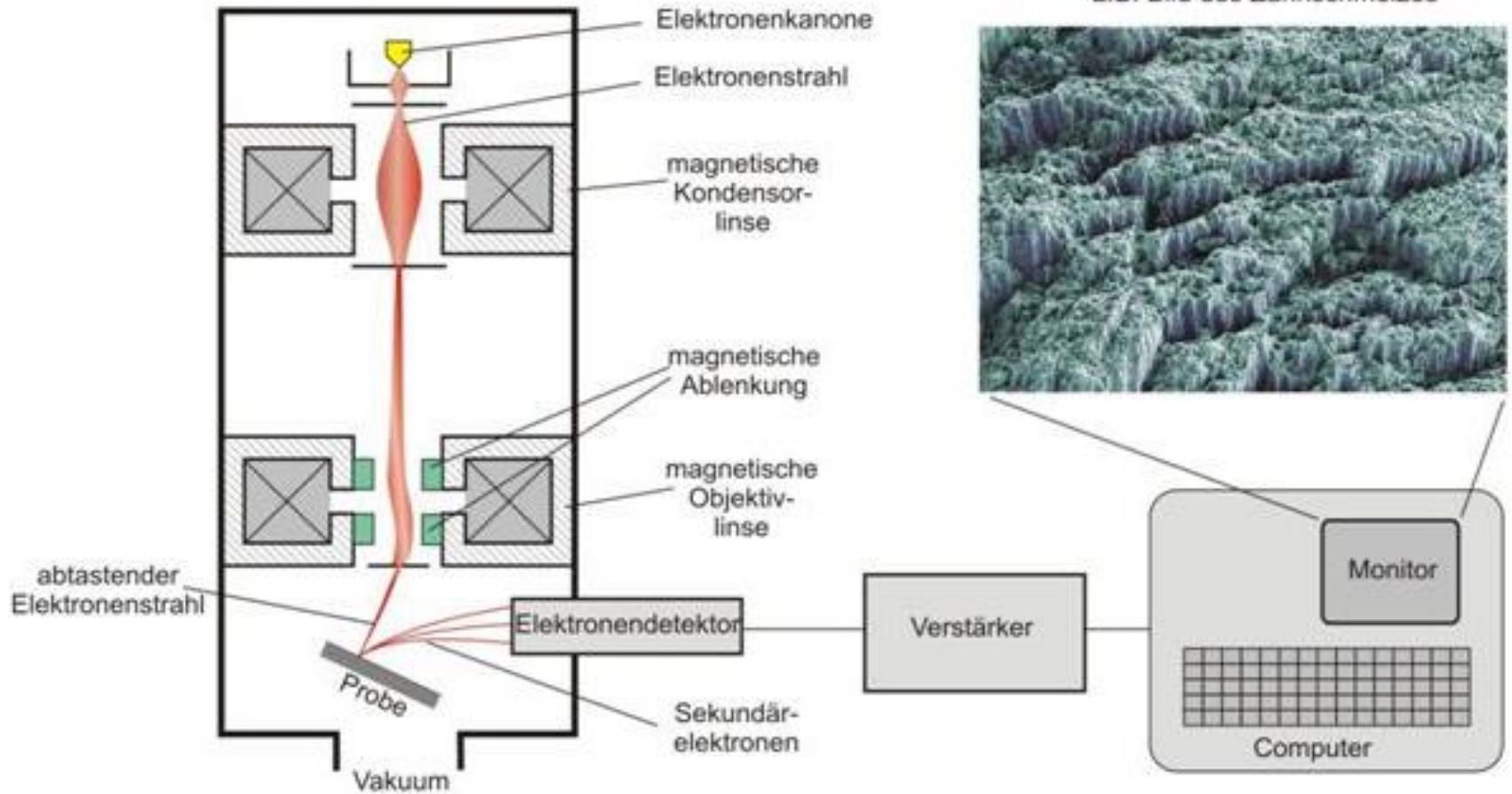
Rasterelektronenmikroskop

Materienwellen!

Transmissionselektronenmikroskop



Rasterelektronenmikroskop



Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops

Abbe'sches Prinzip und Materialwellen

Materialwelle: Zu einem Teilchen mit m Masse und v Geschwindigkeit, kann man eine Welle (Materienwelle)

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 λ 5 pm sein. Aber ω ist sehr klein! $NA \approx 0,002$

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

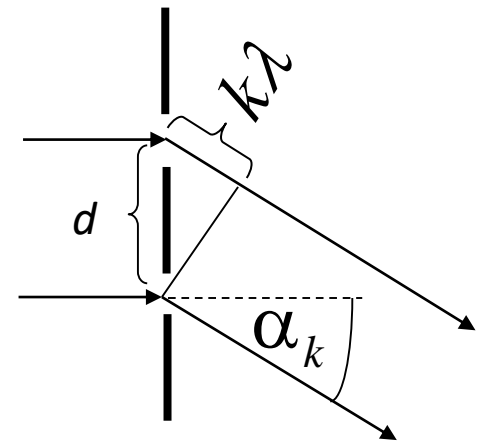
DIFFRAKTIONSMETHODE

Röntgendiffraktion

Anwendung der Röntgenstrahlung in Strukturanalyse der Materie.

Zur Erinnerung:
Diffraktion des Lichtes

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

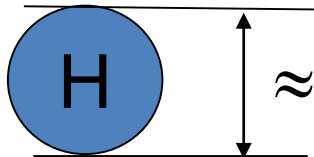


Röntgendiffraktion

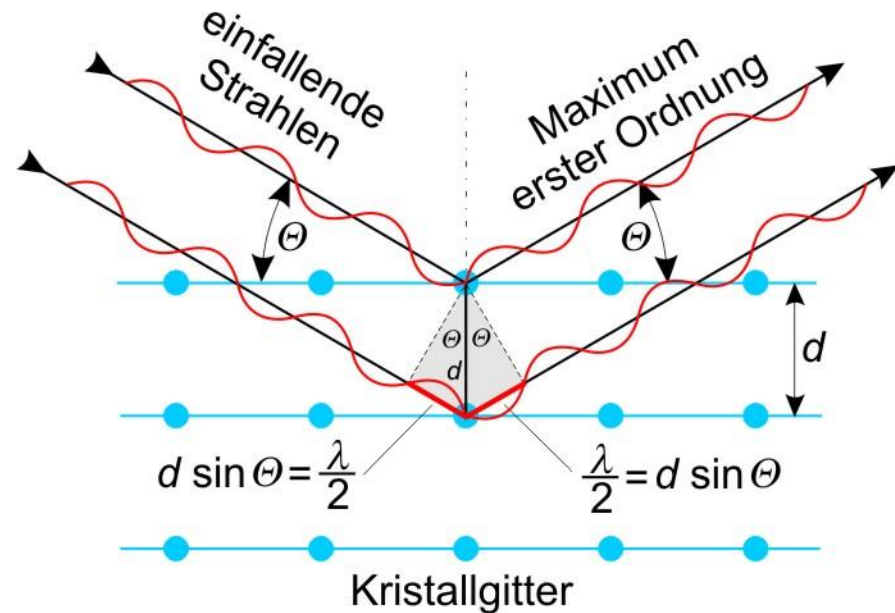
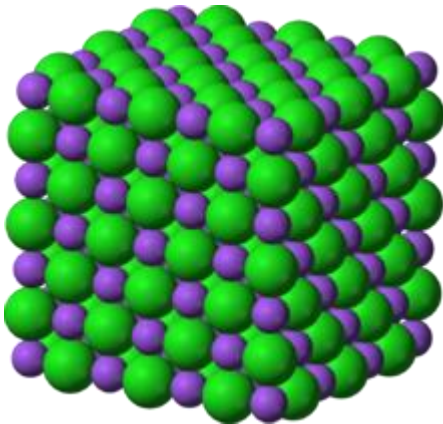
Was für ein Gitter passt zur Röntgenstrahlung?

$$\lambda \lesssim d$$

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



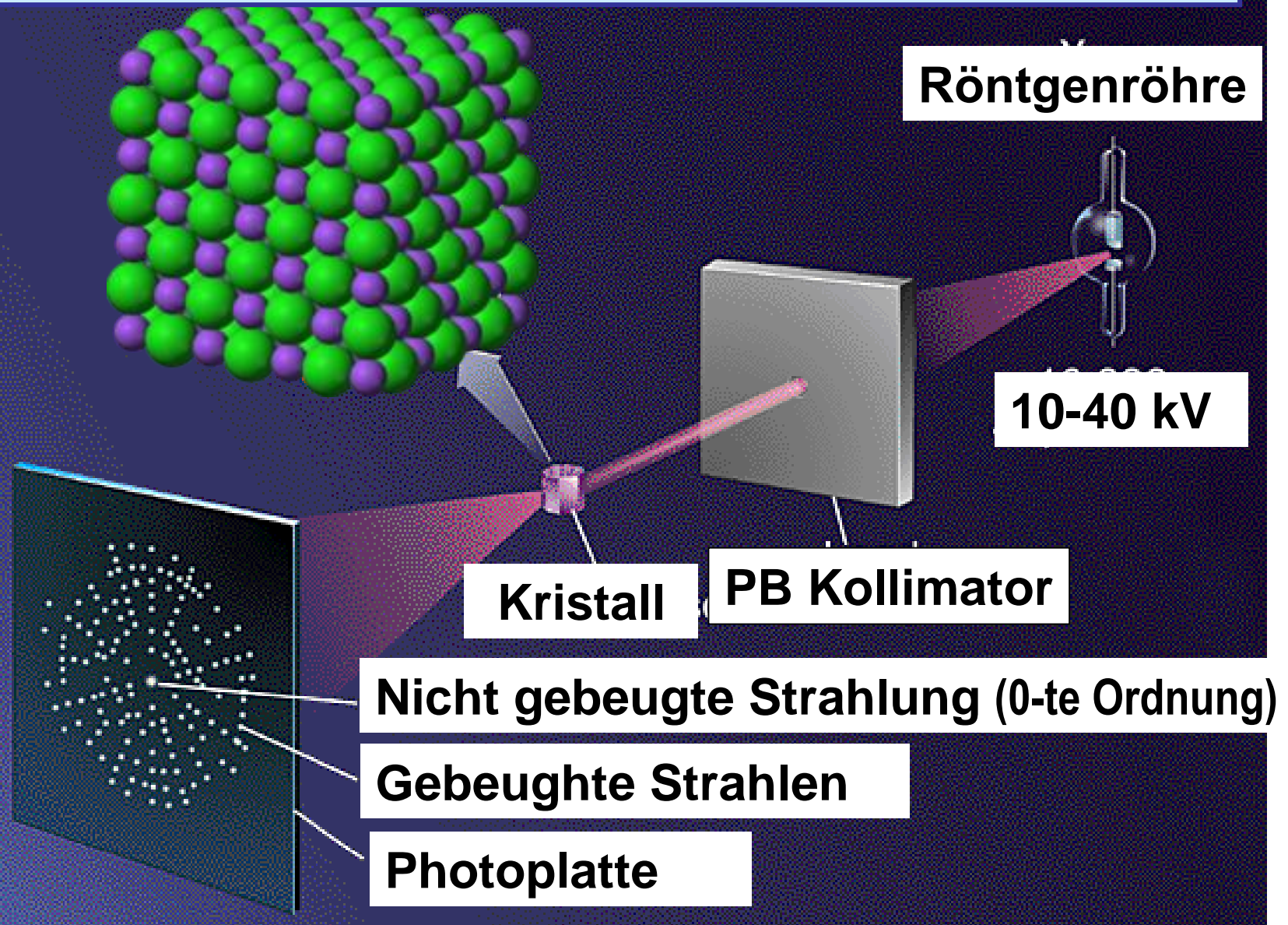
$\approx 100 \text{ pm}$

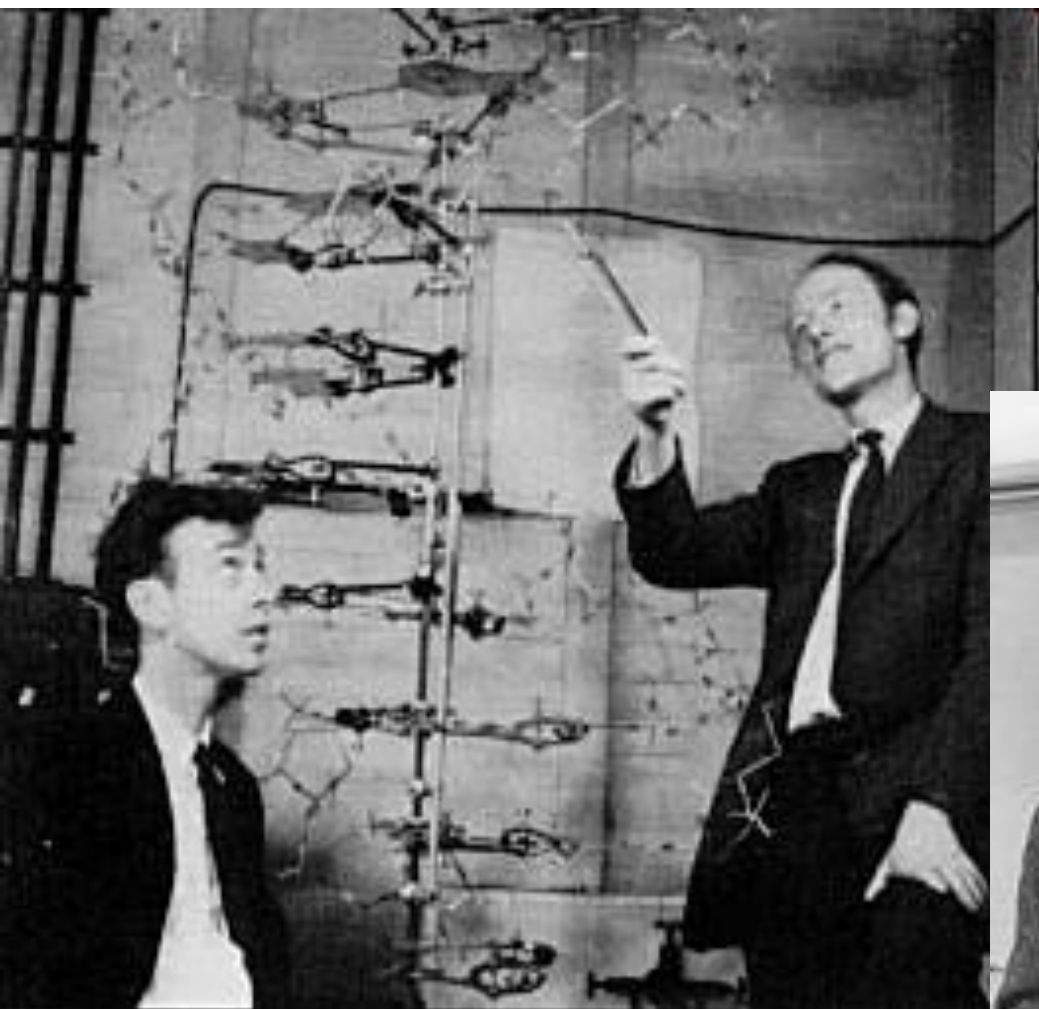


$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

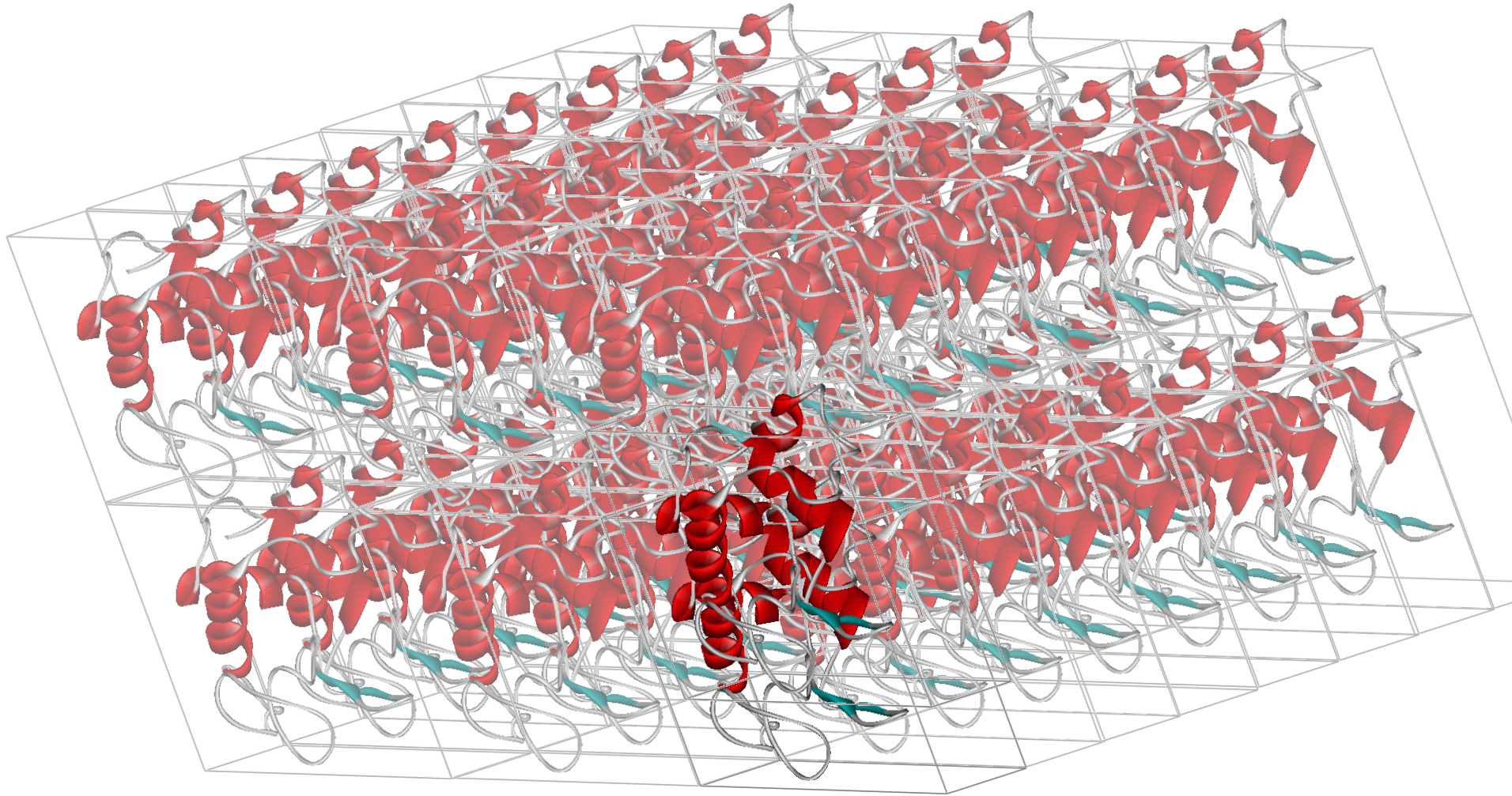
Atomgitter \rightarrow Kristall \rightarrow auch DNS o. Proteinkristall!

Aufbau des Röntgendiffraktionsgerätes





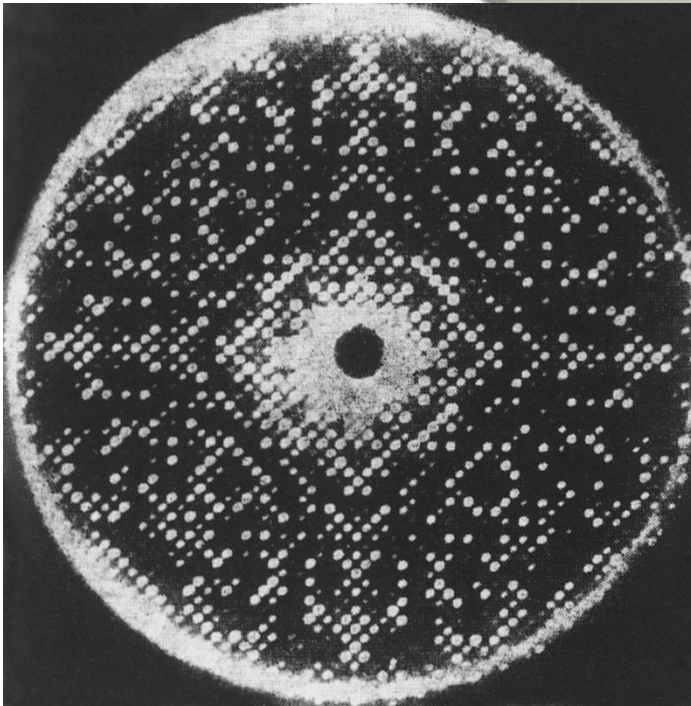
Eiweißkristalle



Bestimmung der Raumstruktur der Eiweiße



Lysozyme



Welcome

Deposit

Search

Visualize

Analyze

Download

Learn

A Structural View of Biology

This resource is powered by the Protein Data Bank archive-information about the 3D shapes of proteins, nucleic acids, and complex assemblies that helps students and researchers understand all aspects of biomedicine and agriculture, from protein synthesis to health and disease.

As a member of the wwPDB, the RCSB PDB curates and annotates PDB data.

The RCSB PDB builds upon the data by creating tools and resources for research and education in molecular biology, structural biology, computational biology, and beyond.

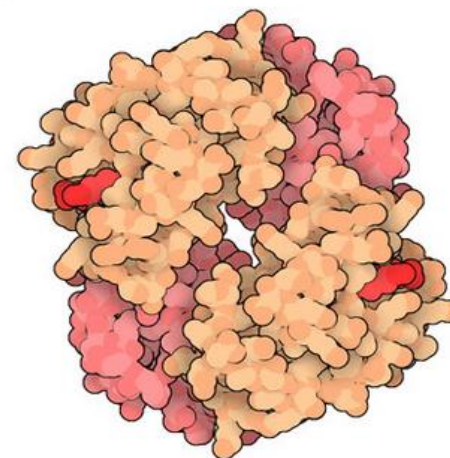
**COVID-19
CORONAVIRUS
Resources**



**PDB50:
A special symposium**
May 4-5, 2021
Register by May 1
VIRTUAL EVENT



May Molecule of the Month



Fetal Hemoglobin

Latest Entries

As of Tue Apr 27 2021



Features & Highlights



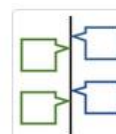
EXTENDED: Enter the 2021 CellPAINT Contest by May 6
Create images inspired by vaccines and by 50 years of the PDB with CellPAINT and win prizes



Future Planning: Entries with extended PDB and CCD ID codes will be distributed in PDBx/mmCIF format

News

Publications



Explore the History of the PDB
Explore PDB's historical highlights alongside milestone advances in structural biology » 04/27/2021



Annual Report Published
Download the 2020 Annual Report for an overview of recent RCSB PDB activities, PDB structures and the

Elektronen und Neutronendiffraktion

λ : 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.