
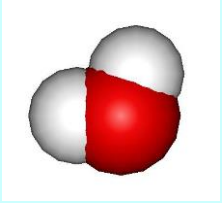
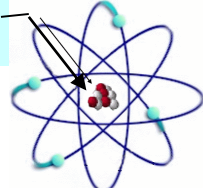


# Methoden der Strukturenuntersuchung

Lichtmikroskopische Techniken

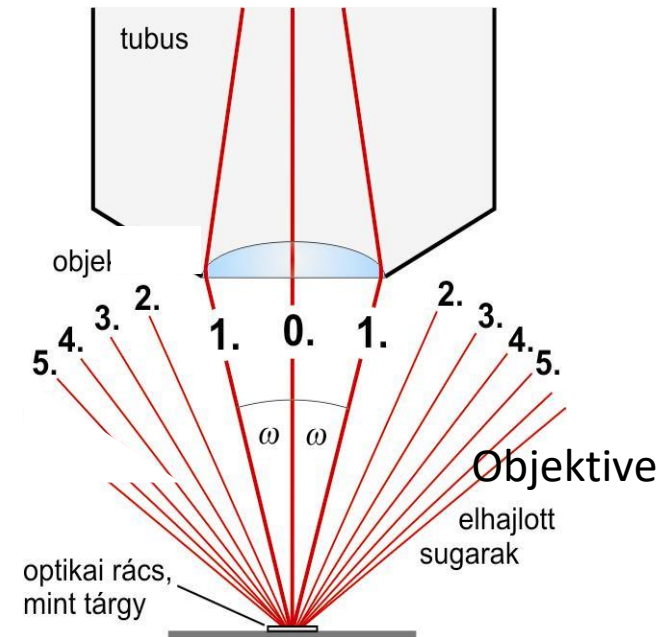
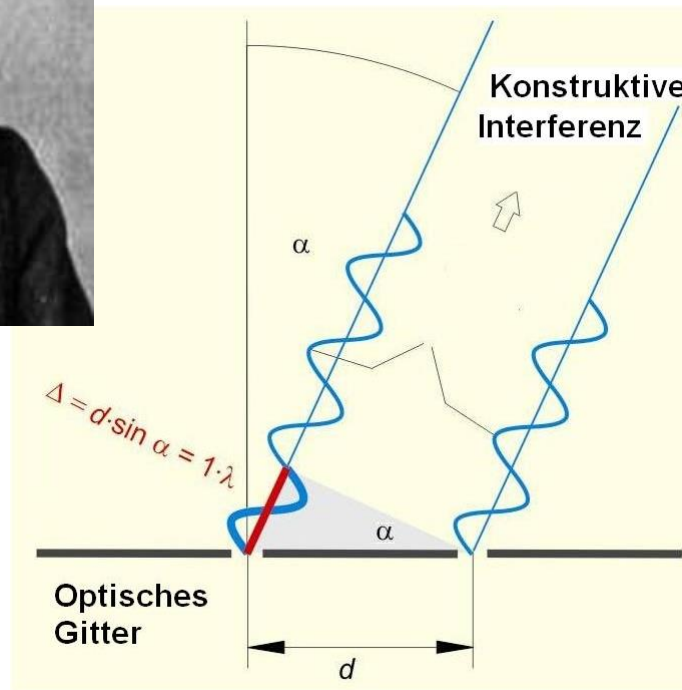
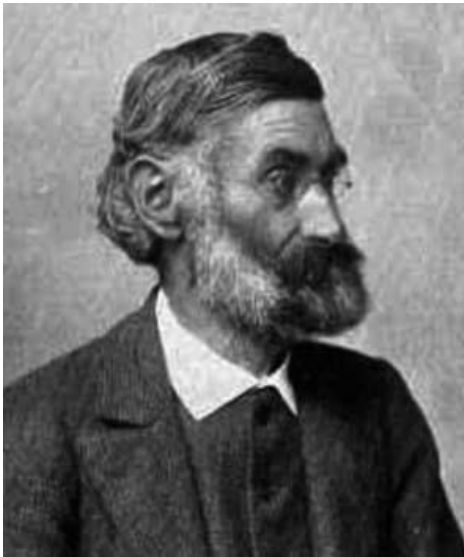
Rastermikroskope

# 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



Optisches  
Gitter

Gebeugte  
Strahlen

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

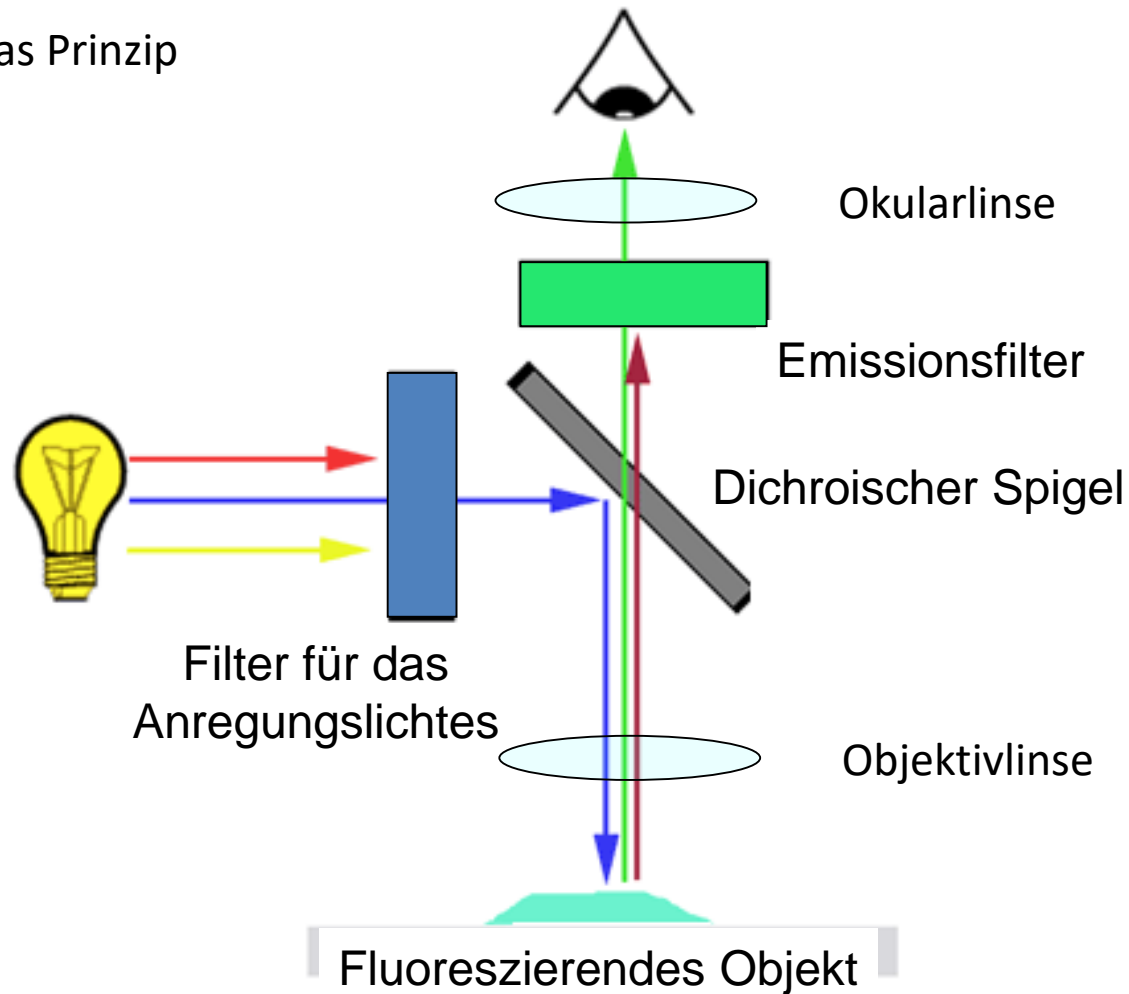
Mit  $\lambda = 400 \text{ nm}$ ,  $n = 1,6$  und  $\omega \approx 90^\circ$  ist  $d \approx 150 \text{ nm}$

# Spezielle Lichtmikroskopische Techniken

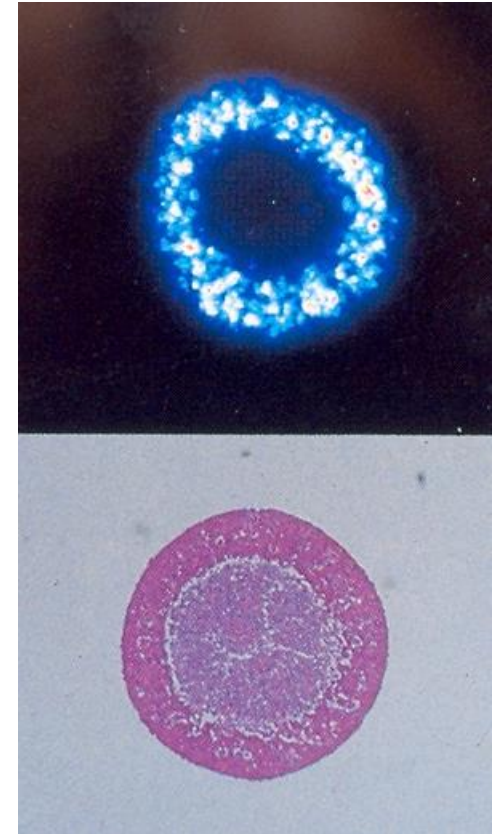
- Schon gelernt beim Praktikum:
  - Stereomikroskop
  - Phasenkontrast Mikroskop
  - Immersionsmikroskop
  - Dunkelfeldmikroskop
- Konfokales Mikroskop
- Zweiphotonenmikroskop
- Fluoreszenzkorrelationsmethode

# Fluoreszenzmikroskop

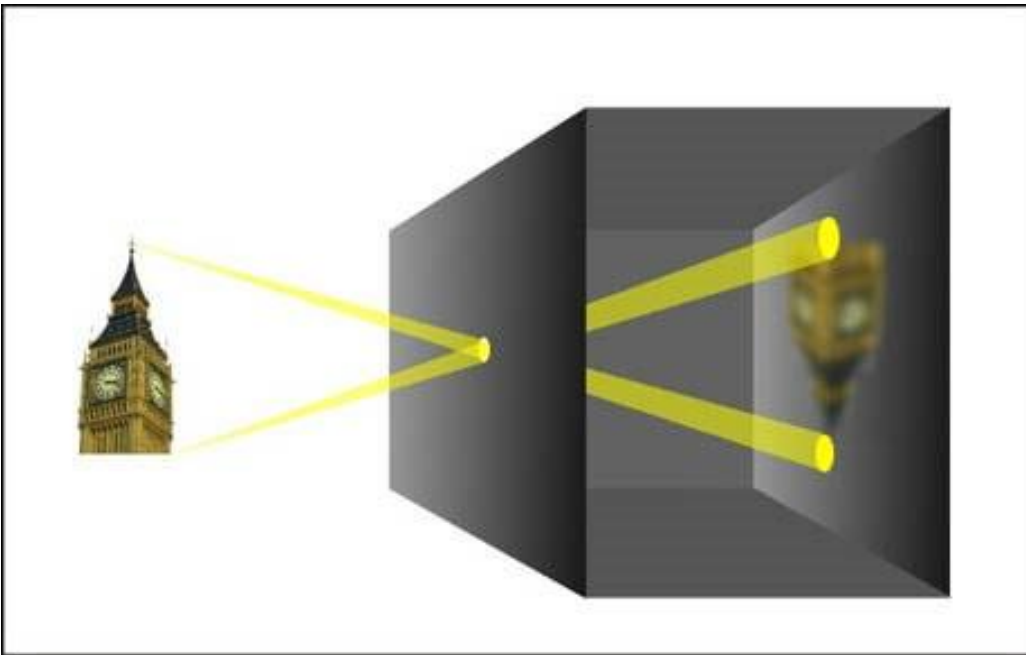
Das Prinzip



ATP-Verteilung  
visualisiert mit Luciferin

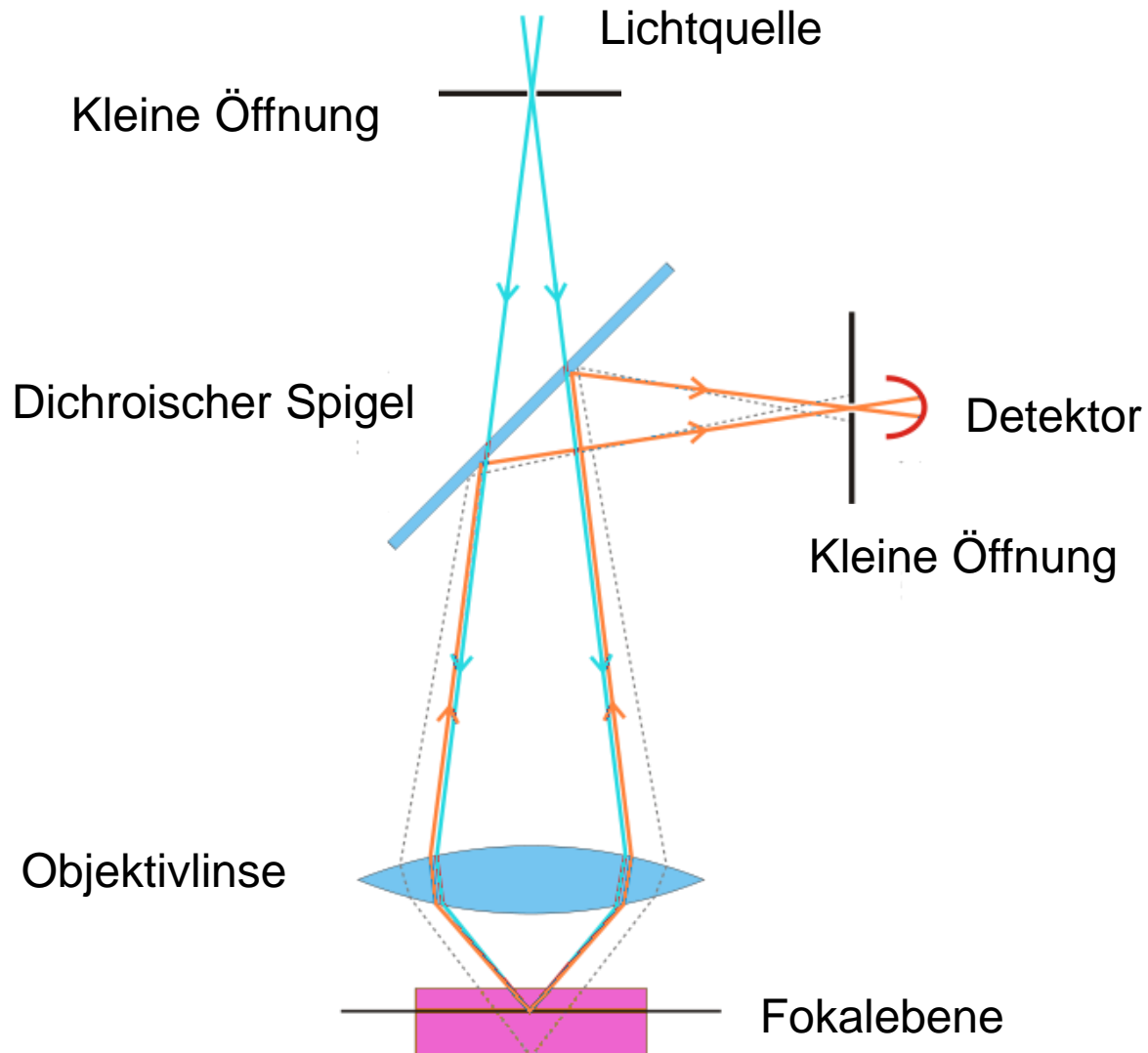


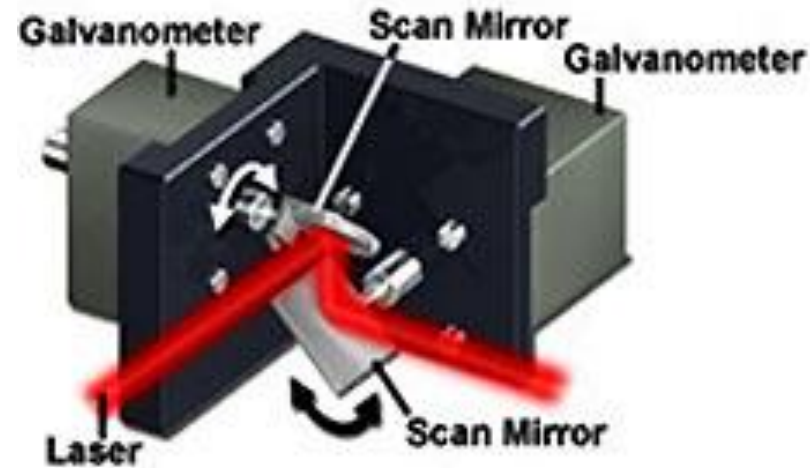
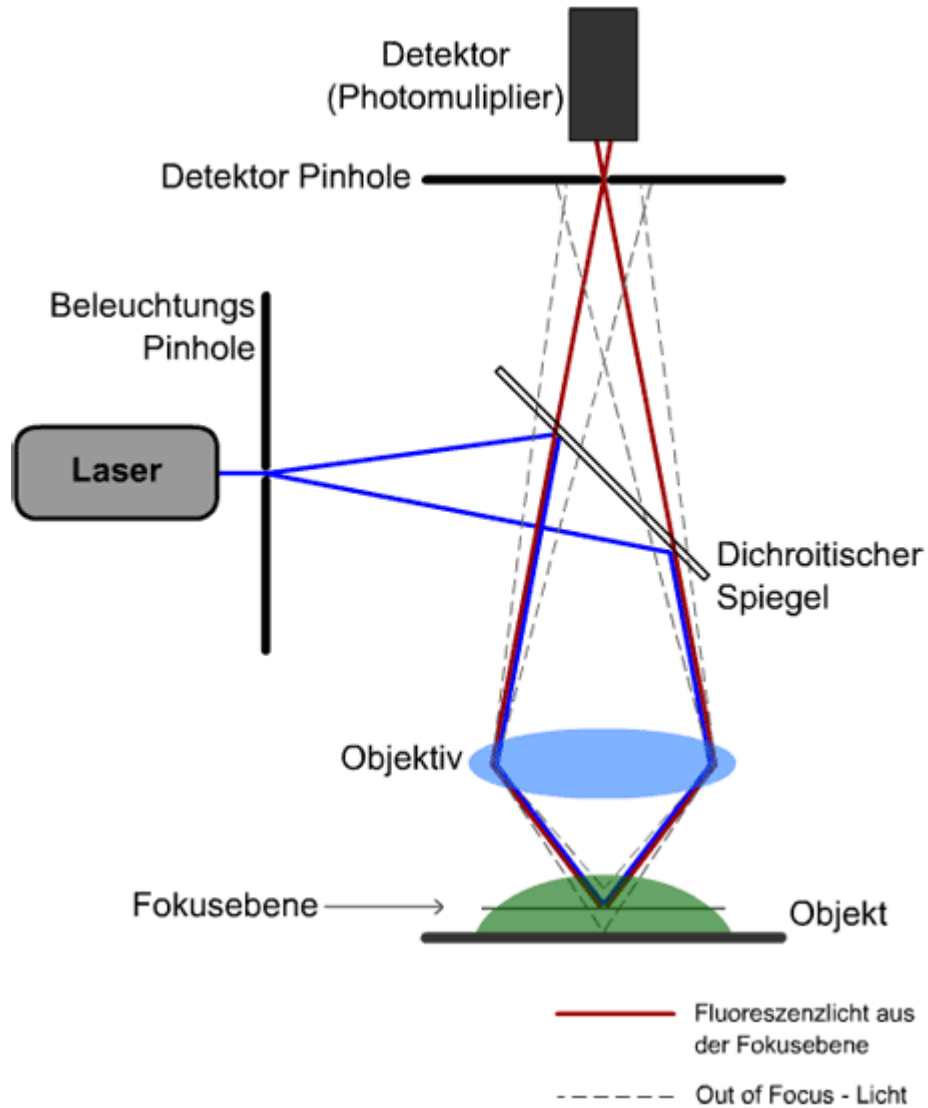
Konventionelle mikros-  
kopische Aufnahme



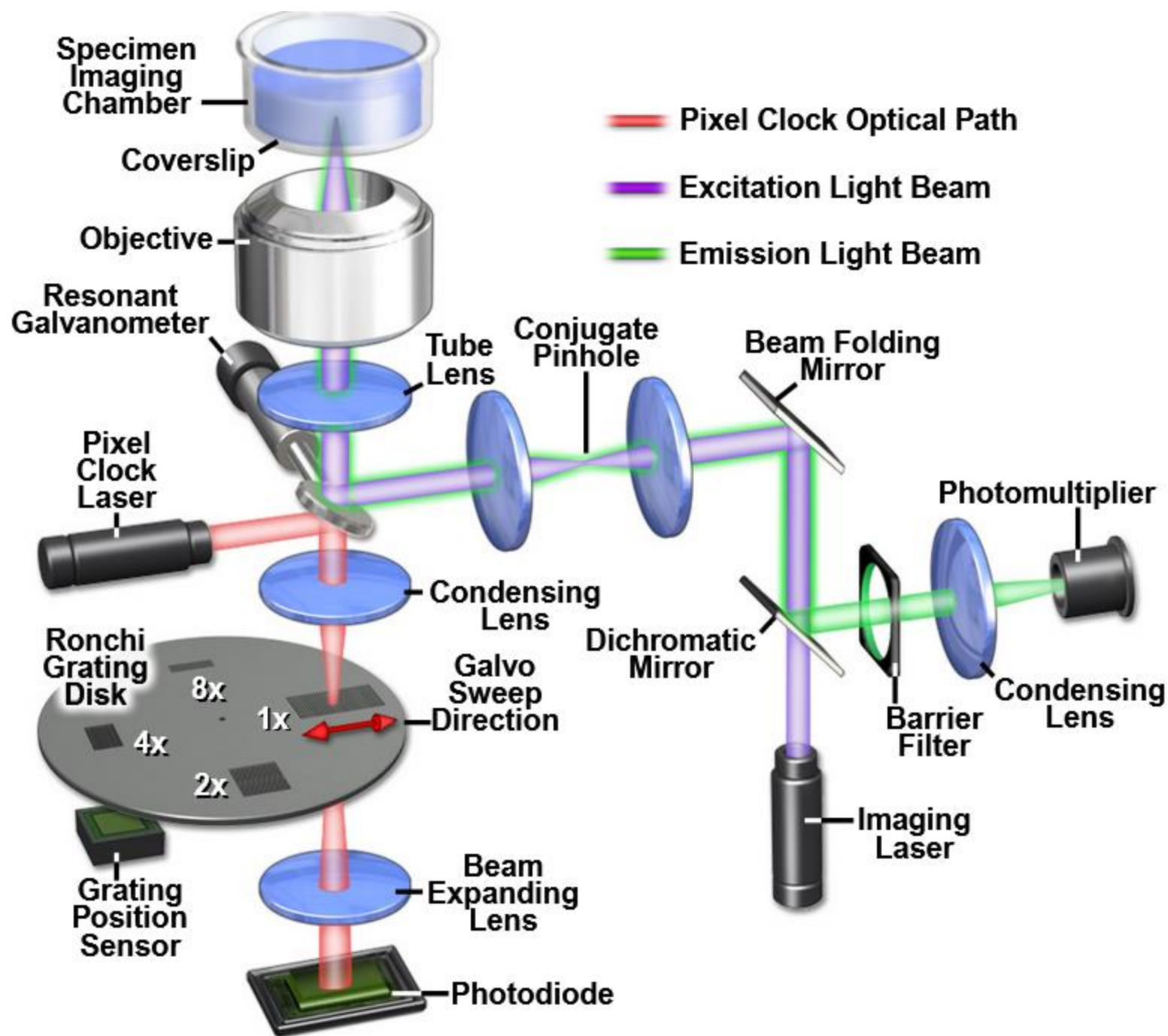
Lochkamera

# Konfokales Mikroskop









## Airy Disks and Diffraction Pattern Intensity Profiles

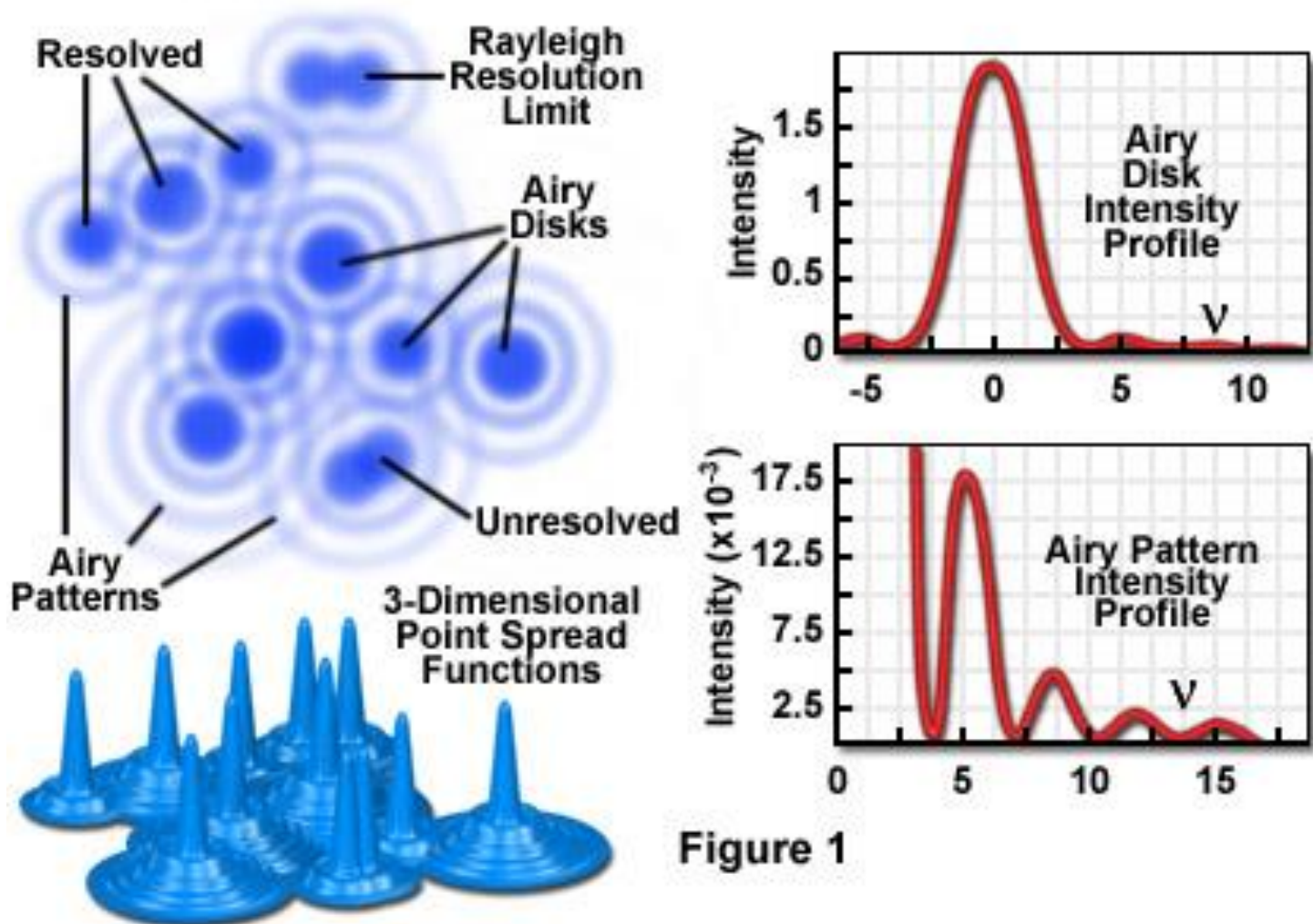
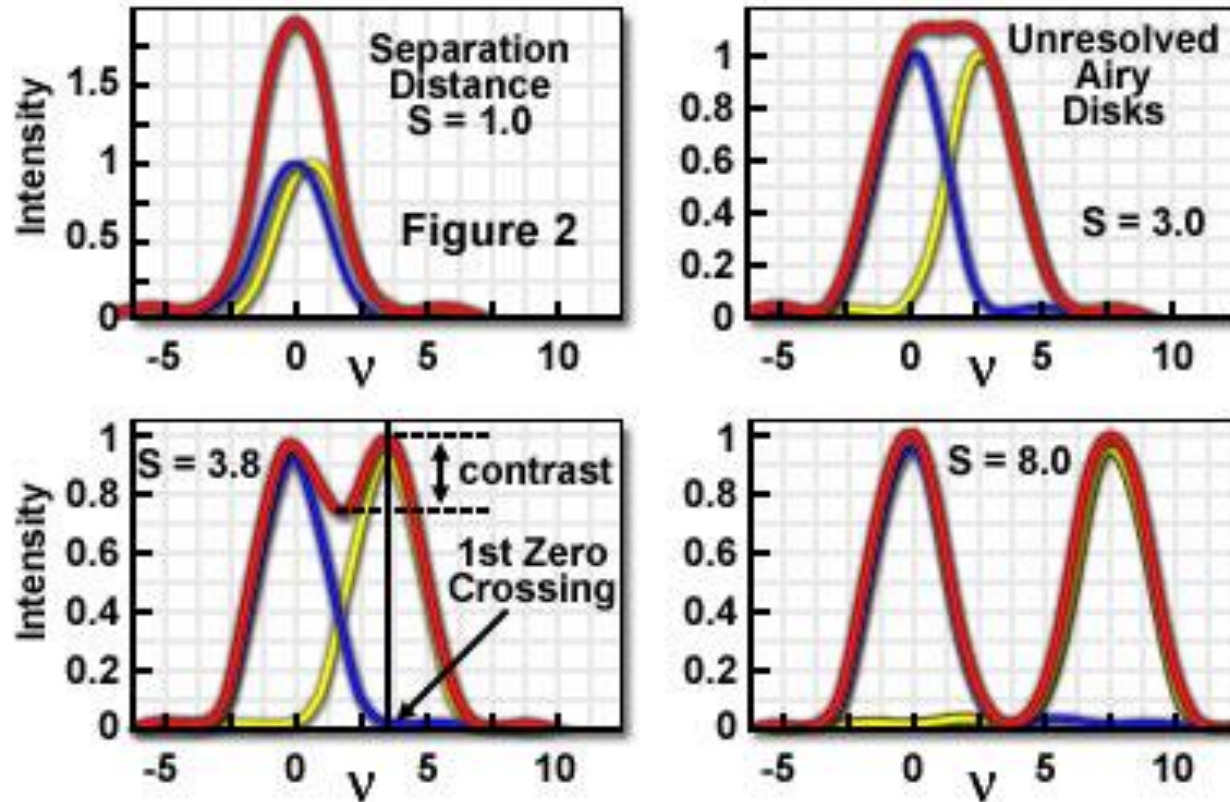


Figure 1

## Contrast and Resolution in Fluorescence Microscopy



Axial PSF Intensity Profiles

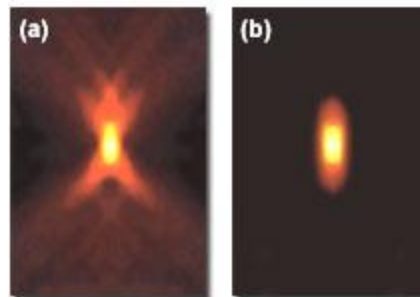


Figure 3

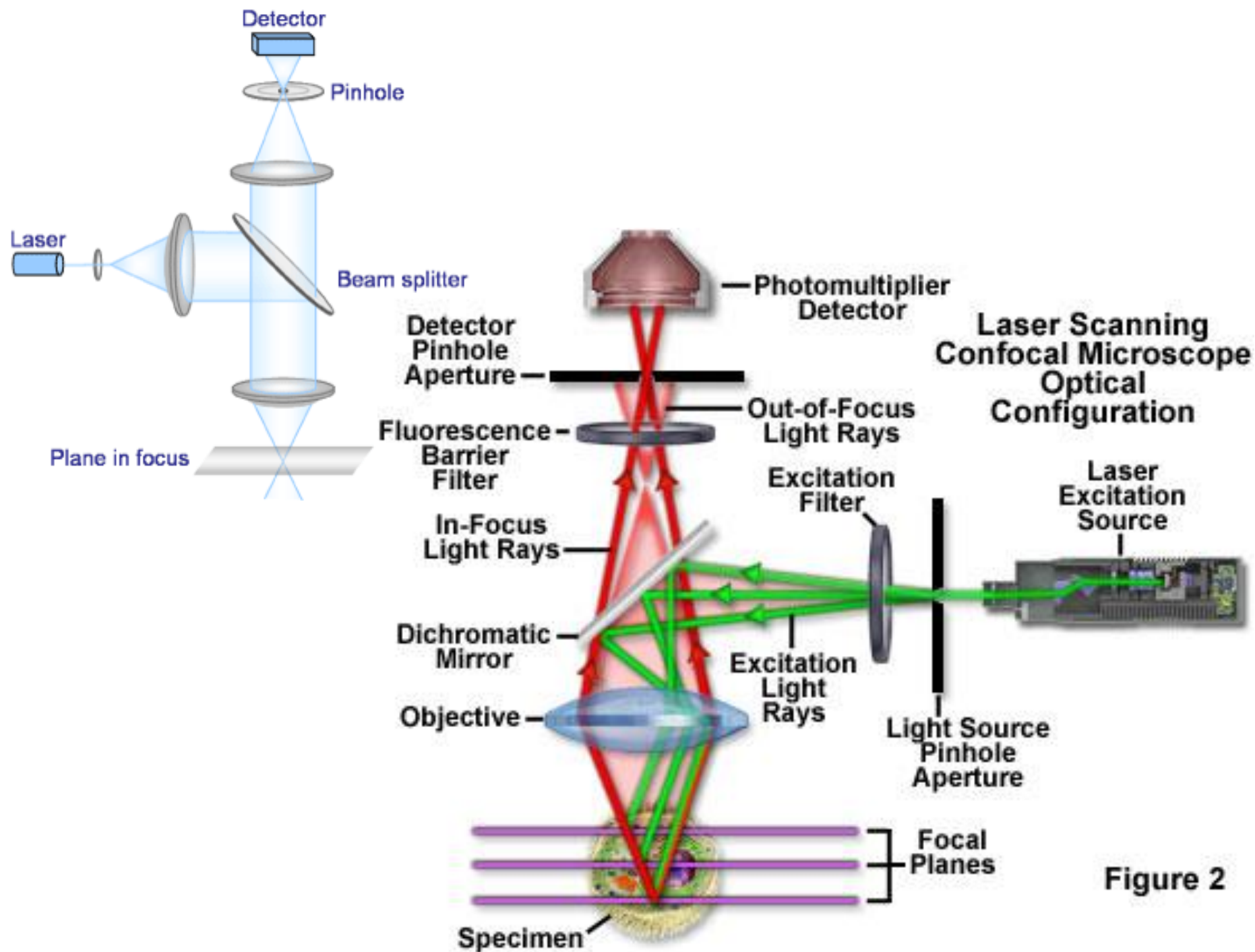


Figure 2



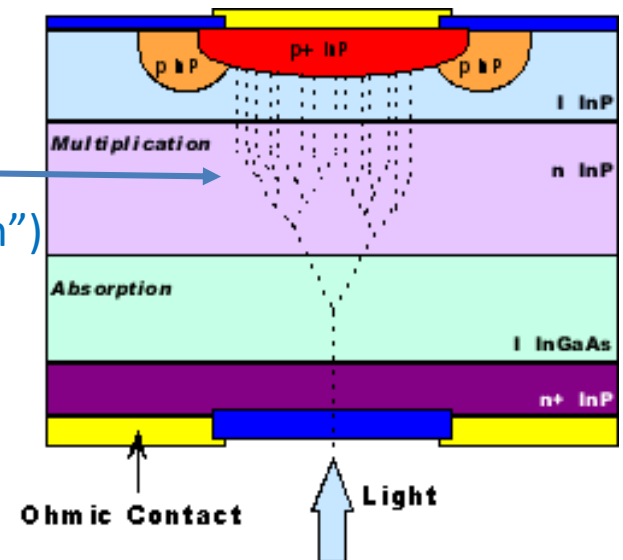
## PMT



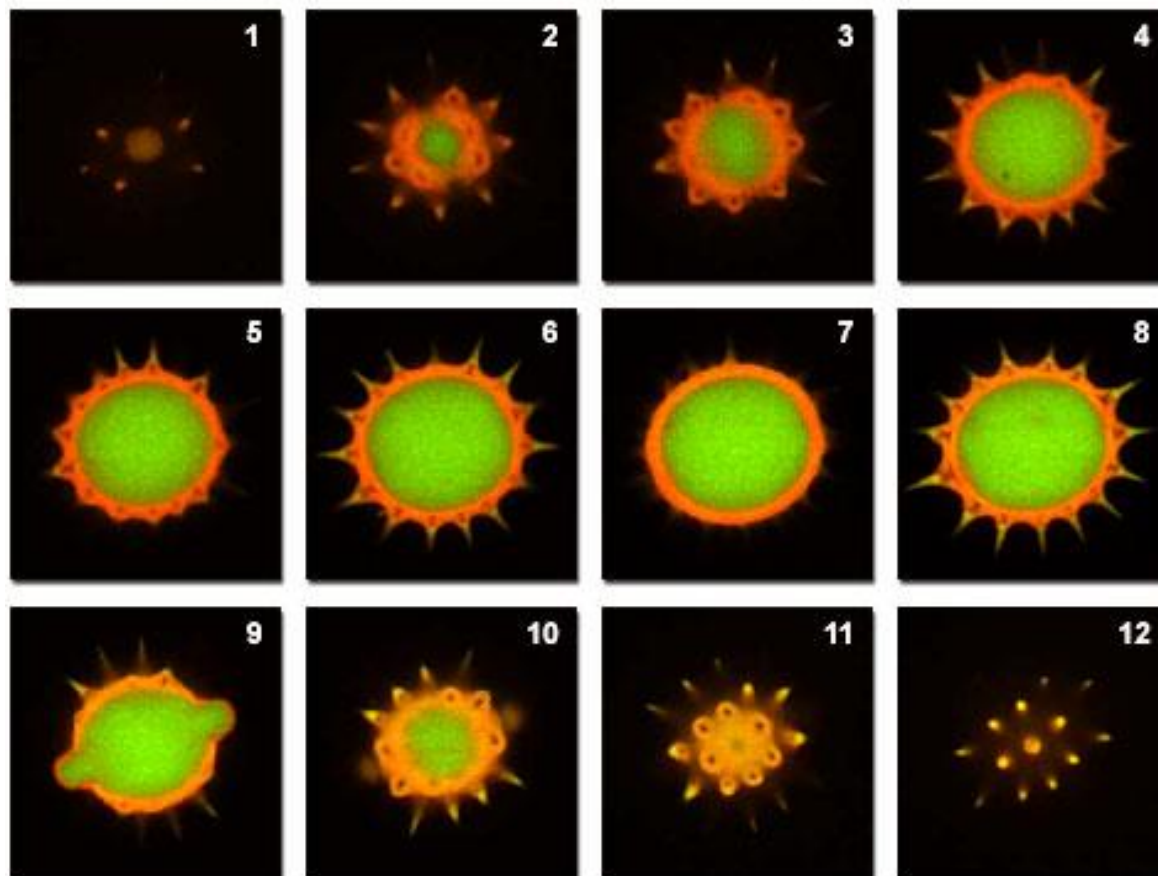
APD: Avalanche Photodiode  
(Lavinenphotodiode)



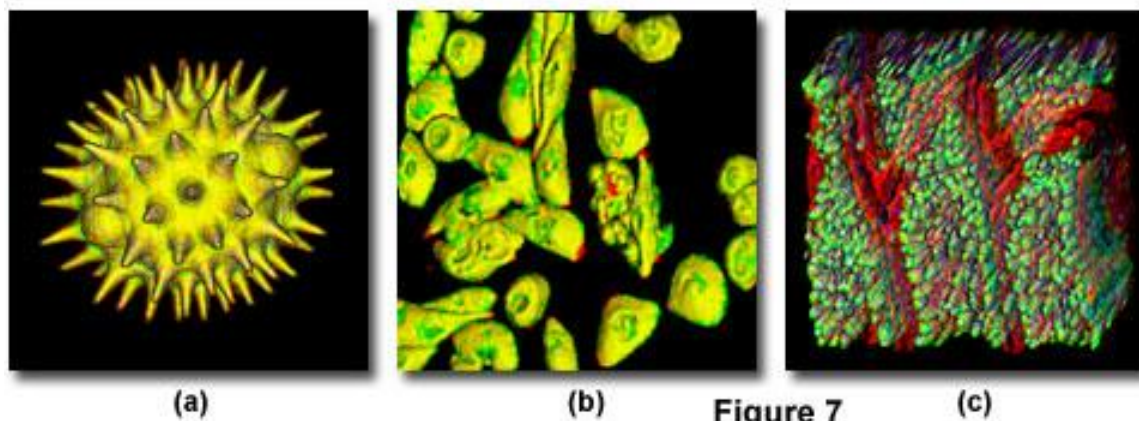
Vervielfachung  
(„sekundäre Ionisation“)



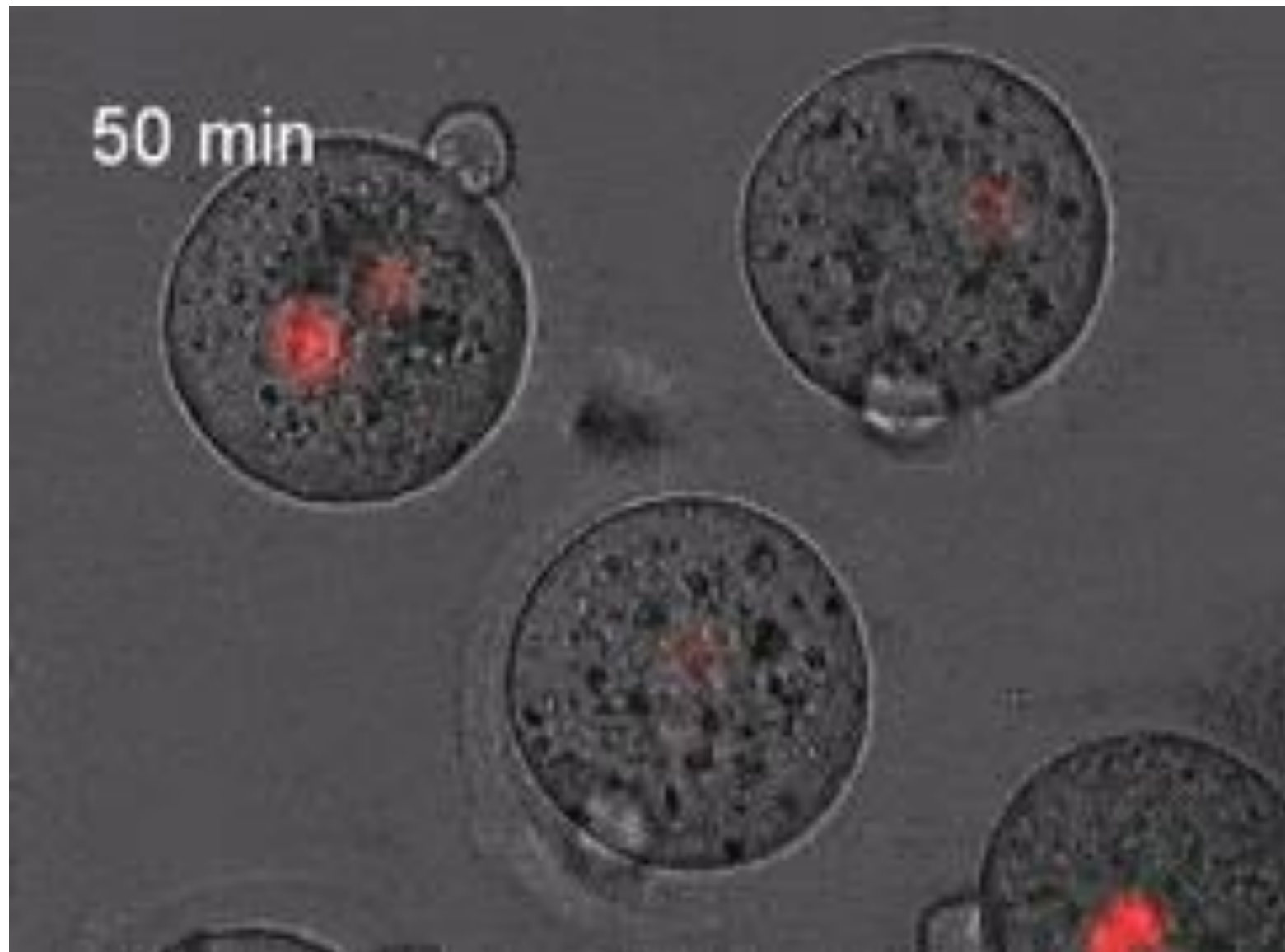
### Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy



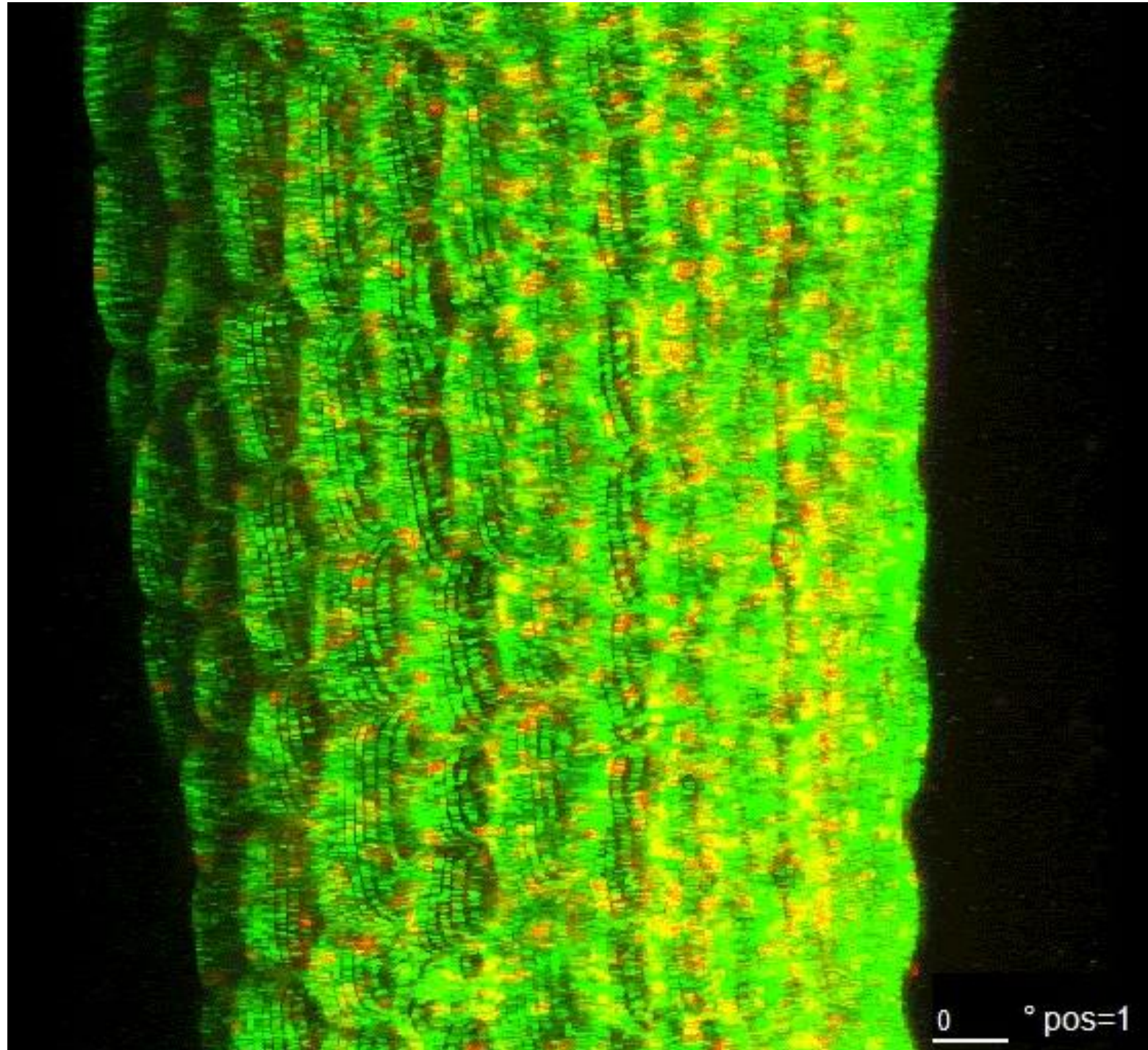
### Three-Dimensional Volume Renders from Confocal Optical Sections



50 min



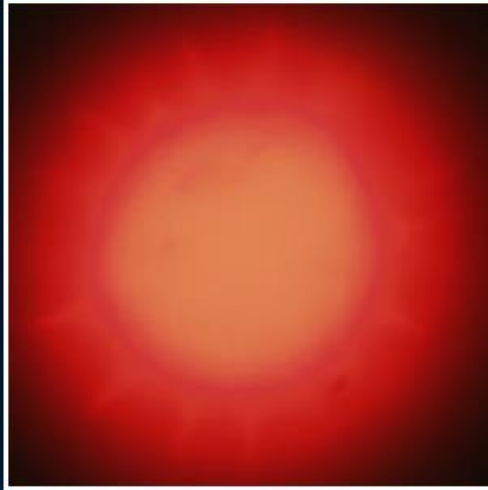




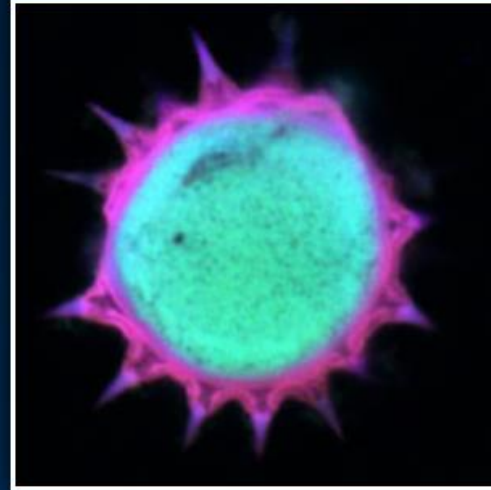


# Comparing Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy

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

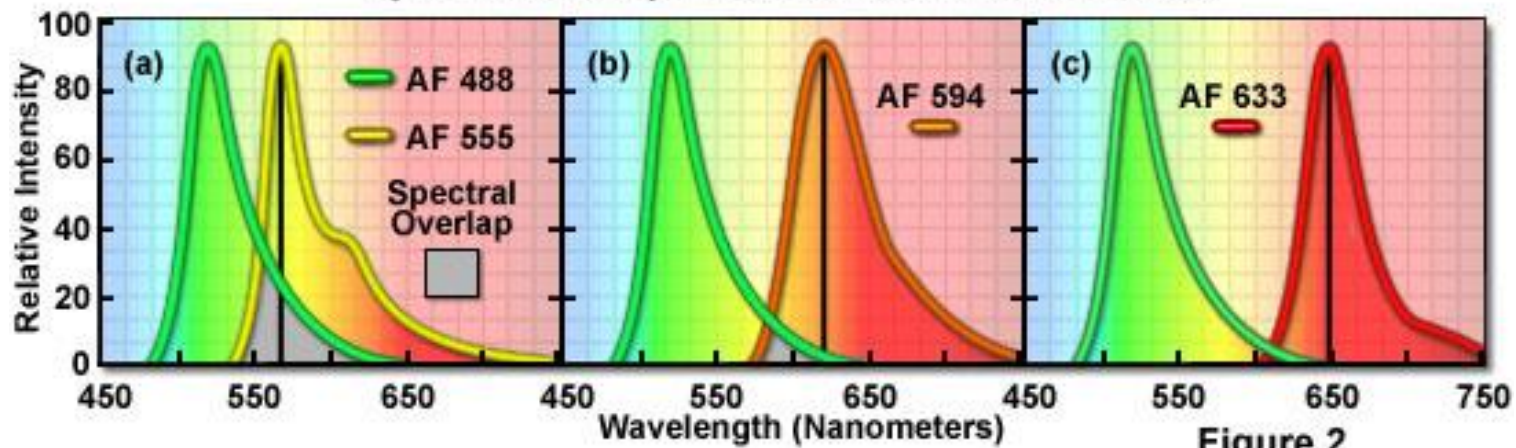


Figure 2

### Fluorophore Emission Bleed-Through in Confocal Microscopy

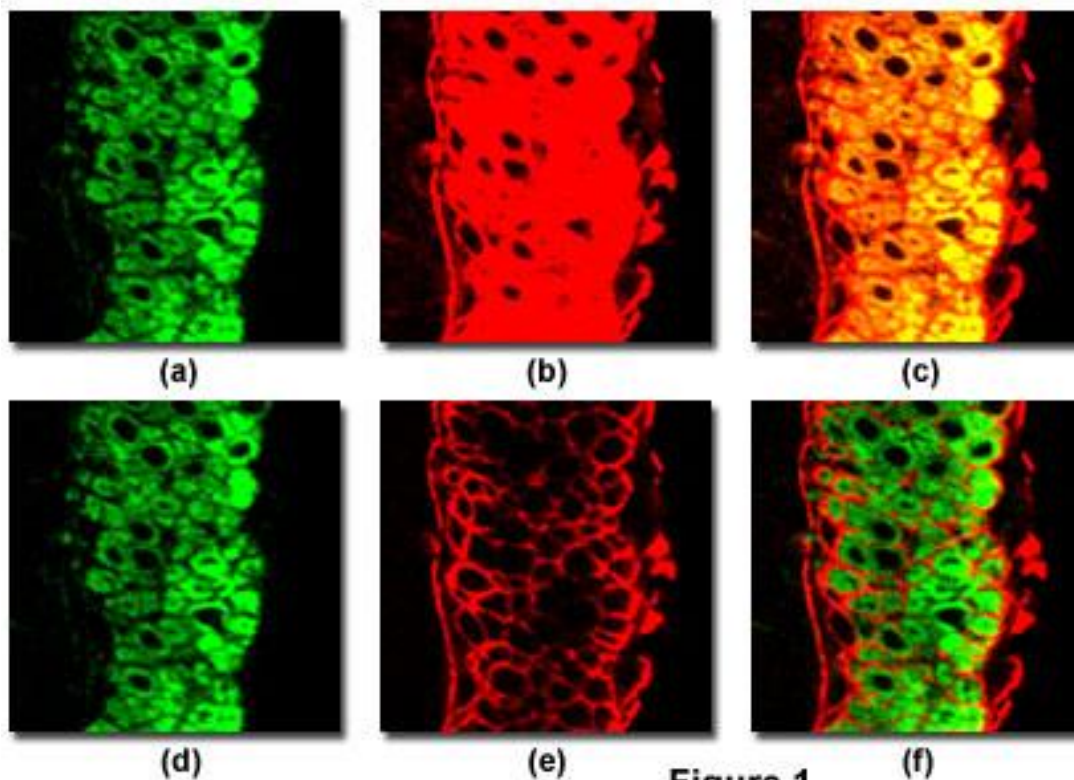
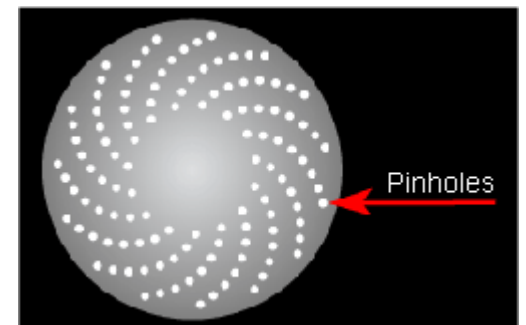
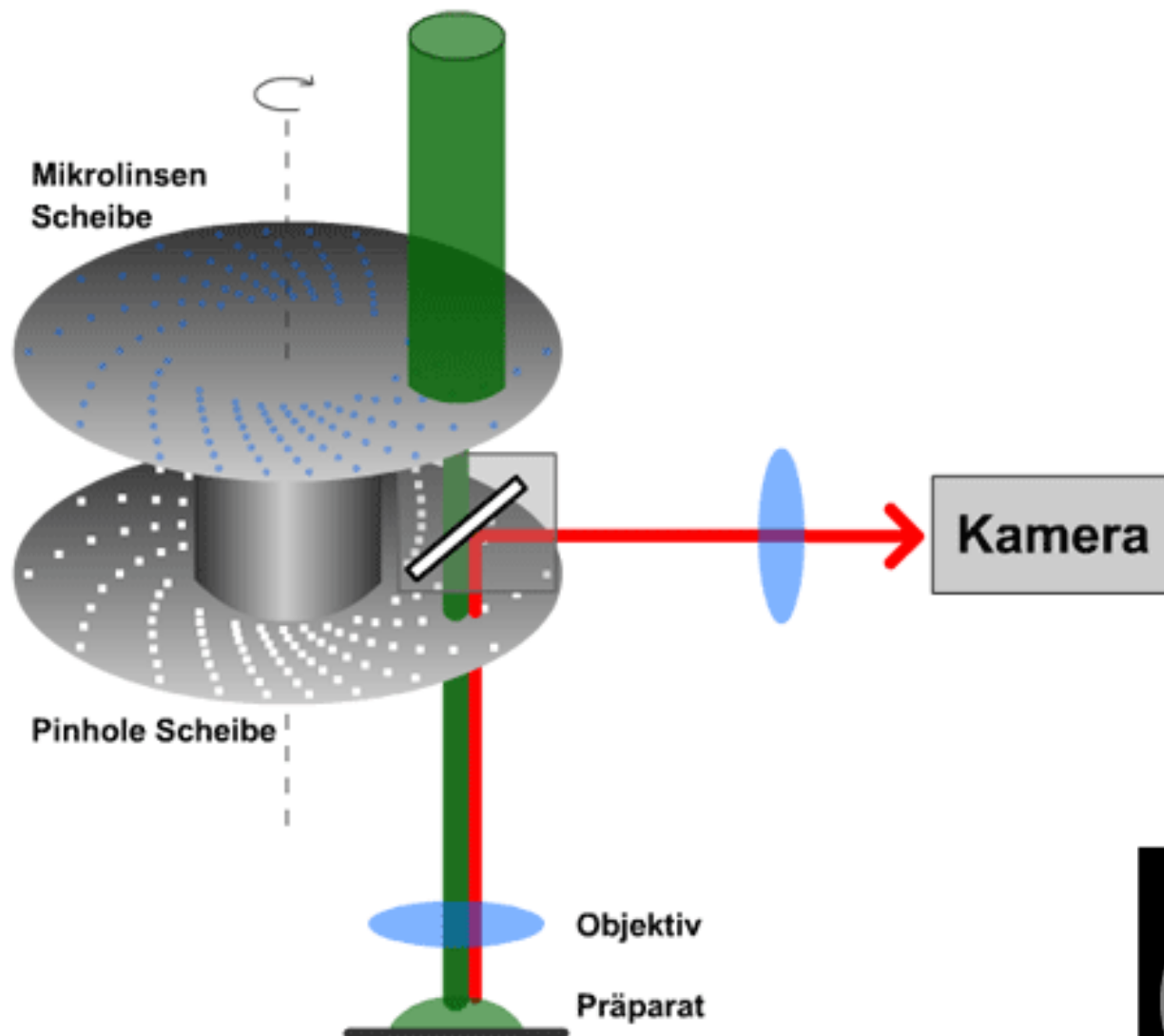
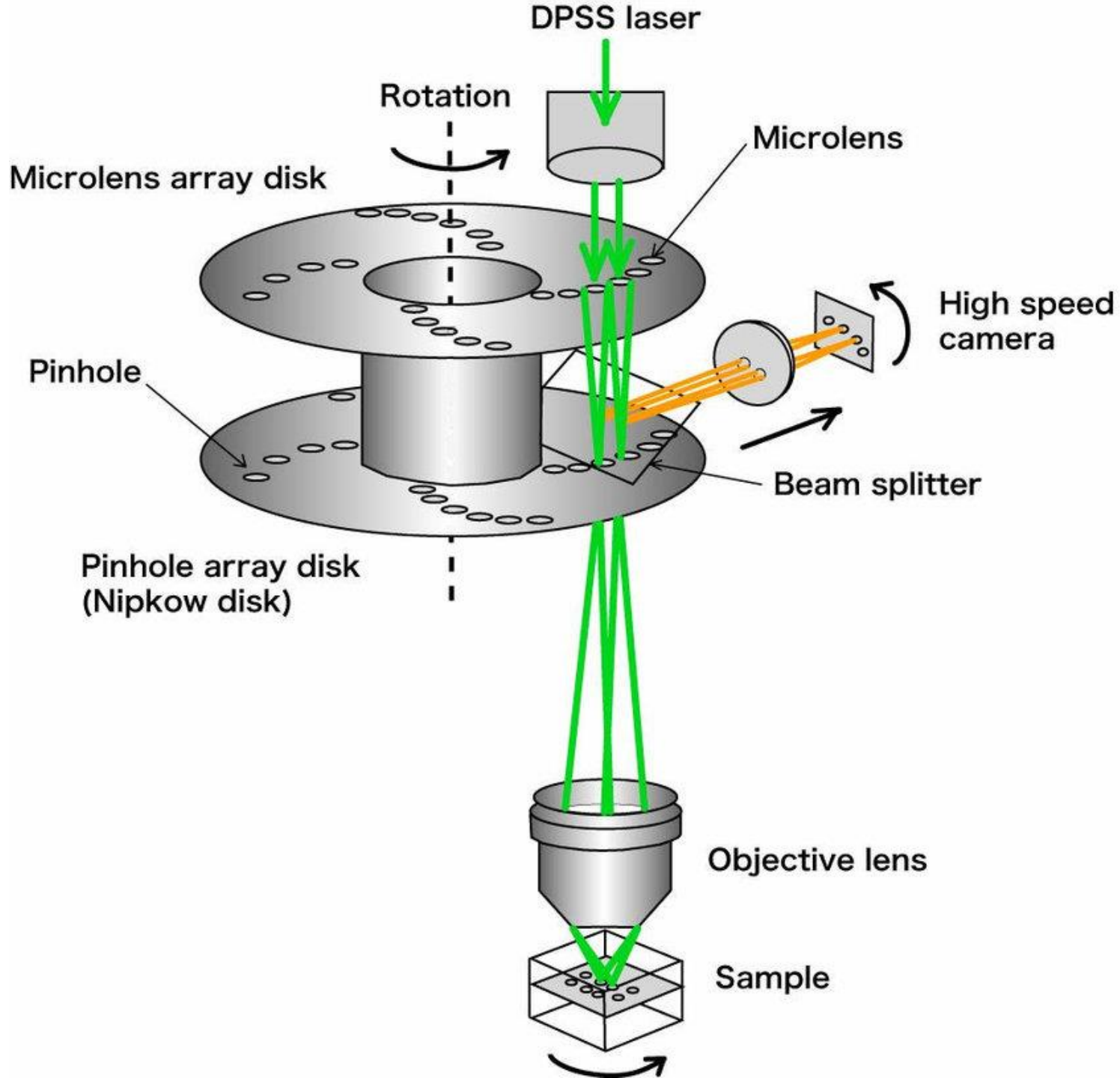


Figure 1



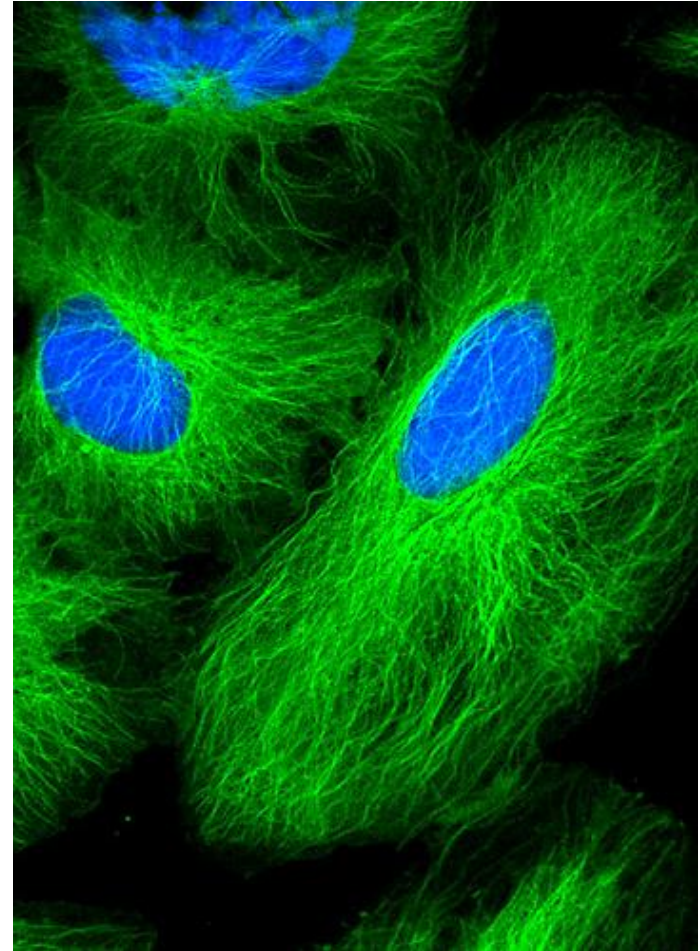
Nipkow-Disk





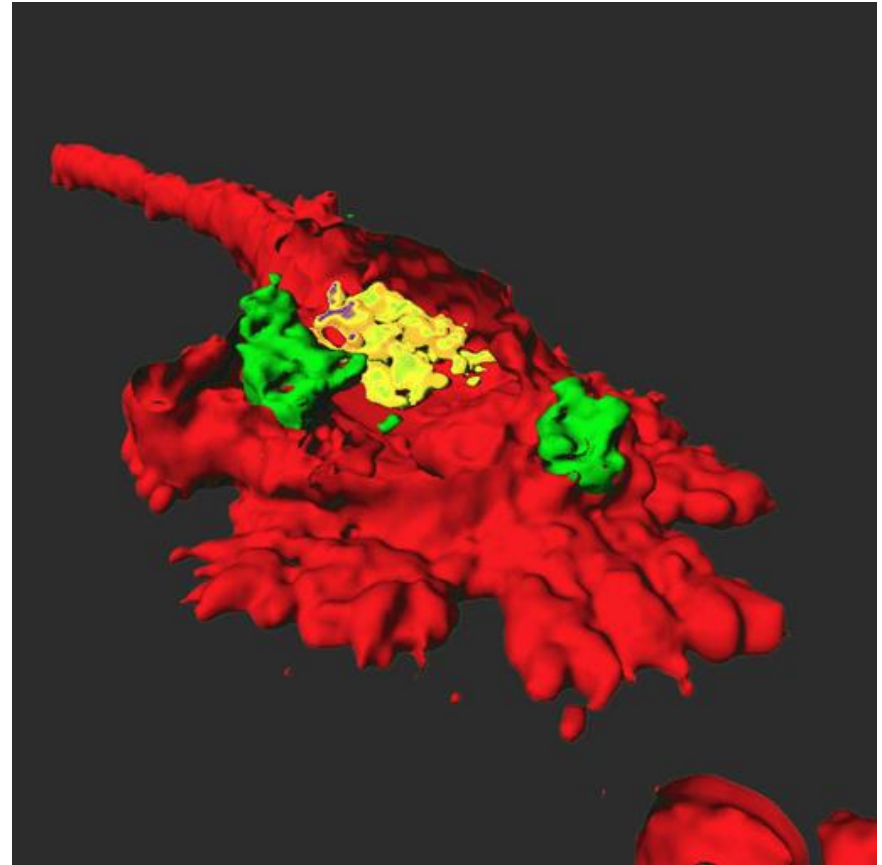
# Konfokales Mikroskop

Aus Tubulin bestehende  
Mikrotubuli in Zellen

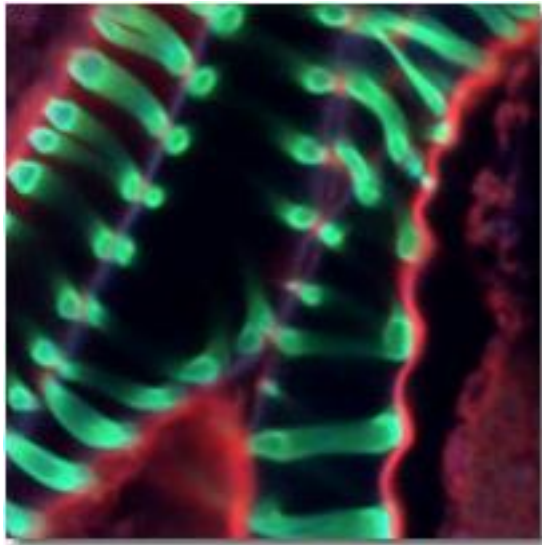
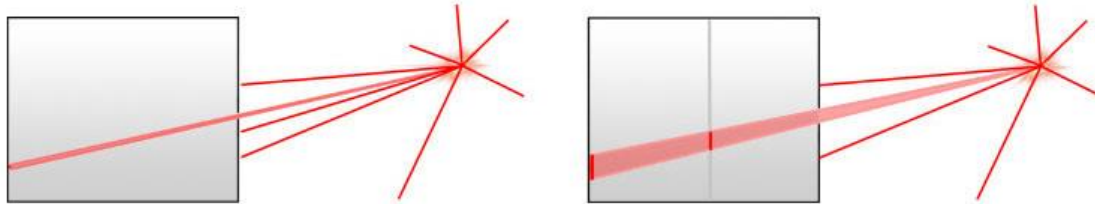


# Konfokales Mikroskop

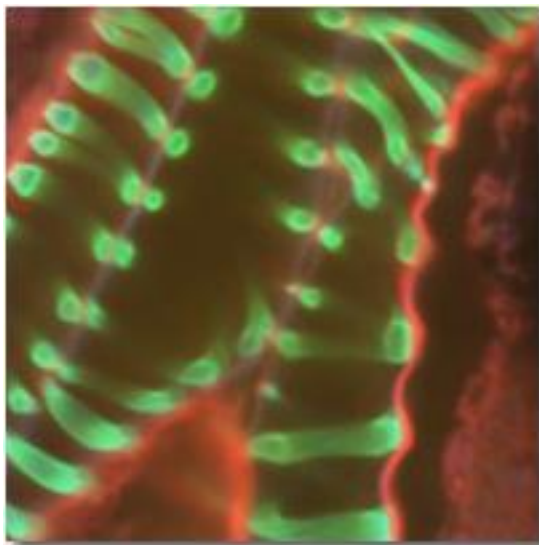
Dendritische Zelle mit  
Pollenteilchen.  
3D Aufnahme mit konfokalem  
Mikroskop.



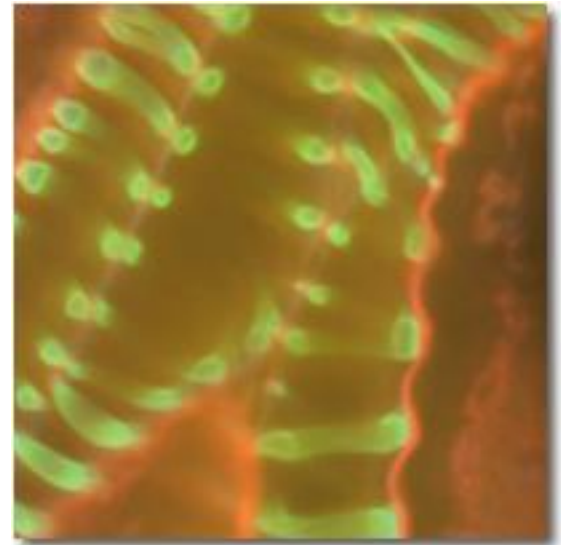
## Lochblendengrösse (pinhole size)



1 Airy-Einheit



4 Airy-Einheiten



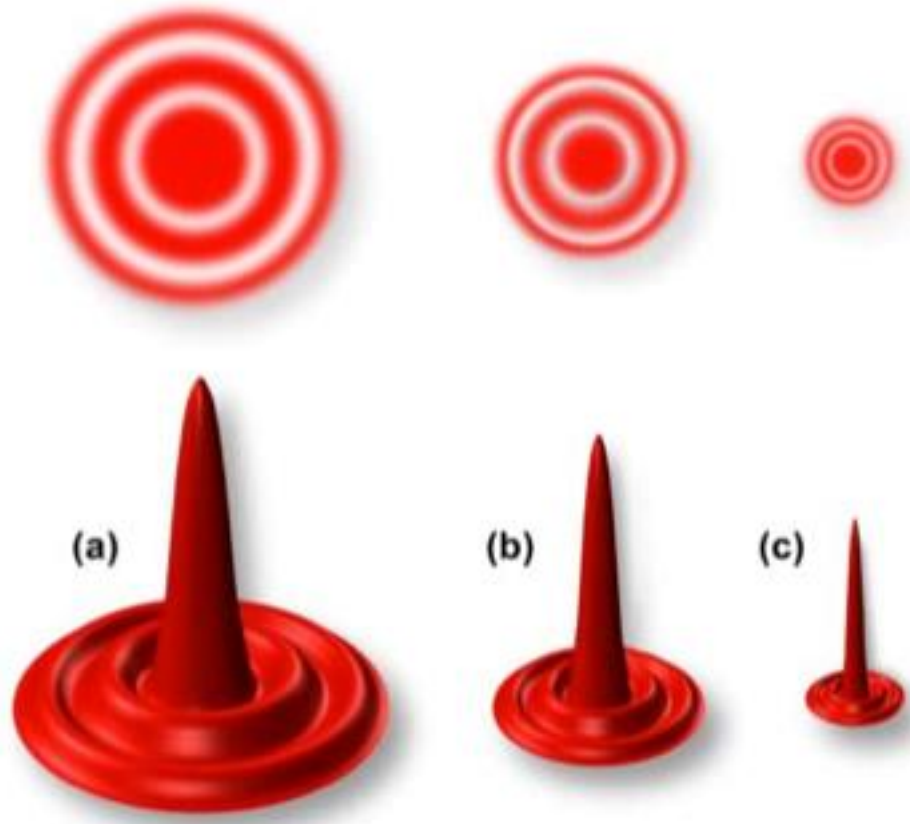
20 Airy-Einheiten

Airy-Einheit

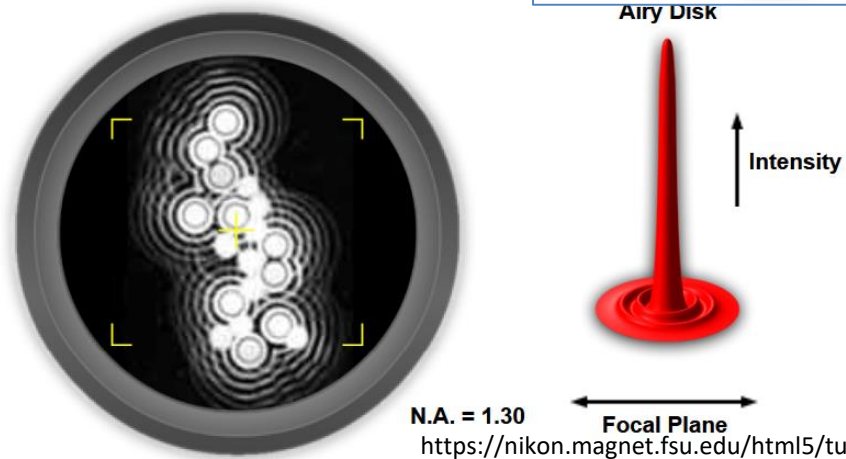
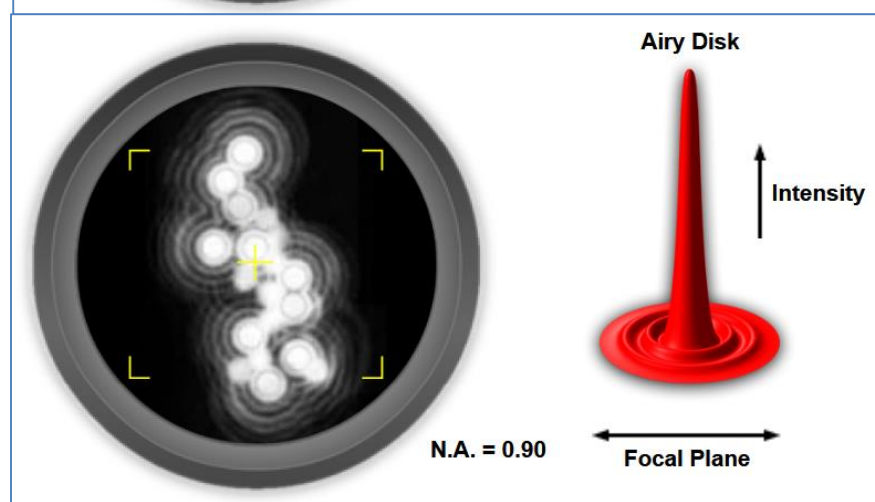
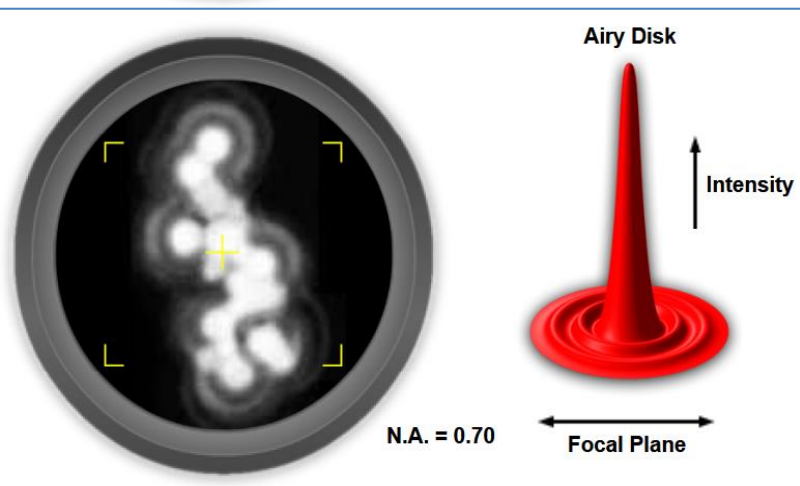
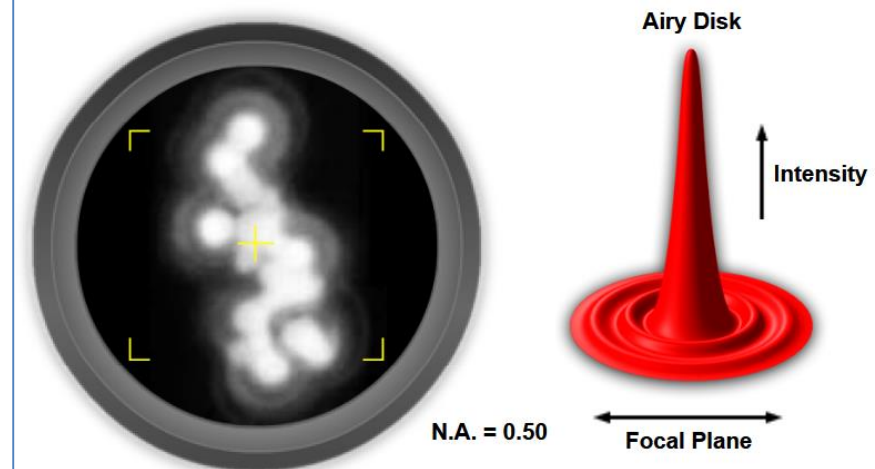
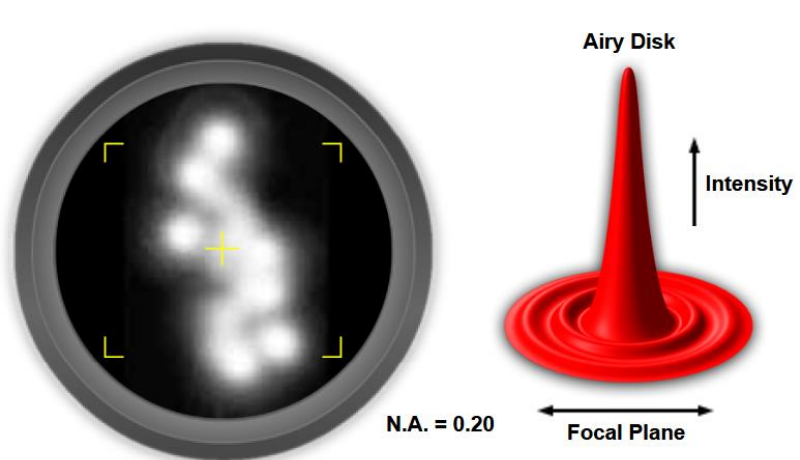
$$1AE = \frac{1.22 \cdot \lambda}{NA}$$

Die Numerische Appertur beeinflusst die Scheibengrösse:

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





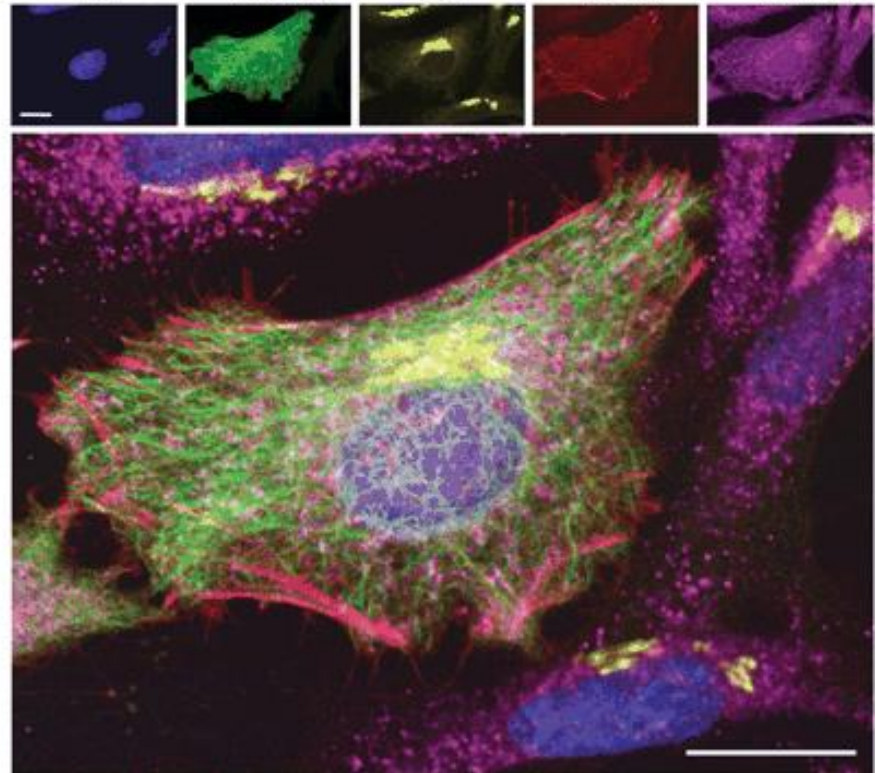


# Gleichzeitige Anwendung von mehreren fluoreszierenden Markierungen

He-La Zellen markiert mit fünf unterschiedlichen Fluoreszenzmethoden.

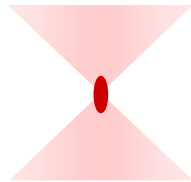
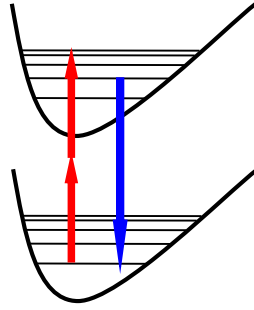
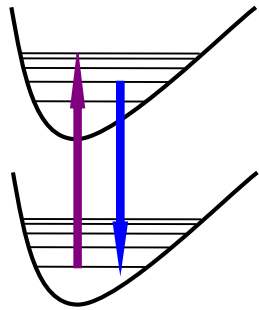
Der Masstab ist 20  $\mu\text{m}$ .

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	$\alpha$ -tubulin	giantin	$\beta$ -actin	Cytochrome c
Structure: nuclei	microtubules	golgi	stress fibers	mitochondria

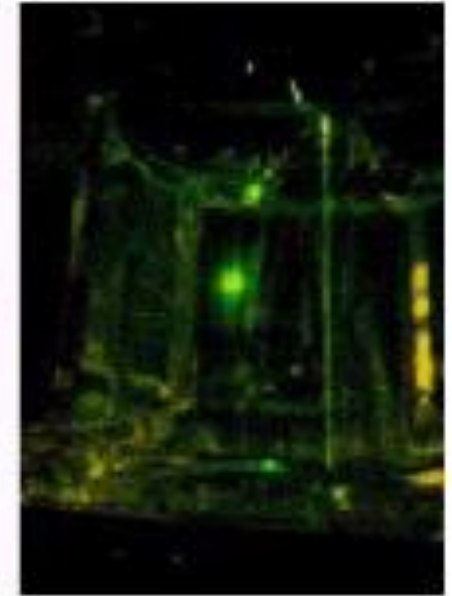


# Fluoreszenzanzregung mit zwei Photonen

## Zweiphotonenmikroskop



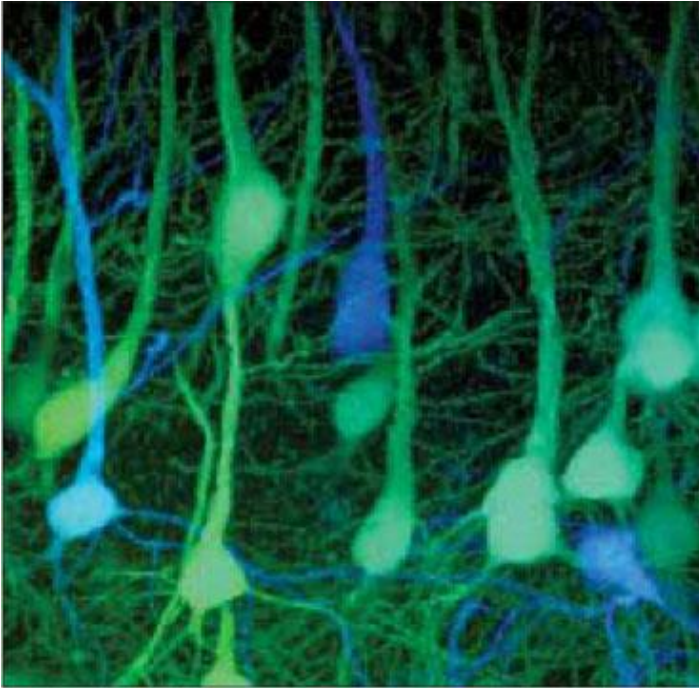
IR Laser



Fluoreszenzemission bei  
Einphoton- und  
Zweiphotonenanregung.

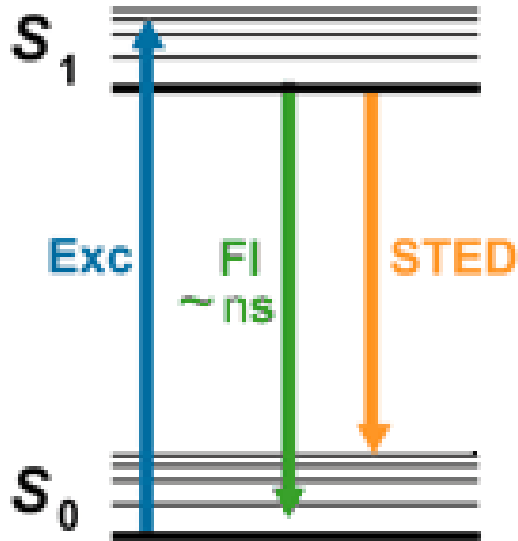
Auflösung!

# Zweiphotonenmikroskopie

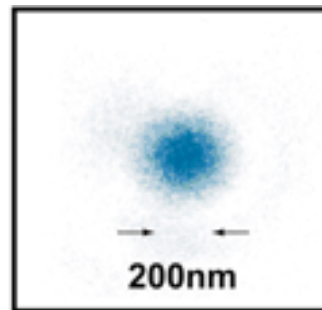


Visual Cortex von genetisch manipulierten Mause die GFP produzieren.

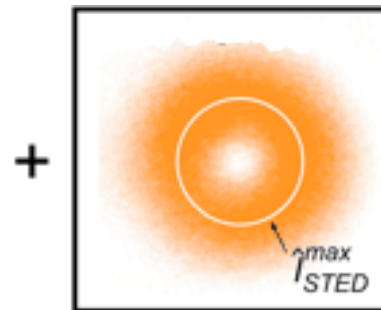
# STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop



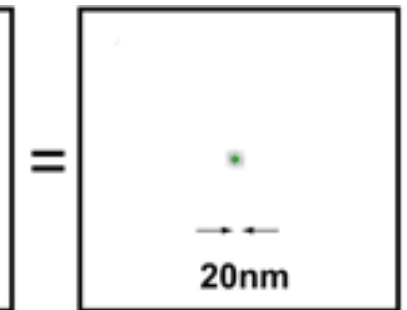
Stefan Hell (Nobelpreis 2014)



Anregung

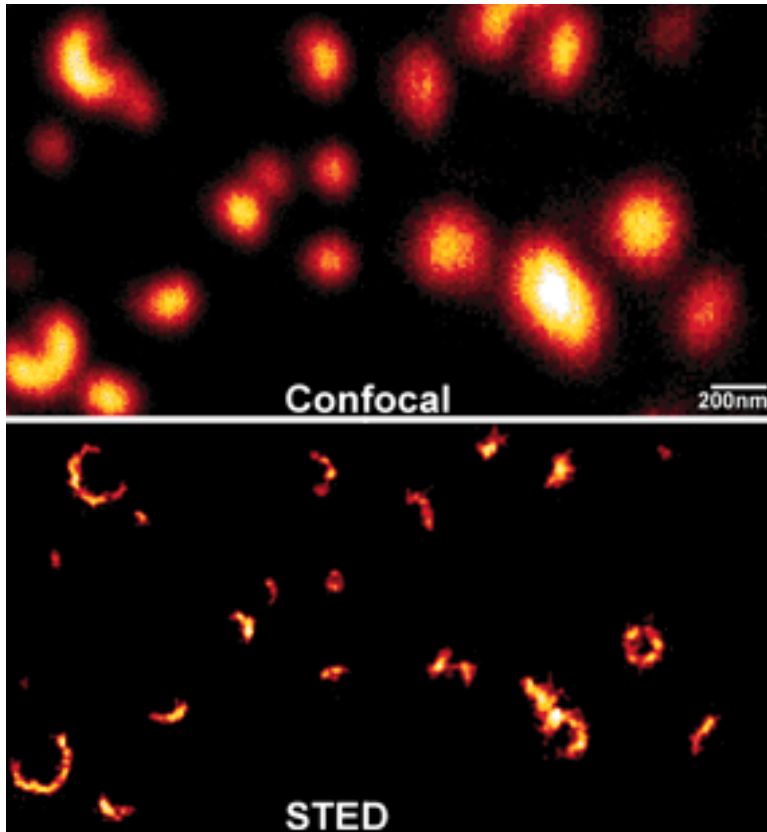


Auslöschung



Lumineszenz nach dem Auslöschung

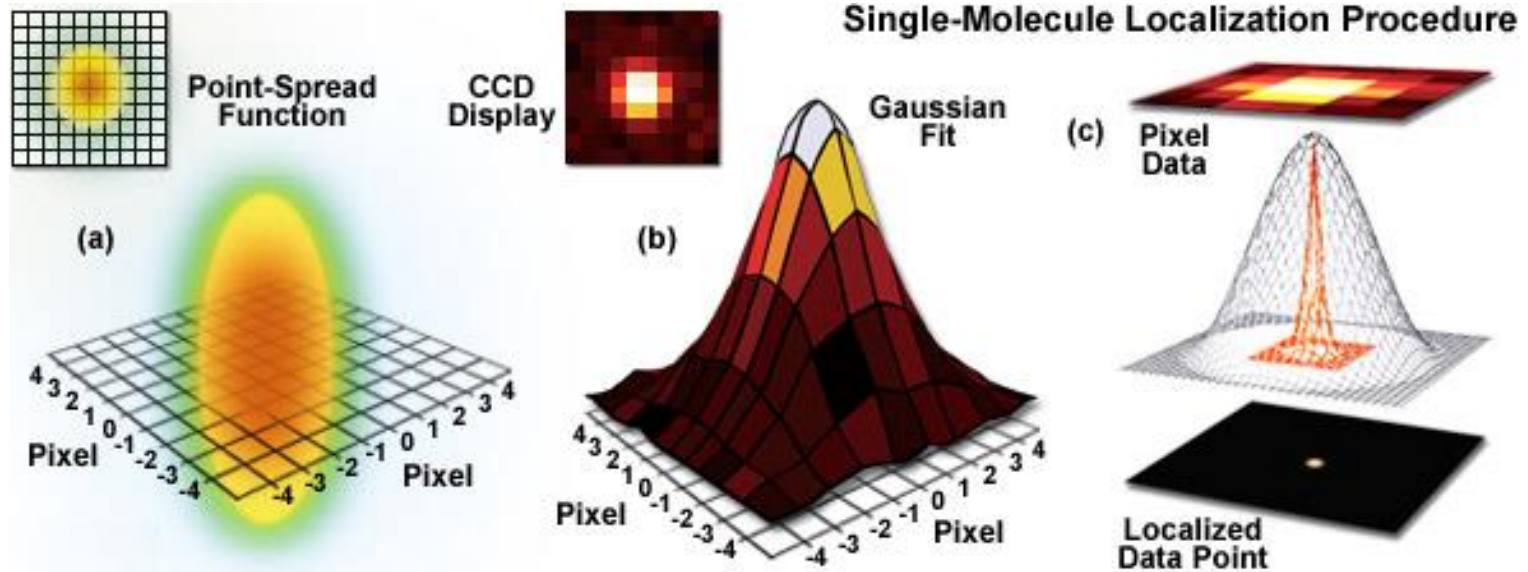
# STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop



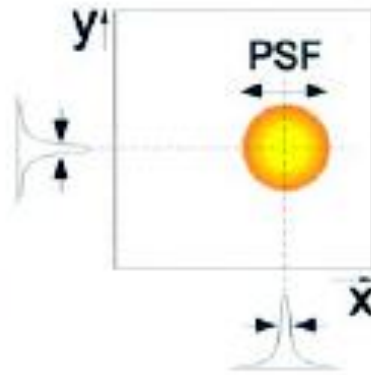
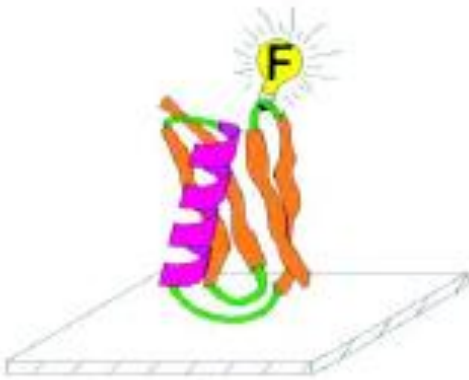
**Reorganization des  
Synaptolysins in  
synaptischen Vesikeln**



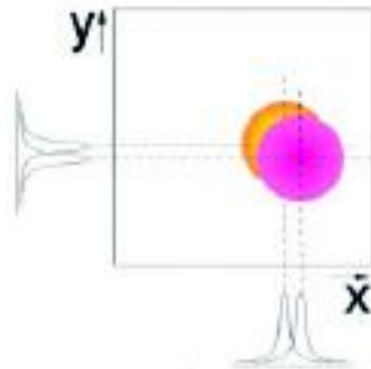
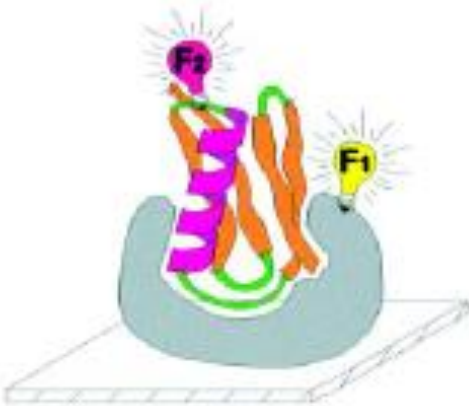
# STED: Localization



# STED: Lokalization und Kolokalisierung



Die Position des Eiweisses kann mit nm Genauigkeit angenommen werden.

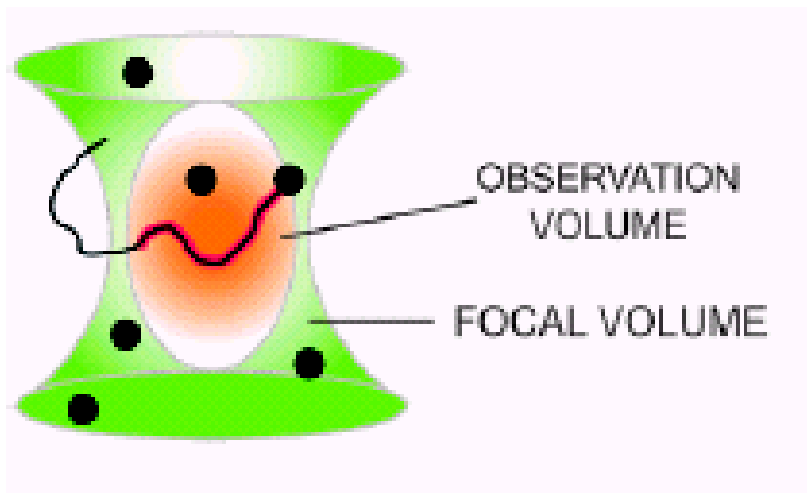


Kolokalization bedeutet nicht unbedingt eine Wechselwirkung!

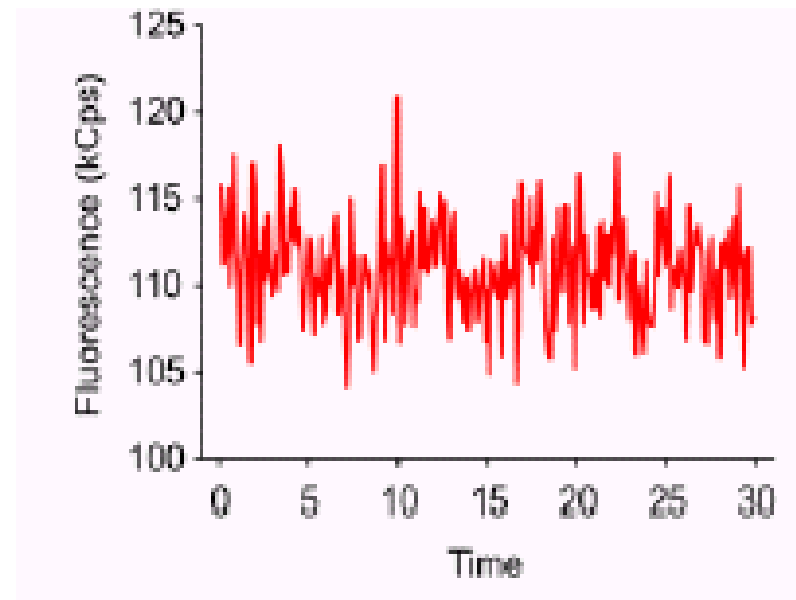


# Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

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



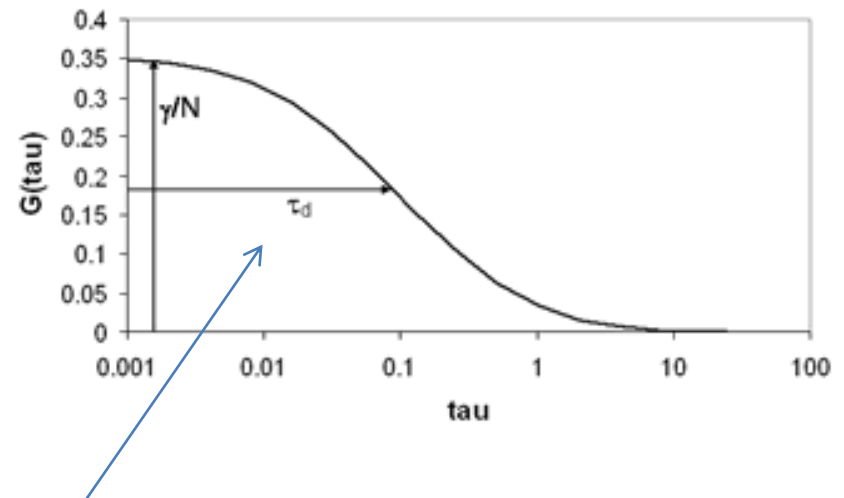
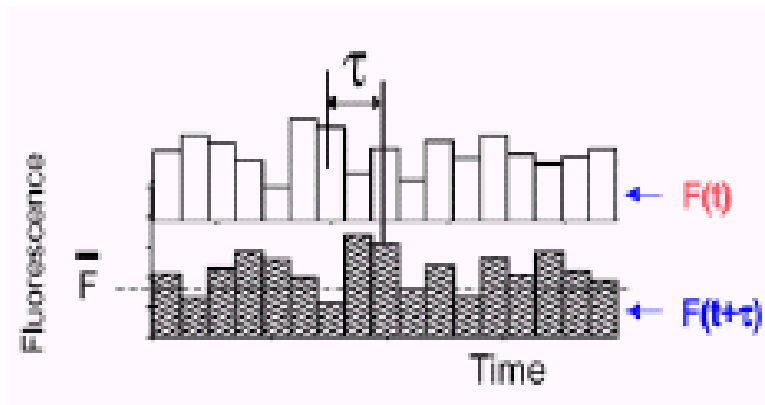
Fluktuationen des  
Fluoreszenzlichtes:



Ähnlich zur dynamischen Lichtstreuung, aber mit Fluoreszenz

# FCS: Autokorrelationsfunktion

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



$\tau_d$  – 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

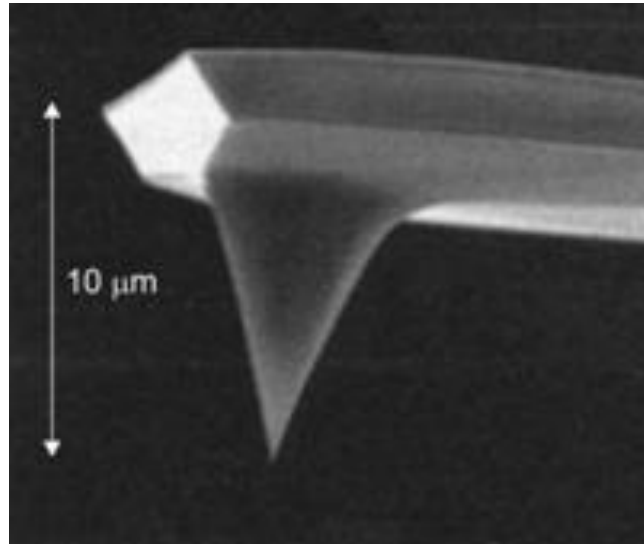
## Konzentration

## Reaktionsgeschwindigkeit

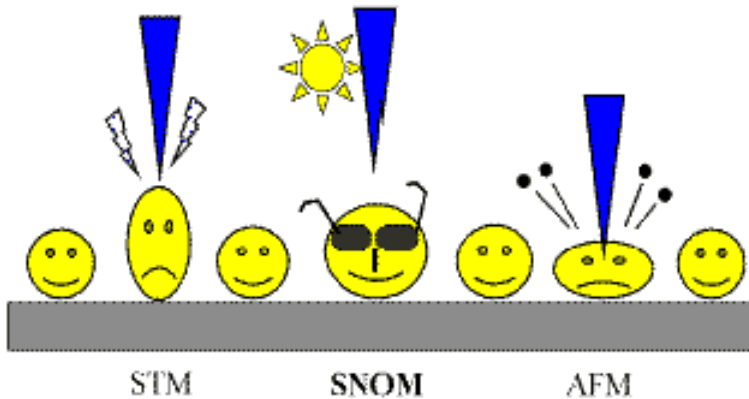
## Diffusion in der Inneren der Zellen

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

# RASTERSONDENMIKROSKOPE



# Rastermikroskope (Scanning Probe Microscopes)



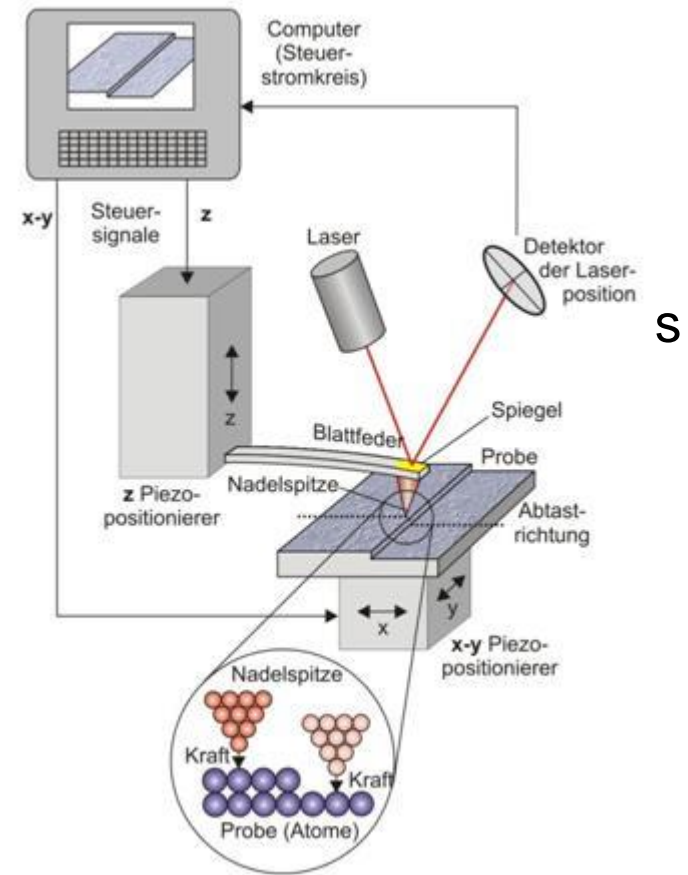
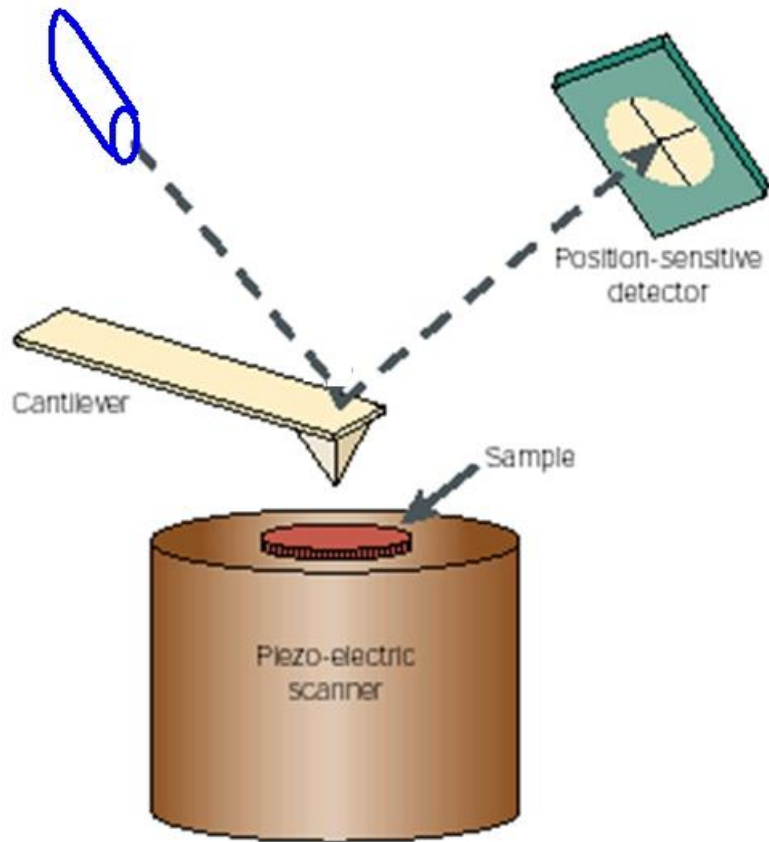
STM:  
Scanning Tunneling Microscope  
Rastertunnelmikroskop

SNOM:  
Scanning Nearfield Optical Microscope

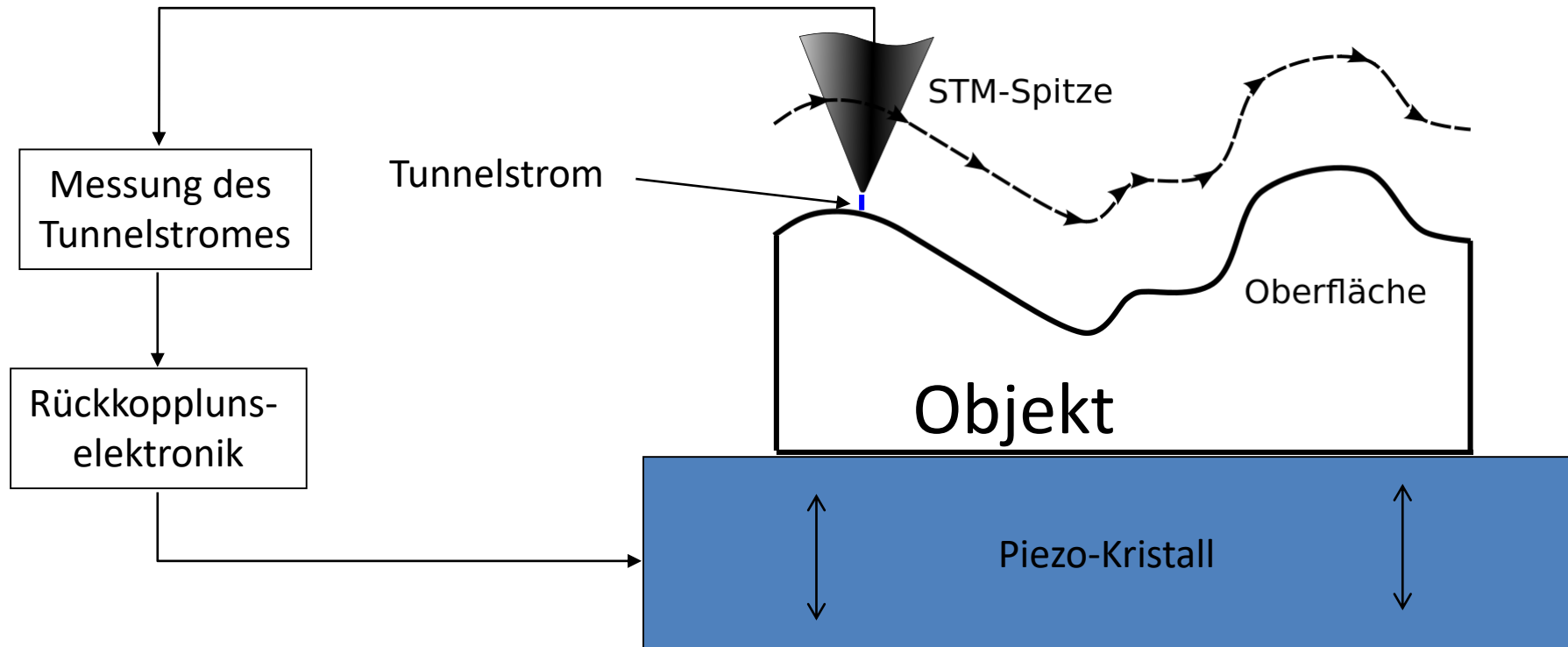
AFM:  
Atomic Force Microscope  
Rasterkraftmikroskop  
(Atomkraftmikroskop)

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

# Rasterkraftmikroskop (Atomkraftmikroskop) (Atomic Force Microscope-AFM)



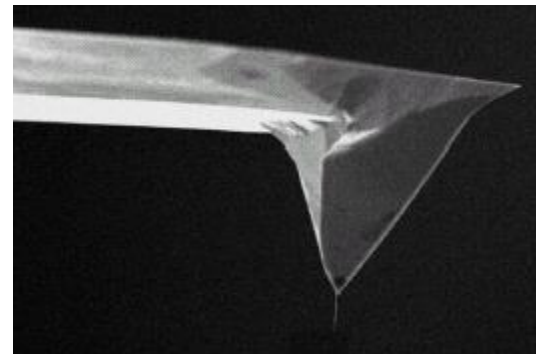
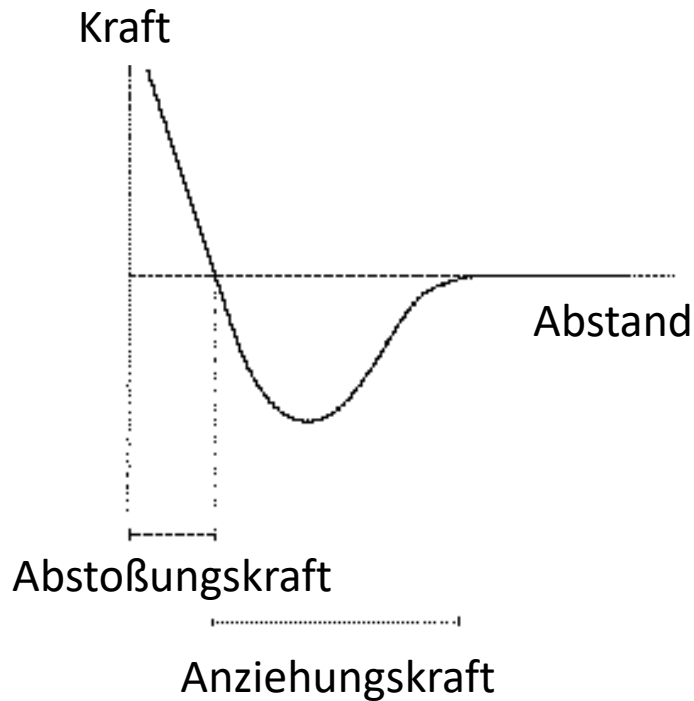
# Rastertunnelmikroskop



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!





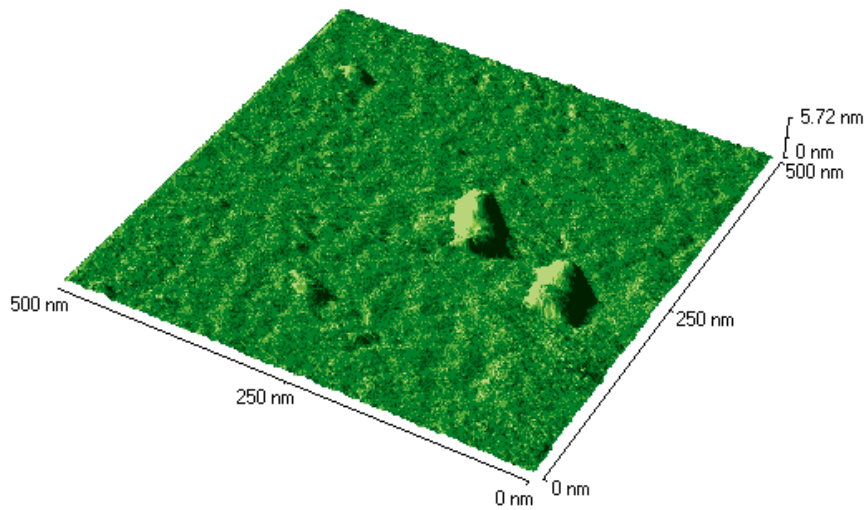
# AFM Messmethoden



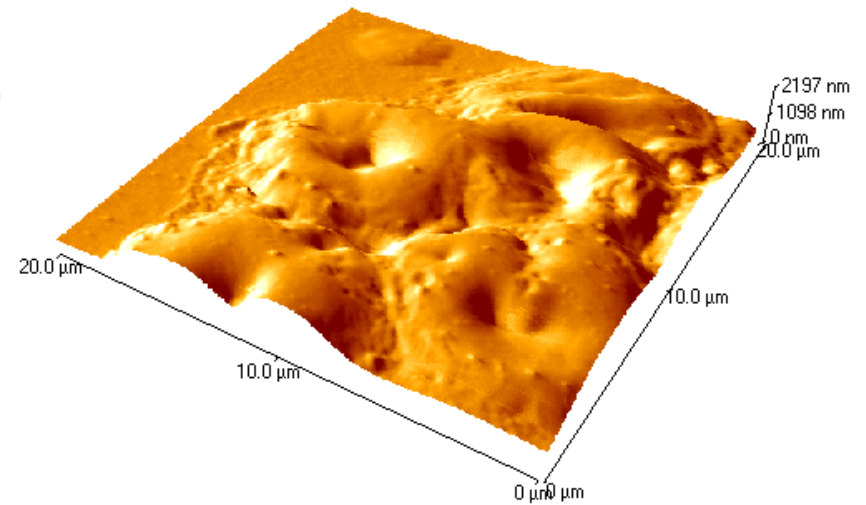
- Kontakt-Modus
- Der intermittierende Modus  
(engl.: *intermittent contact mode*, oder *tapping mode* genannt)

# AFM Aufnahmen

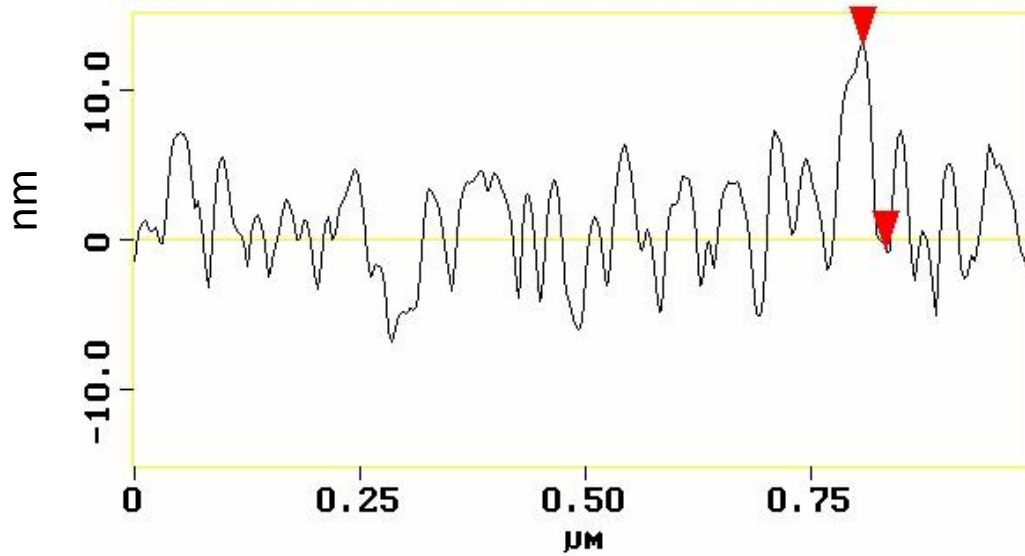
Hitzeschockproteine



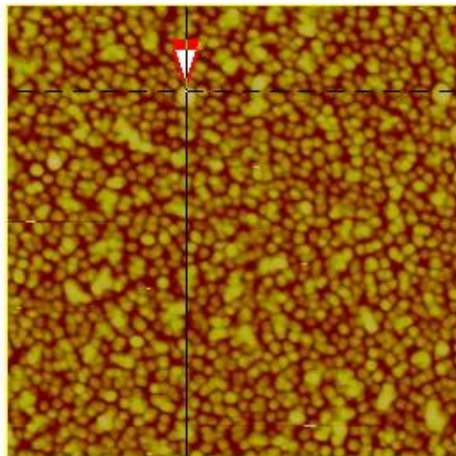
Rote blutzellen



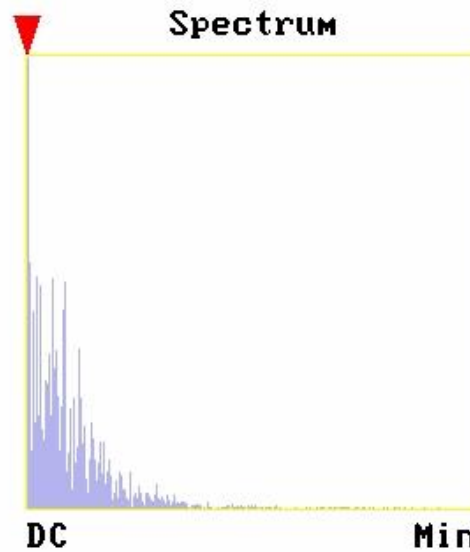
# AFM Aufnahmen



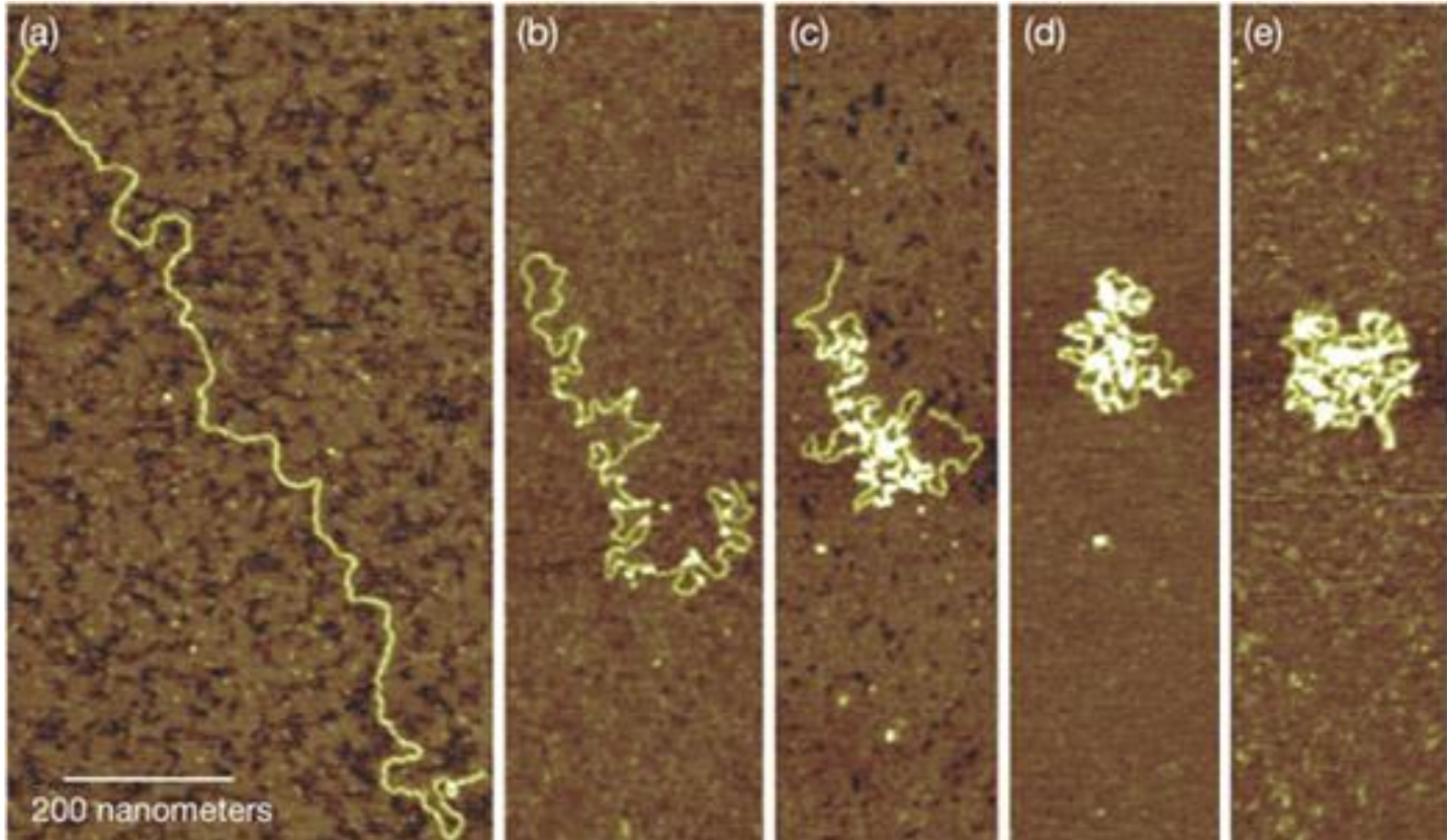
Alpha-Crystallin  
Aggregate



acryins1.004



# DNS



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>)