

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

Balázs Kiss

kissb3@gmail.com



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

16. November 2022.

Strukturuntersuchungsmethoden in der medizinischen Forschung

1. Spektroskopische Verfahren

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

2. Mikroskopie

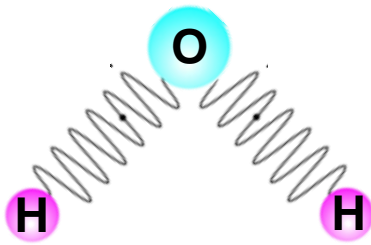
- a) Lichtmikroskop
- b) Spezielle Lichtmikroskope (Stereo-, Polarisations-, Phasenkontrast-, Fluoreszenzmikroskop, CLSM)
- c) Superresolutionsmikroskope (SIM, STED)
- d) Elektronenmikroskope (TEM, SEM)
- e) Rastersondenmikroskope (AFM)

3. Diffraktionsmethoden

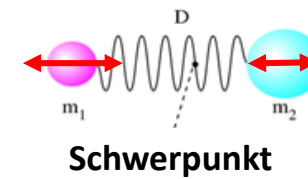
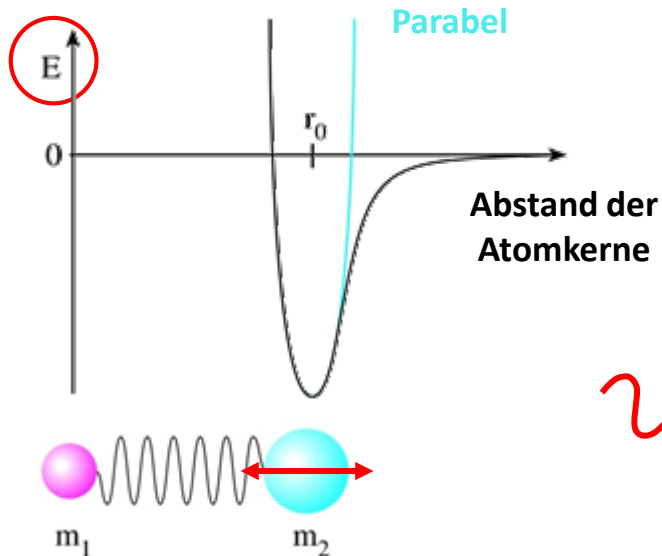
- a) Röntgendiffraktion
- b) Elektronendiffraktion
- c) Neutronendiffraktion

Spektroskopische Verfahren

Infrarotspektroskopie



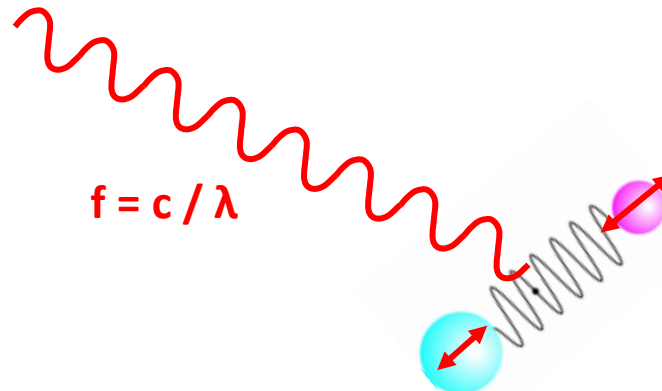
- Infrarotes Licht (IR): $\lambda = 800 \text{ nm} - 1000 \text{ }\mu\text{m}$ \longrightarrow Nahe IR (NIR): $800 \text{ nm} - 2,5 \text{ }\mu\text{m}$
Mittleres IR (MIR): $2,5\text{-}50 \text{ }\mu\text{m}$
- Ein Typ der Absorptionsspektroskopie
 Ferne IR (FIR): $50 \text{ }\mu\text{m} - 1000 \text{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



Eigenfrequenz
der Schwingung:

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

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

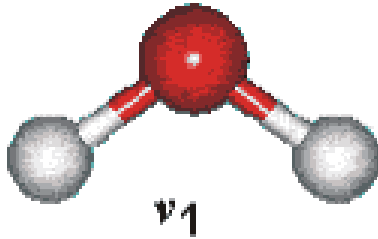


$$E_{Feder} = \frac{1}{2} D \cdot \Delta x^2 \quad \text{Parabel}$$

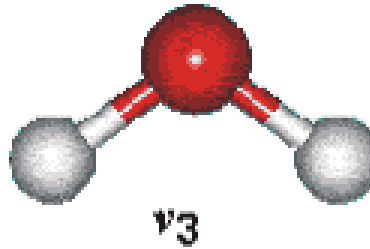
$$D \sim 1000 \text{ N/m}$$

$$f_0 \sim 5 \cdot 10^{13} \text{ Hz}$$

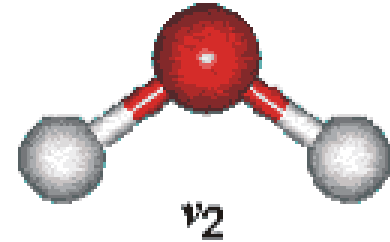
Mehratomige Moleküle: Die Schwingungen des Wassers



**Symmetrische
Valenzschwingung**

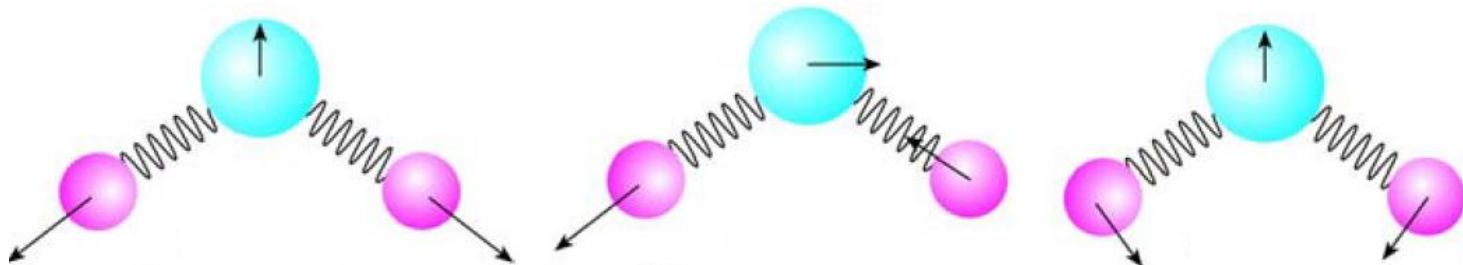


**Antisymmetrische
Valenzschwingung**



**Deformations-
schwingung**

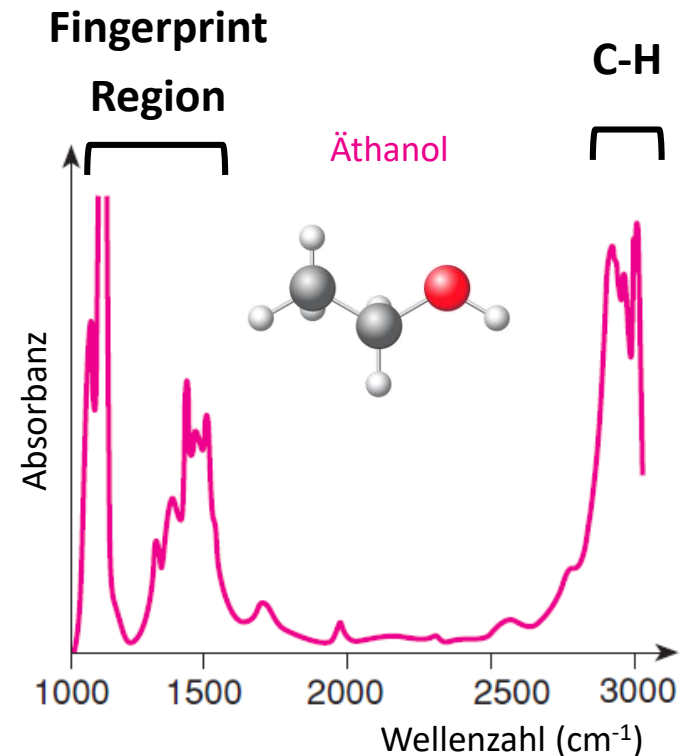
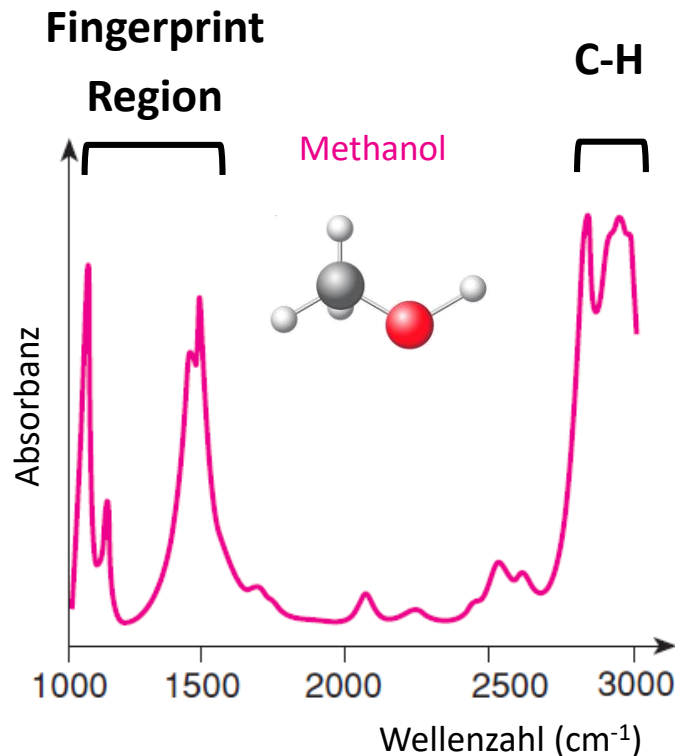
- Alle Atome schwingen mit **derselben Frequenz** aber mit **unterschiedlichen Amplitude und Richtung**.
- Die Atome müssen **elektrisches Dipolmoment (p)** besitzen: $p = q \cdot d$



Anwendung: Identifizierung der Moleküle, Beweis des Raumstrukturs

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

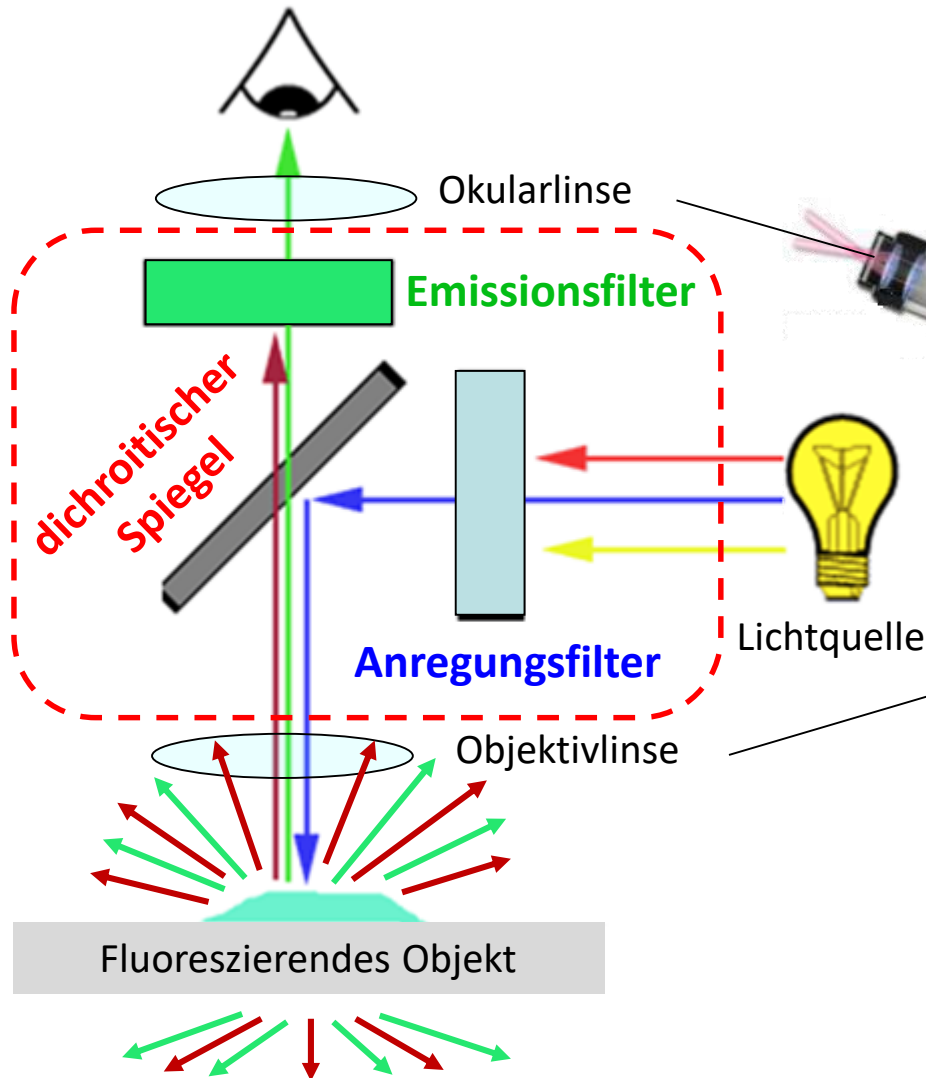
$$\nu = \frac{1}{\lambda} \quad \nu: [\text{m}^{-1}, \text{cm}^{-1}] \quad \text{direkt proportional zur Photonenenergie}$$



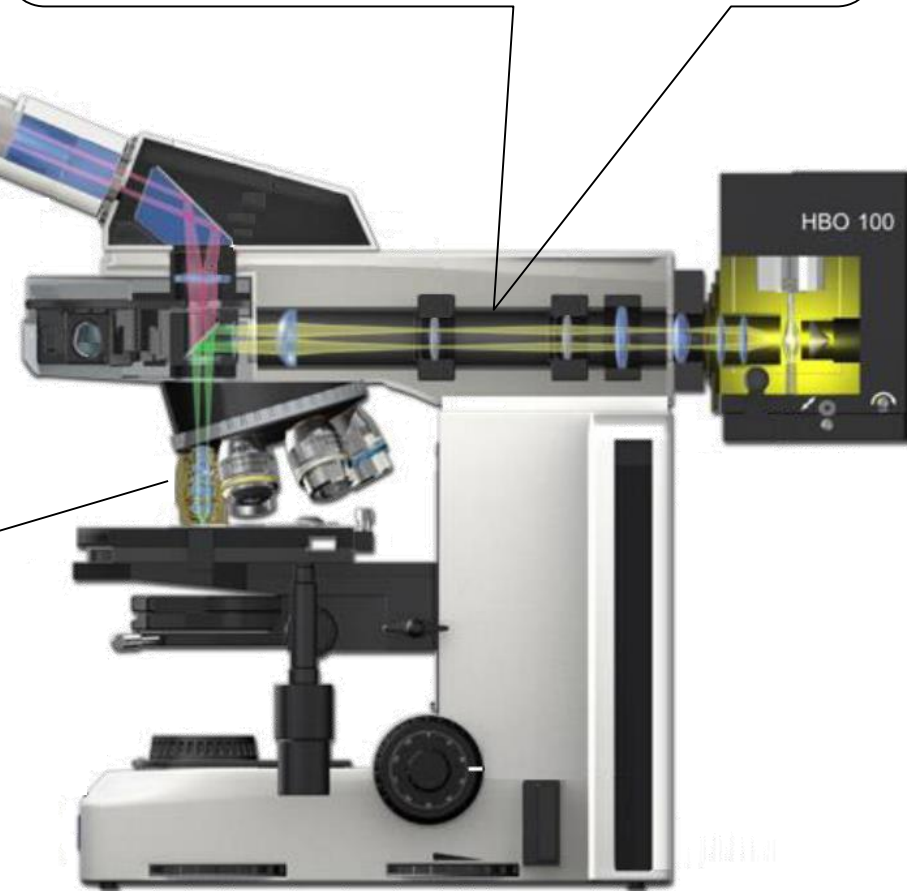
Spezielle Lichtmikroskope

Fluoreszenzmikroskop 1.

Epifluoreszenz-Anordnung:

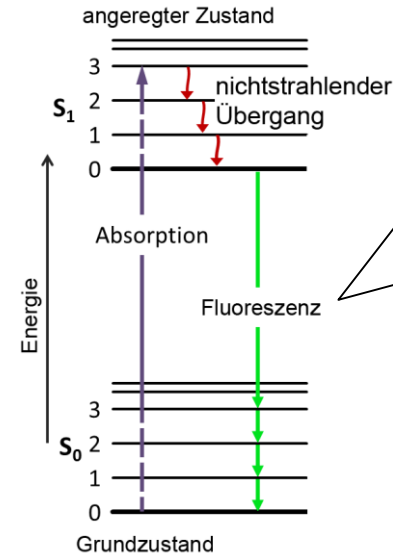
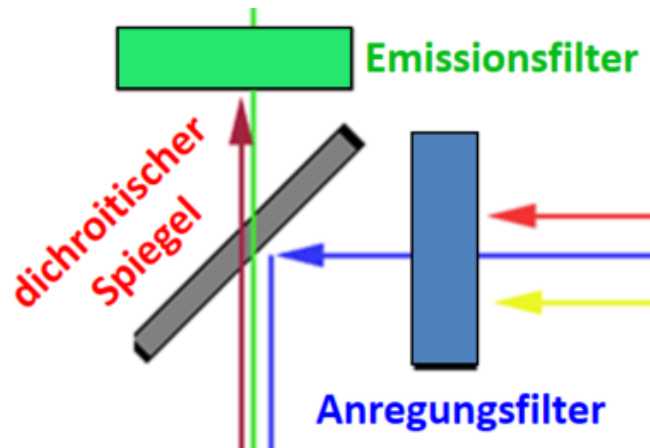


„Auflicht-Fluoreszenzmikroskop“:
Anregungslicht wird über das Objektiv in
das Präparat eingestrahlt.



Fluoreszenzmikroskop 2.

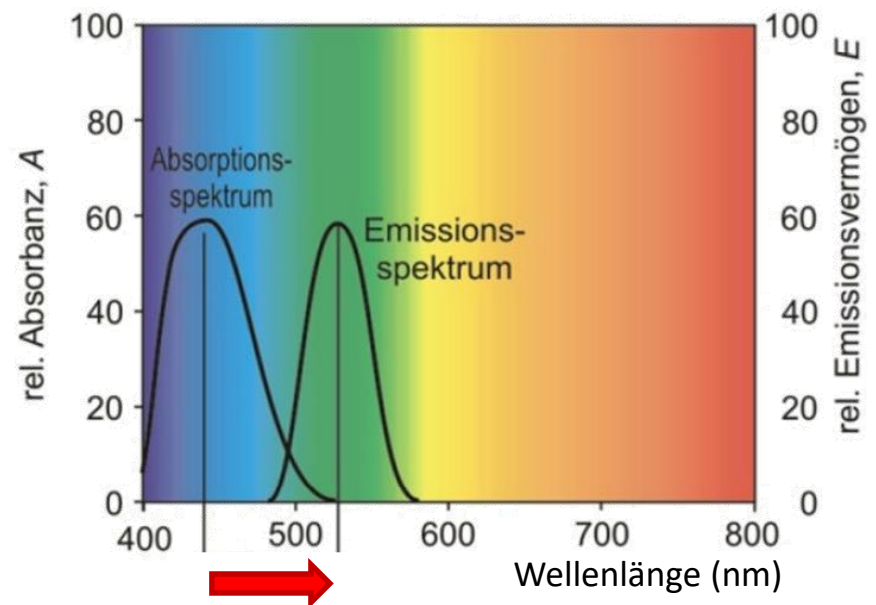
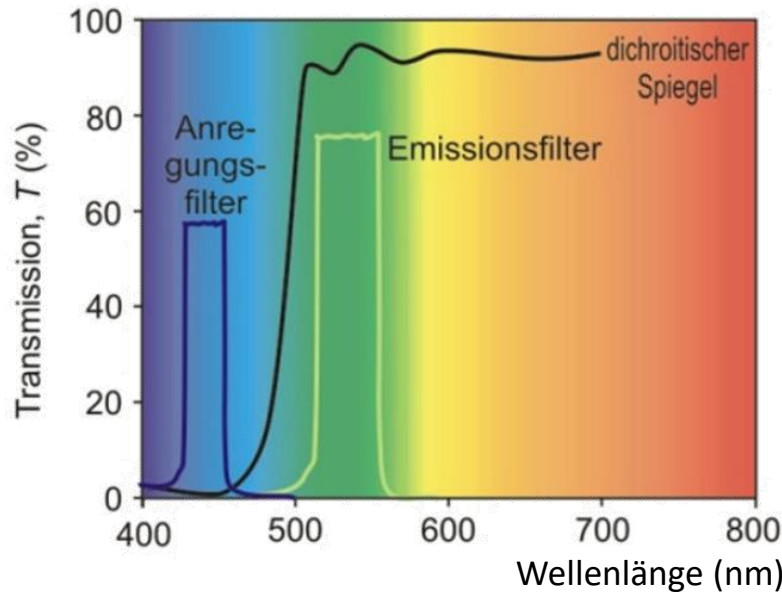
Physikalische Grundlagen:



Stokes-Verschiebung:

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

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



Fluoreszenzmikroskop 3.

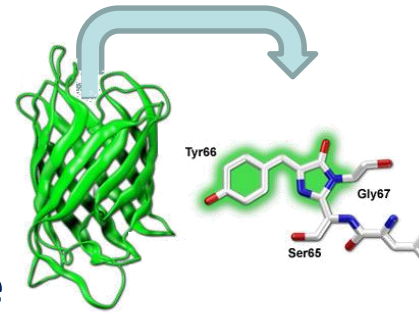
Angewandte fluoreszierende Farbstoffe:

Intrinsic Fluorophore: „Eigenfluoreszenz“

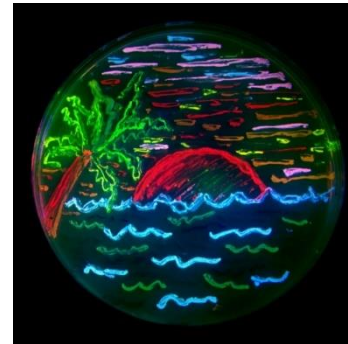
- Tryptophan, Tyrosin, Porphyrine

Extrinsic Fluorophore: fluoreszierende Stoffe

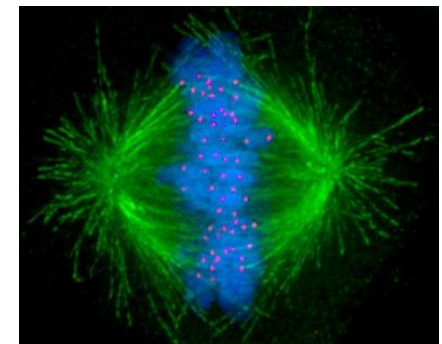
- **Der ideale Fluorophor:**
 - klein
 - hydrophil
 - emittiert im sichtbaren Lichtbereich
 - große Stokes-Verschiebung
 - spezifische Bindung
 - verursacht keine photochemische Reaktionen
- **fluoreszierende Proteine:**
 - GFP: Green Fluorescent Protein
 - FMN-bindende: Flavinmononukleotid



Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

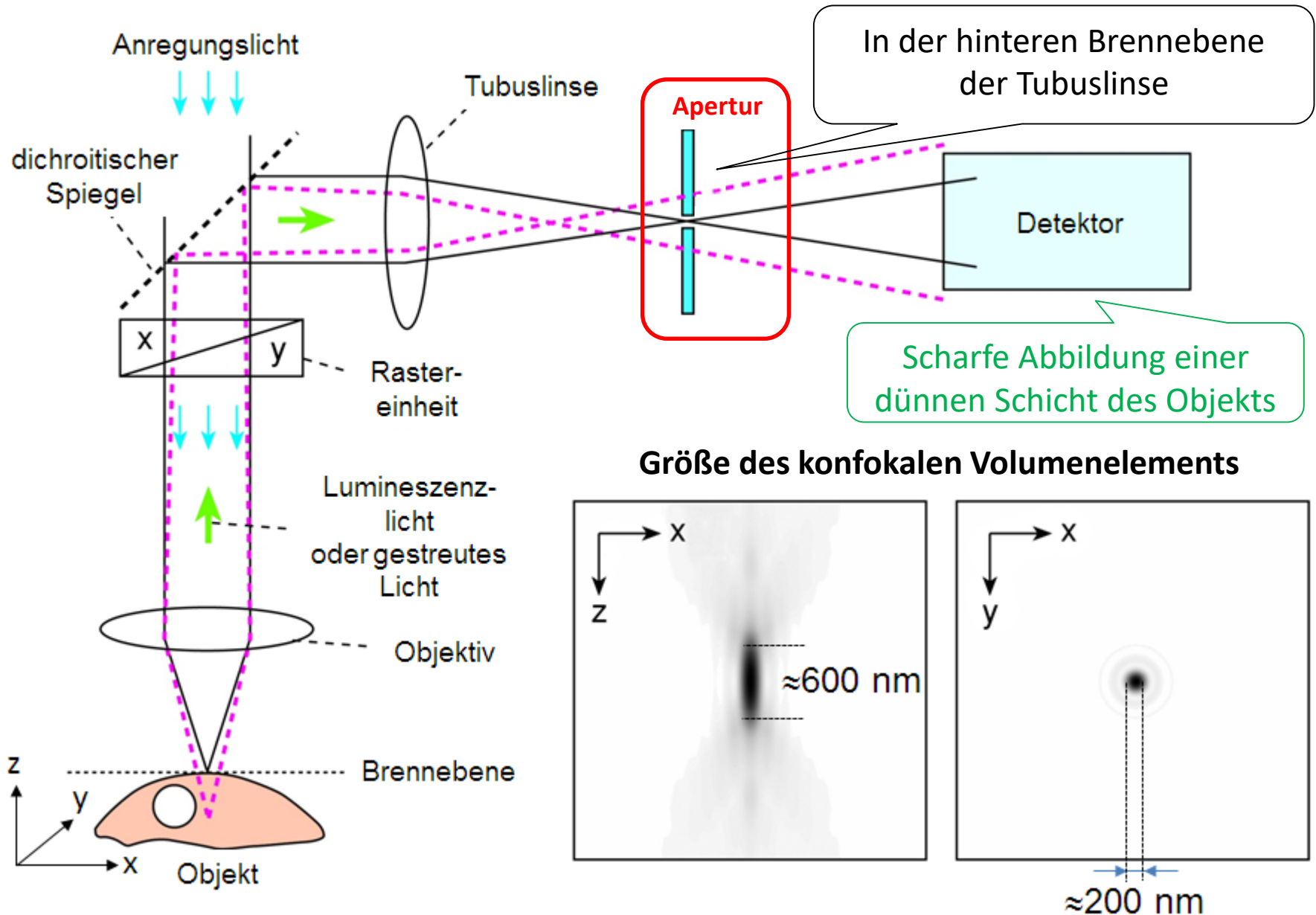


Bakterienkulturen, die verschiedene fluoreszierende Proteine exprimieren



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

Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)

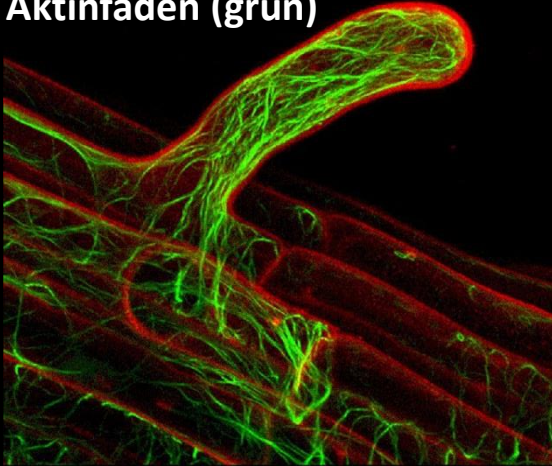


Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM): Funktionsprinzip

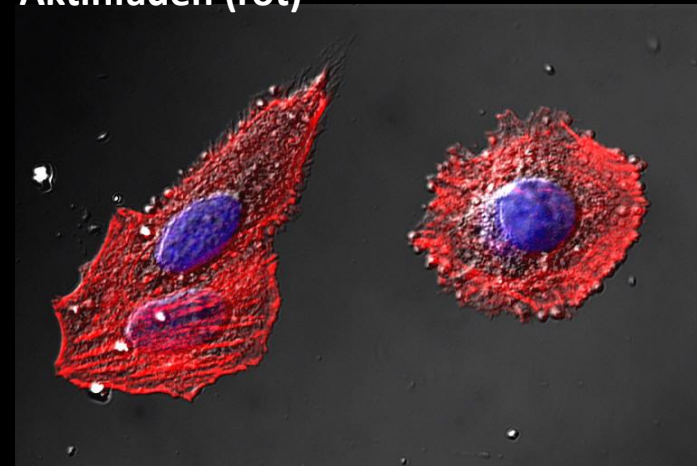
**Fluorescence
and confocal
microscopes**

Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 1.

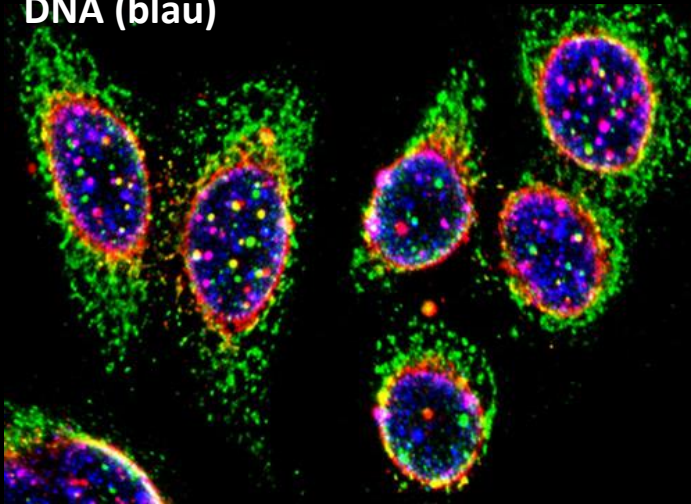
Aktinfaden (grün)



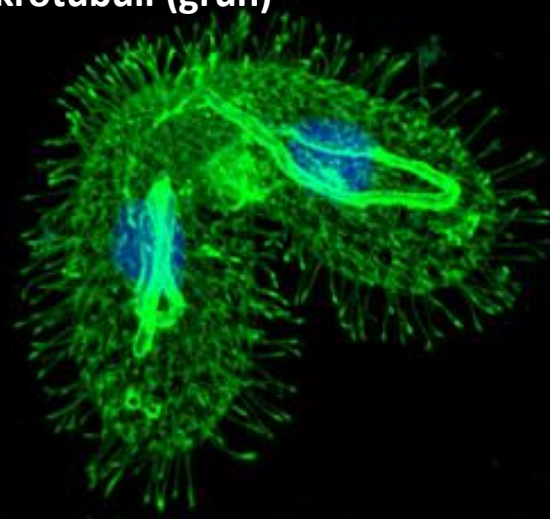
Aktinfaden (rot)



DNA (blau)



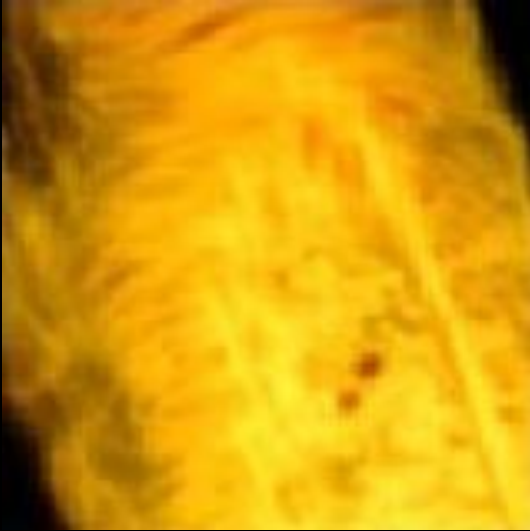
Mikrotubuli (grün)



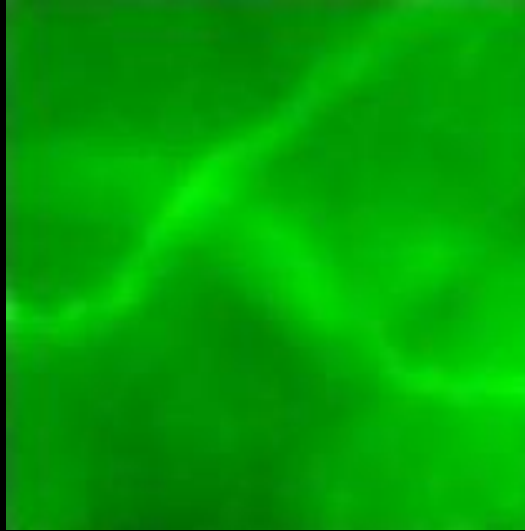
Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 2.

Fluoreszenzmikroskop

Medulla



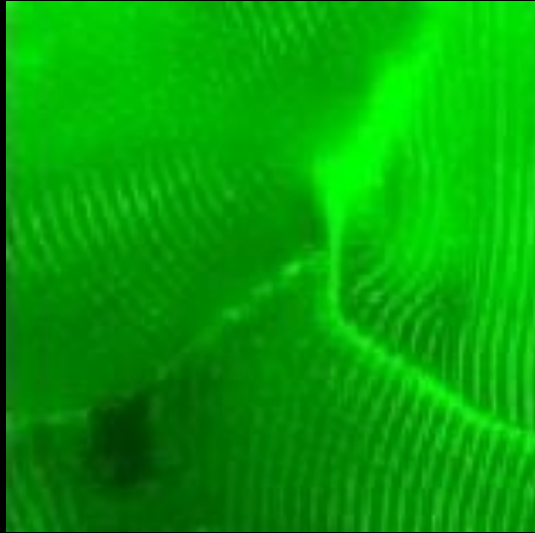
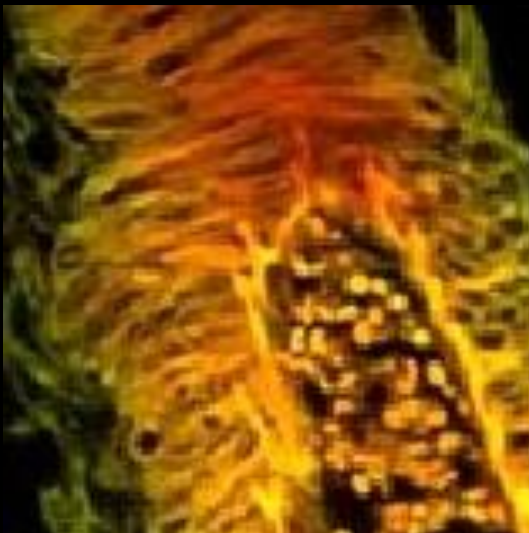
Skelettmuskel



Pollen



CLSM



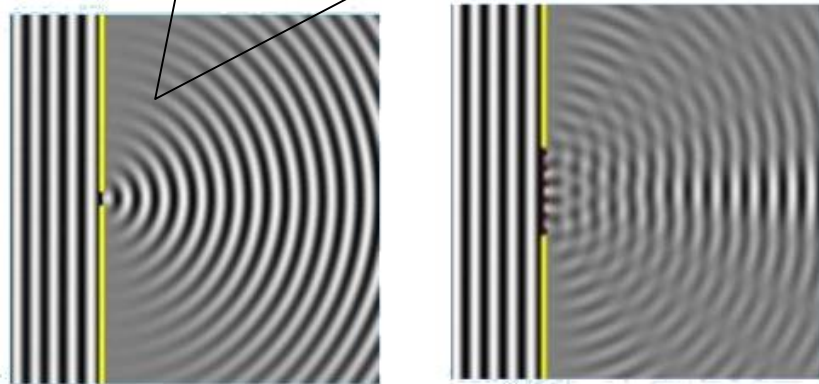
Superresolutionsmikroskope

Grundproblem – 1.

Beugung des Lichtes:

Huygensches Prinzip:

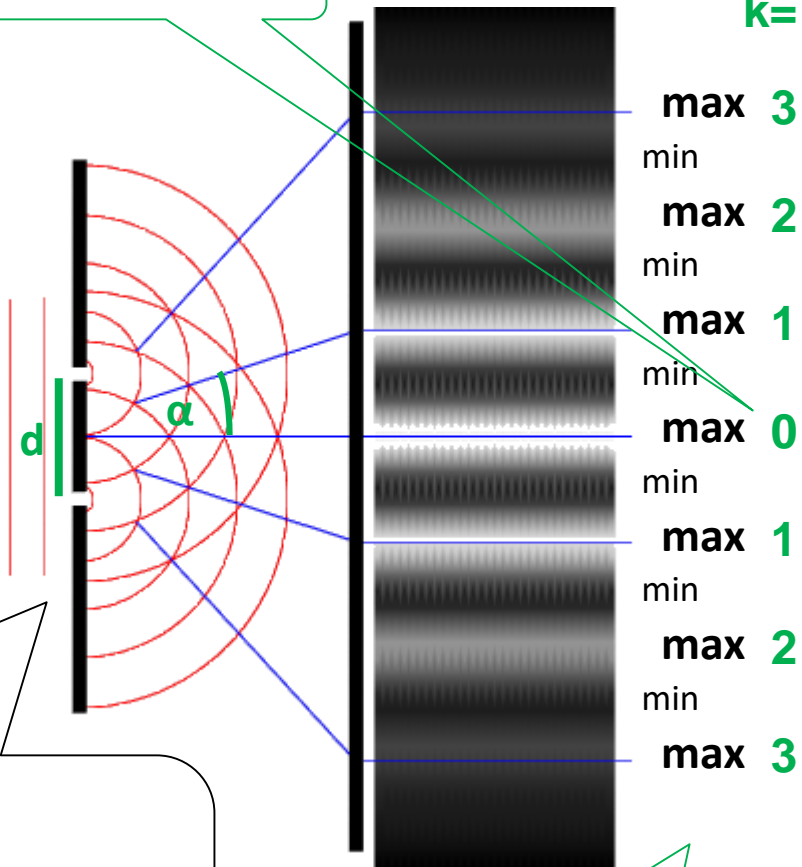
jeder Punkt einer Wellenfront dient als Ausgangspunkt einer neuen Welle



Thomas Young: Doppelspaltexperiment

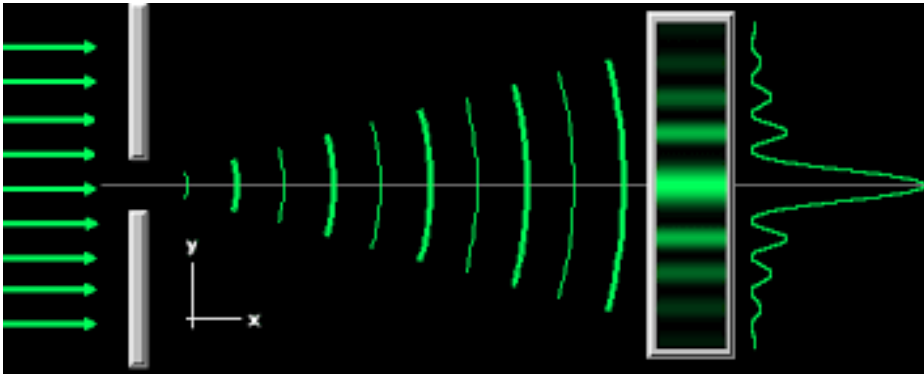
Interferenzmuster entsteht durch Beugung der Wellenausbreitung am Doppelspalt. Bei monochromatischem Licht besteht dieses Muster auf dem Schirm aus **hellen Streifen (Maxima)** und **dunklen Streifen (Minima)**.

Hauptmaximum



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

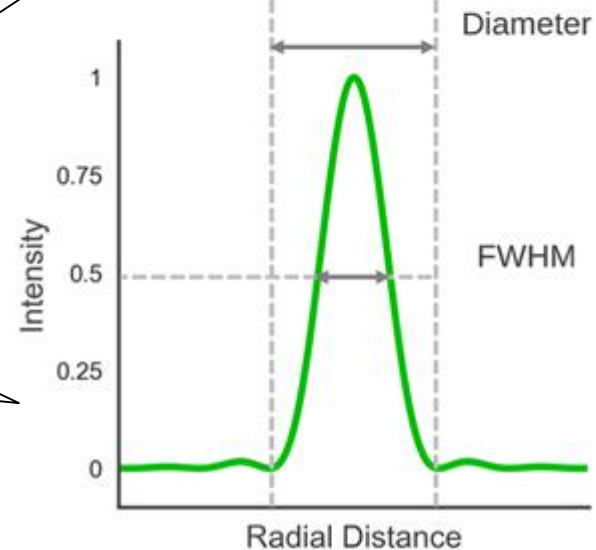
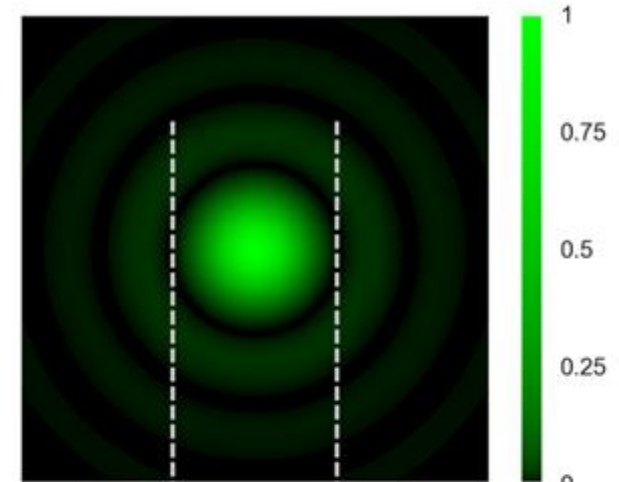
Entstehung der Beugungsscheiben:



Airy-Scheibe:

zentrales Maximum, umgeben von
Ringern abnehmender Intensität.

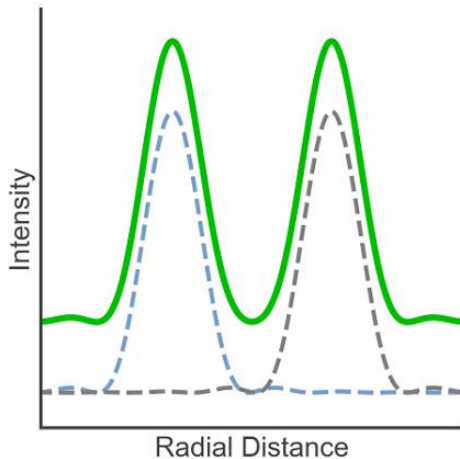
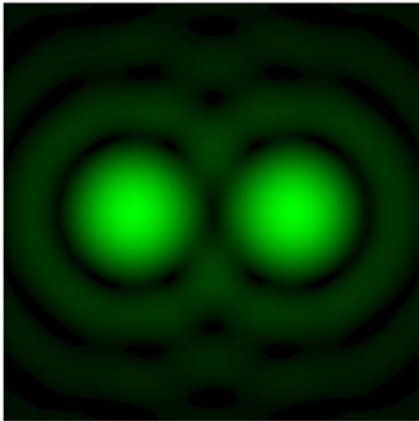
Das zentrale Maximum enthält 84%
der Intensität, die Umgebung enthält
16% der Intensität.



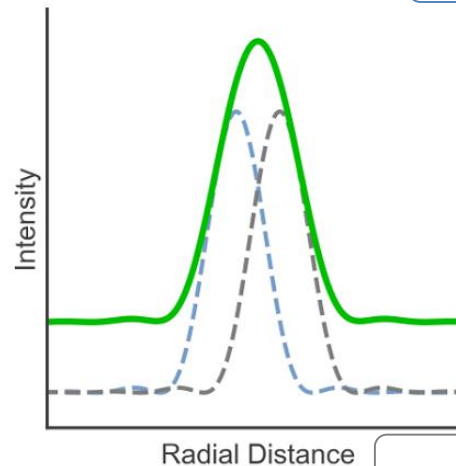
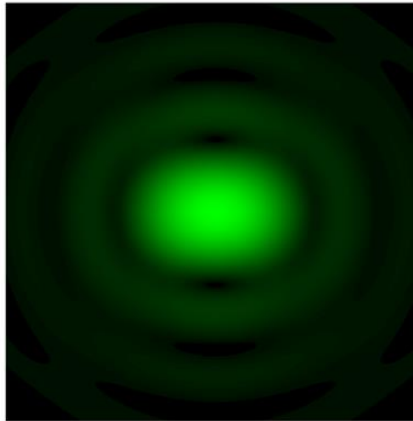
Grundproblem – 3.

Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

auflösbar

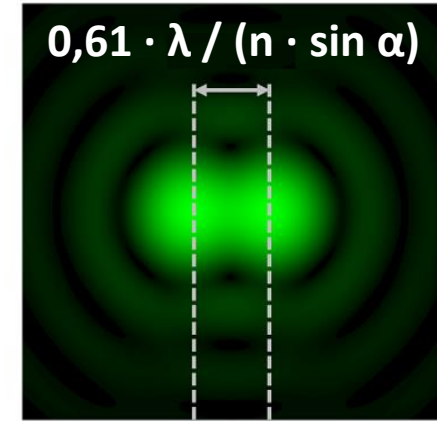


nicht mehr auflösbar



Rayleigh-Grenzfall:

Hauptmaximum stimmt mit dem
ersten Minimum der benachbarten
Beugungsscheibe

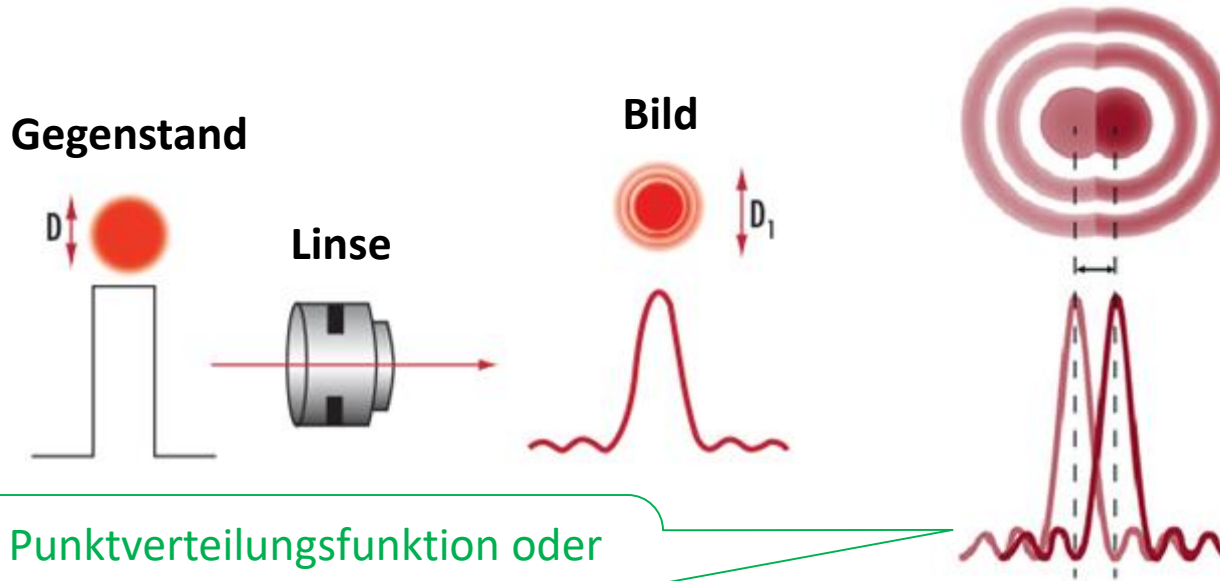


Hauptmaximum

erstes Minimum

Zur Erinnerung

Lichtmikroskop



Punktverteilungsfunktion oder
Punktbildverwaschungsfunktion:
Point Spread Function (PSF)

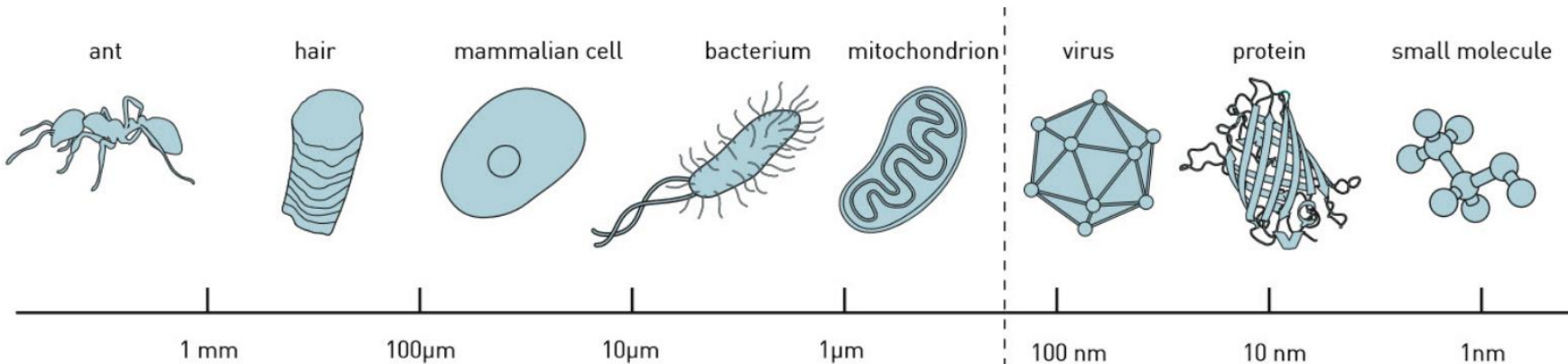
Das Abbesche Prinzip:

Auflösungsgrenze des
Lichtmikroskops:

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

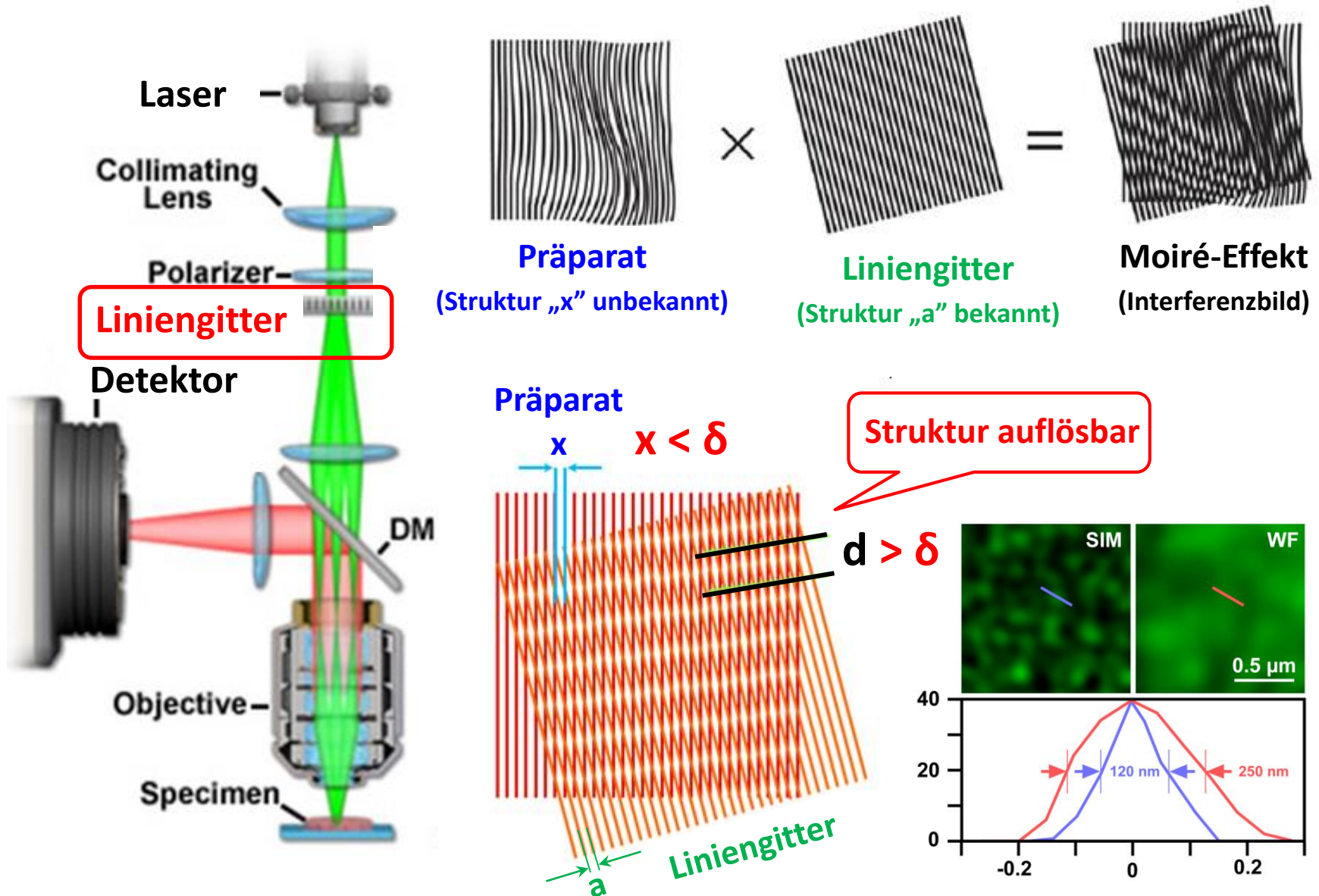
Numerische Apertur
(NA)

Abbe-Limit bei $\sim 200 \text{ nm}$



Mikroskopie mit Strukturierter Beleuchtung (SIM)

Structured Illumination Microscopy

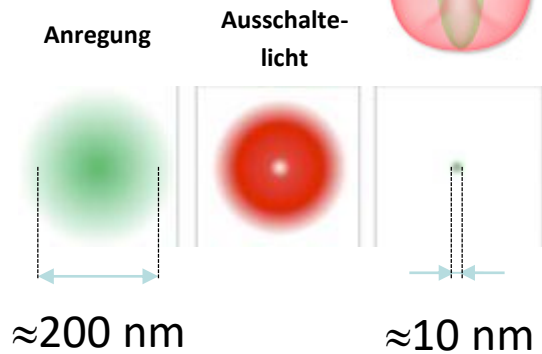
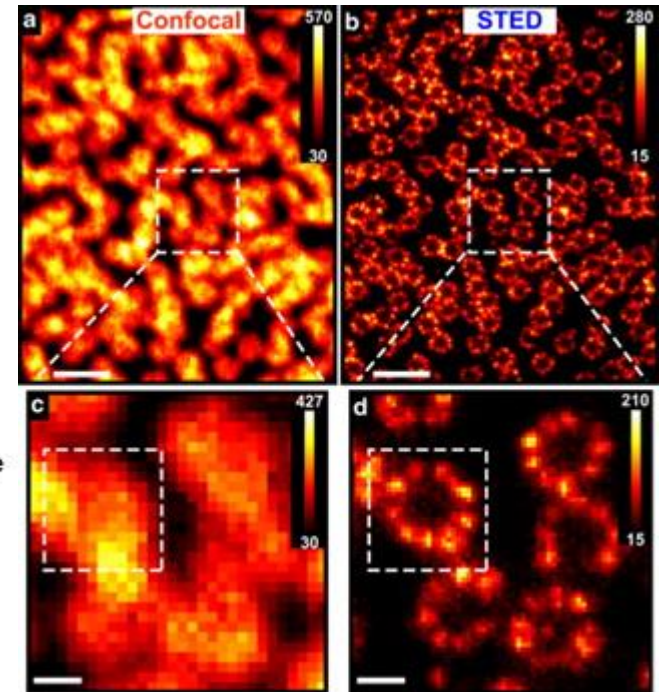
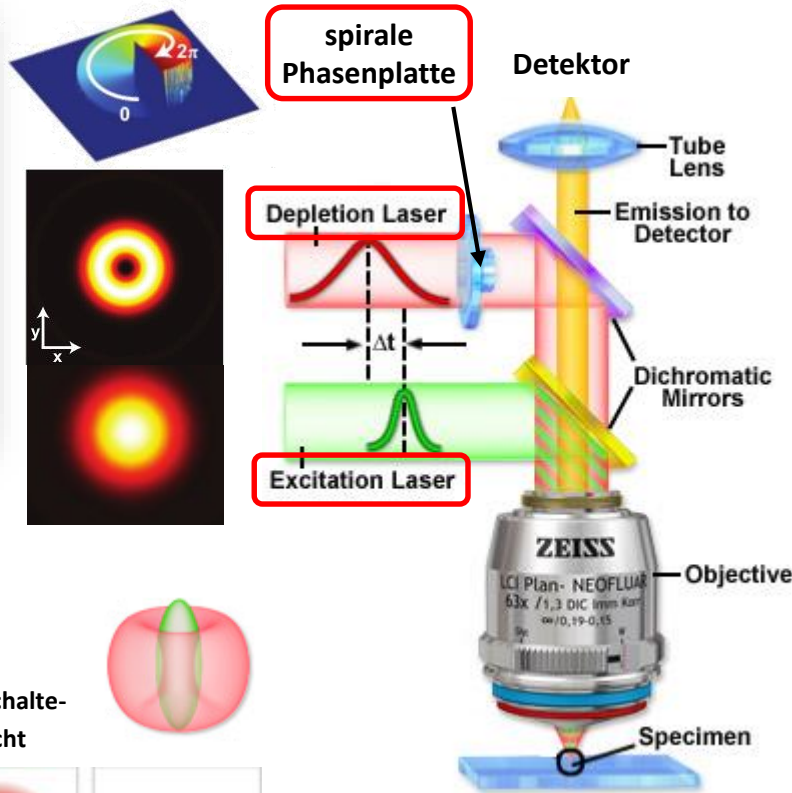


Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)



Stefan W. Hell

Nobel Preis 2014

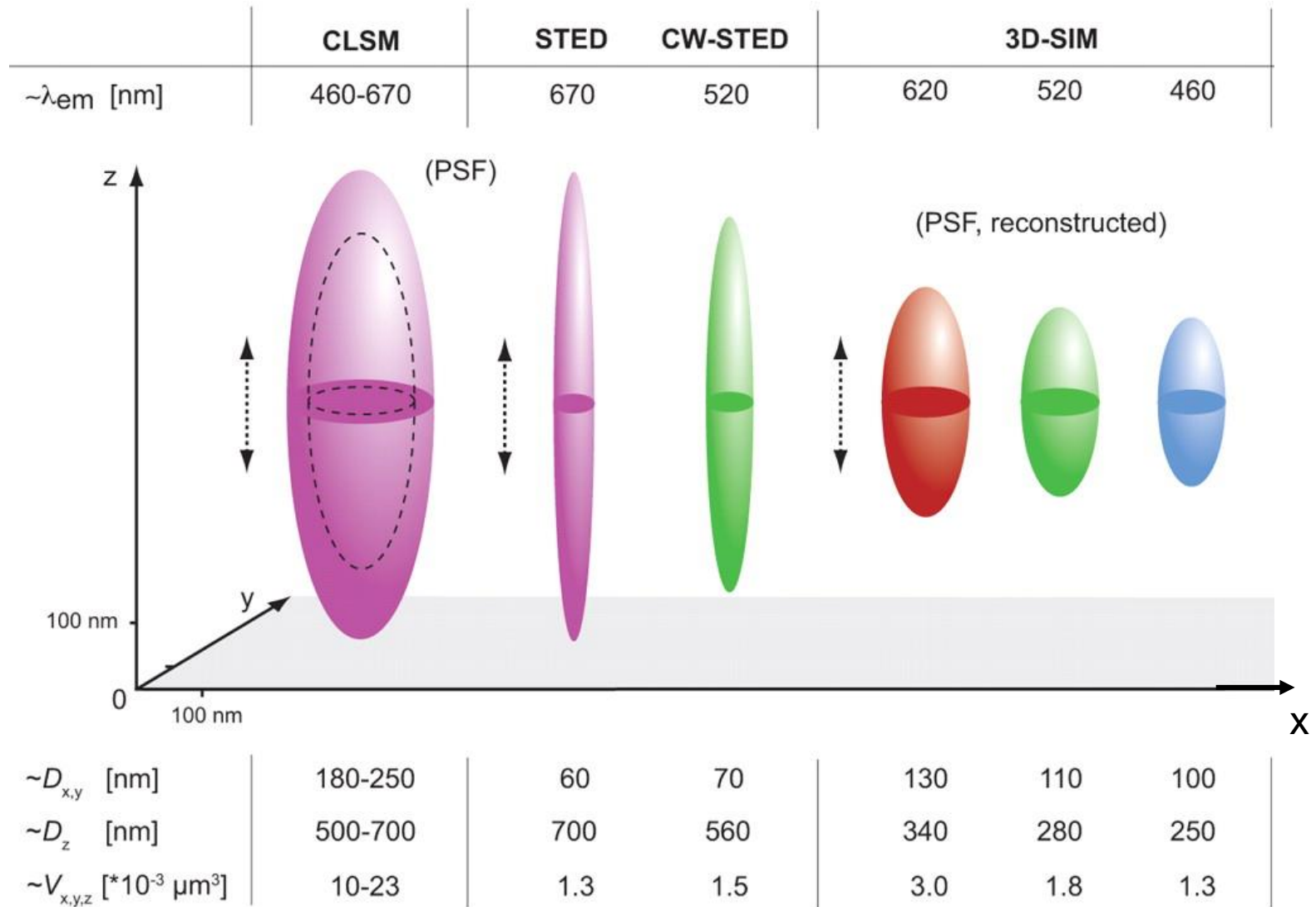


Abbe-Grenze

Superresolution

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

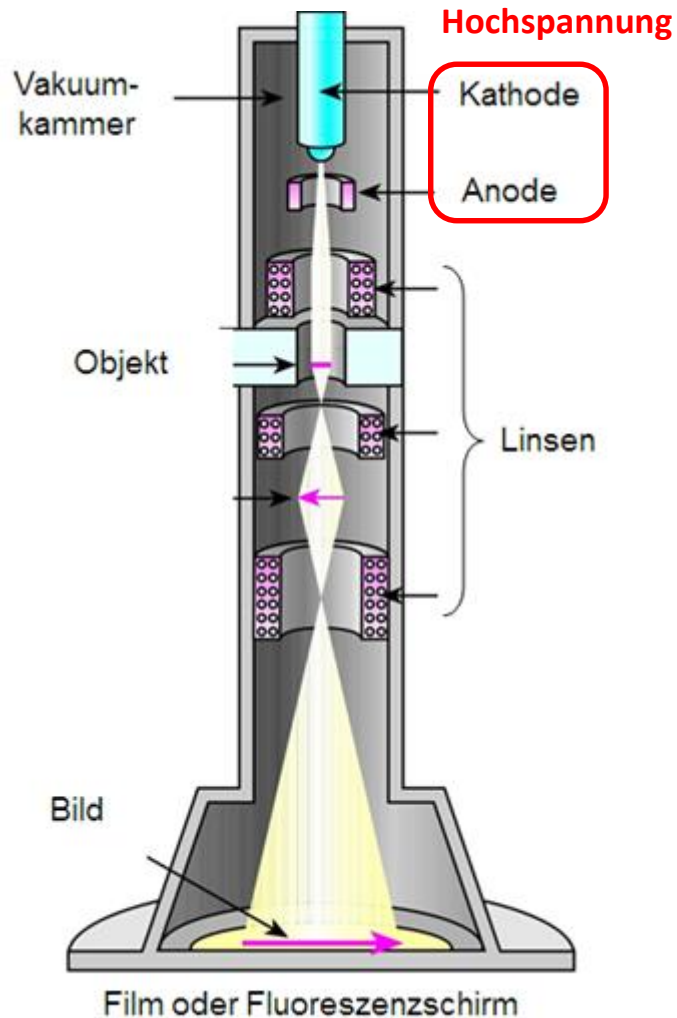
3D-Auflösung der Spezialmikroskope



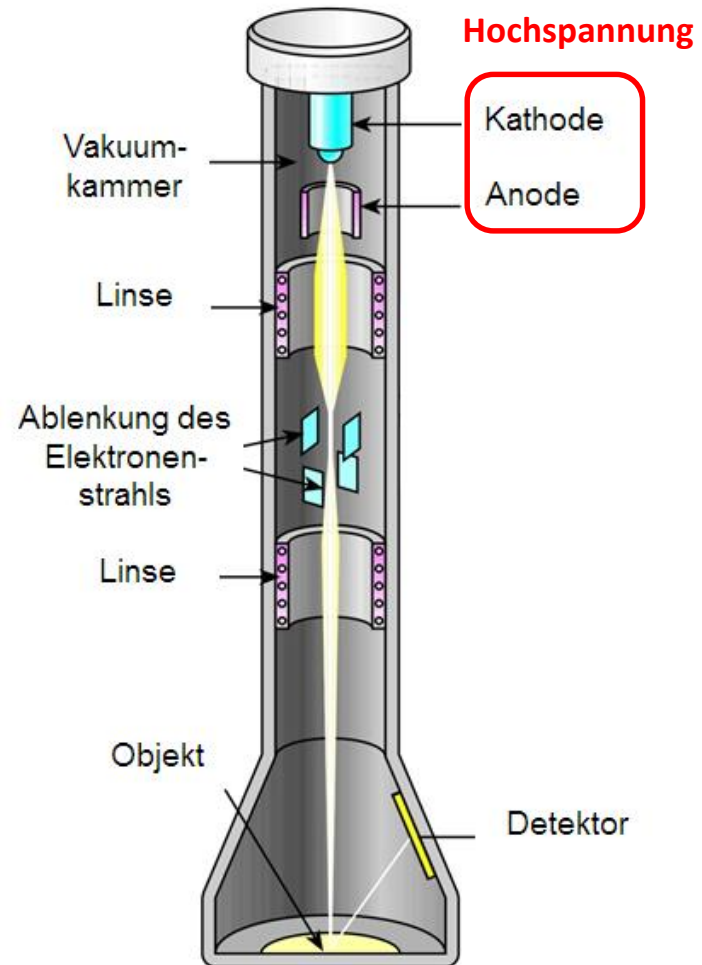
Elektronenmikroskope

Elektronenmikroskope

Transmissions- Elektronenmikroskop (TEM)

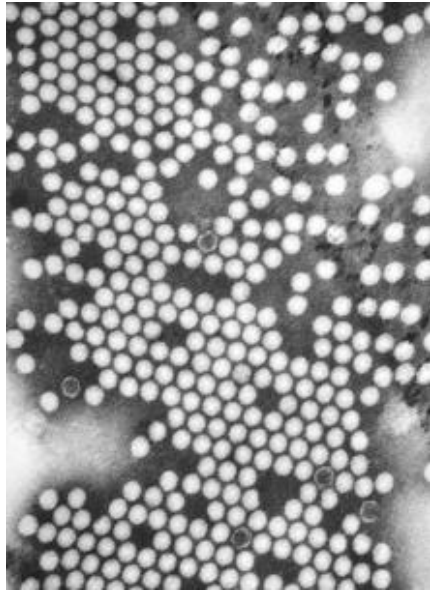


Raster- Elektronenmikroskop (SEM)

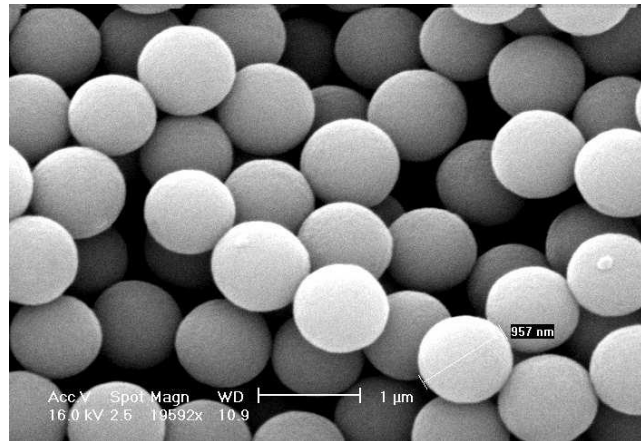


Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugelchen (SEM)



Auflösungsgrenze (δ):

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

$$NA \approx 0,03$$

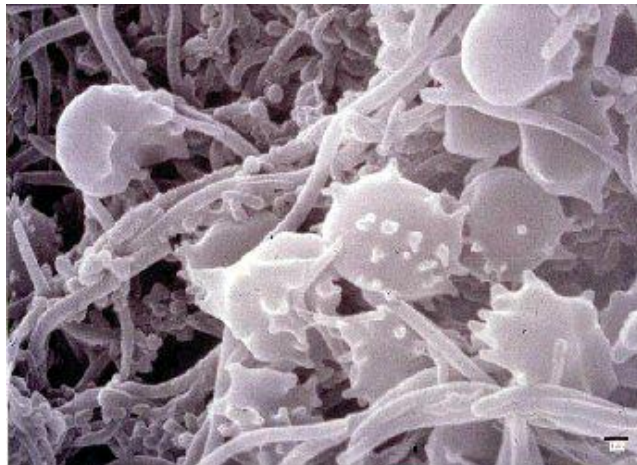
$$\lambda \approx 0,005 \text{ nm}$$

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

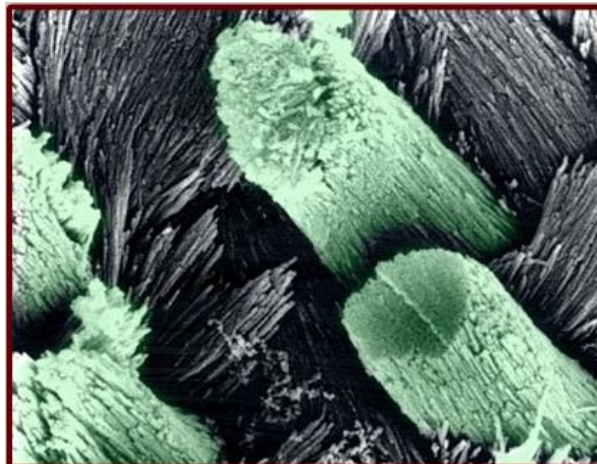
Materiewelle

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

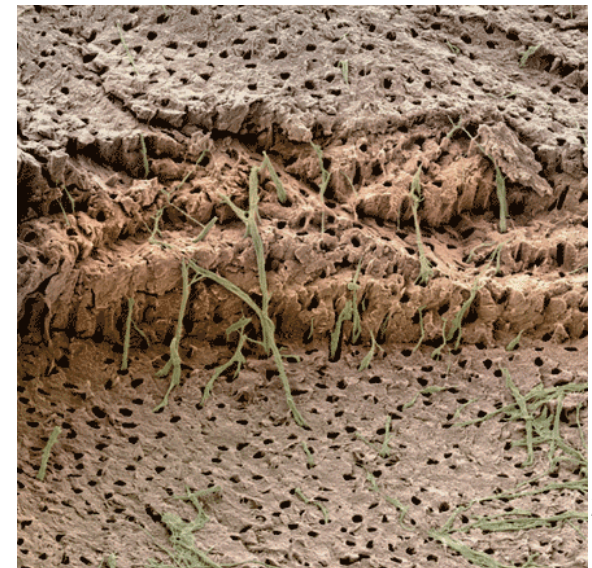
Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den Apatitkristallen (SEM)



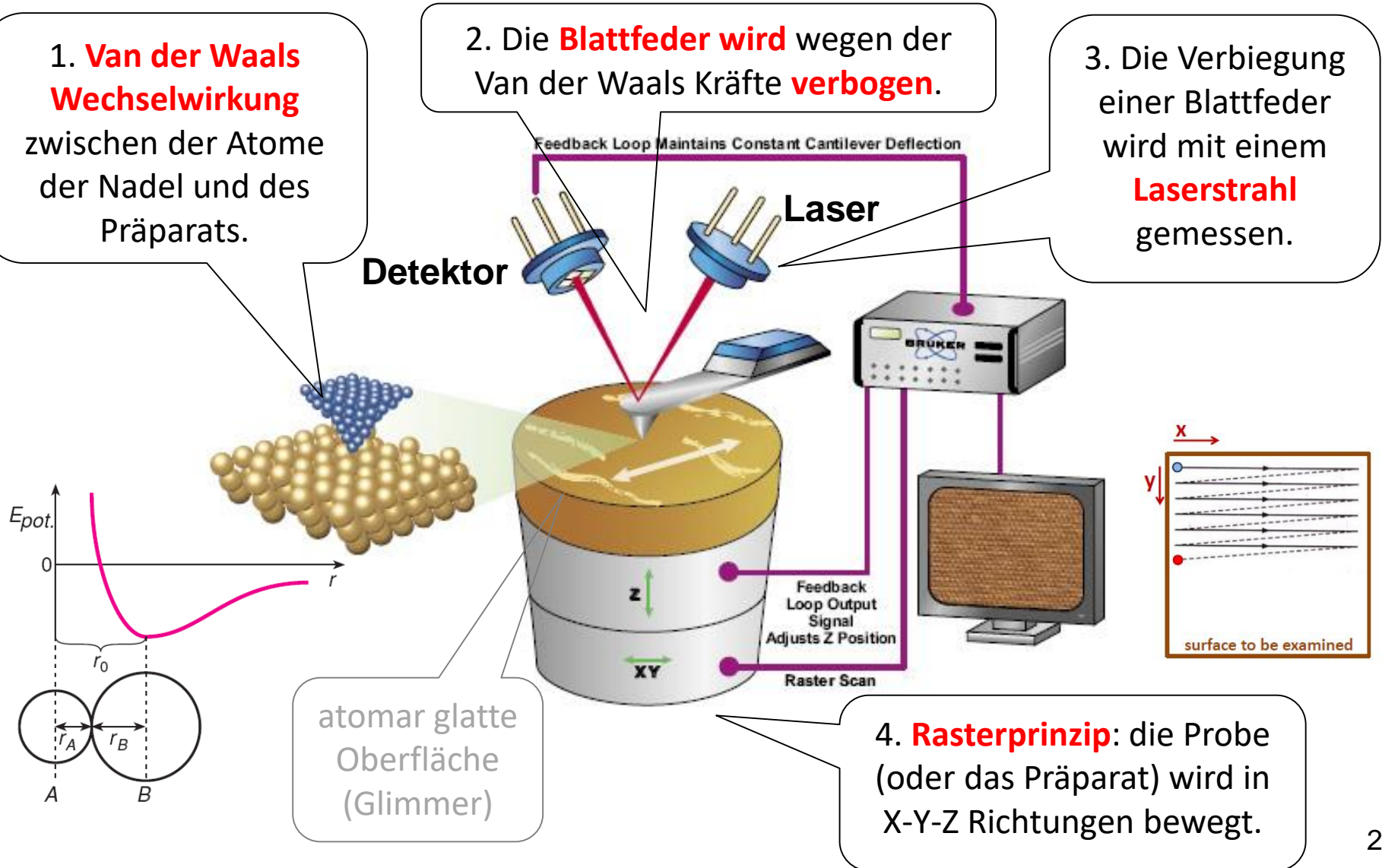
Dentin mit den Odontoblasten (SEM)



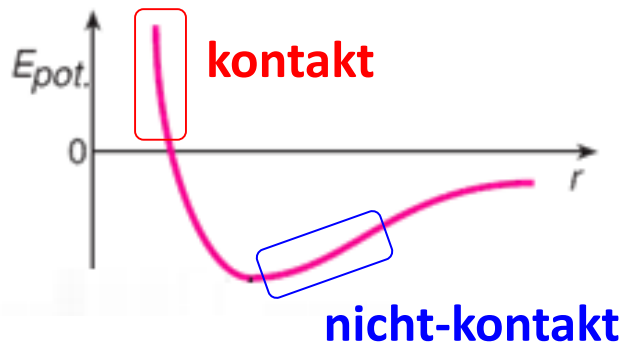
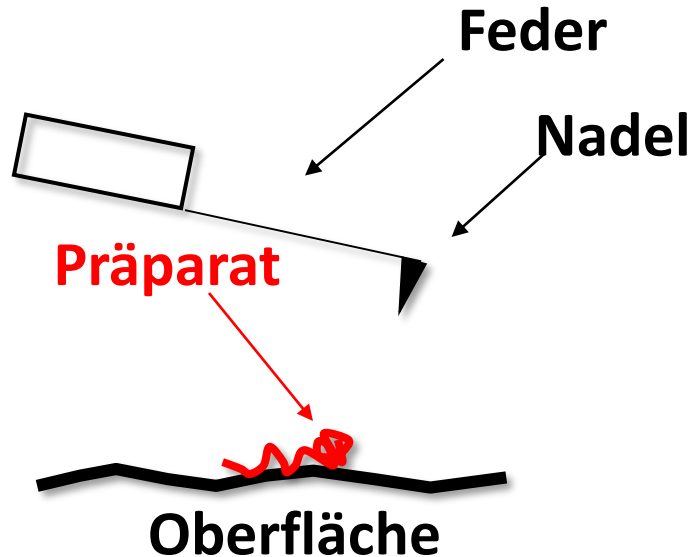
Rastersondenmikroskopie

Rasterkraftmikroskop

(Atomic Force Microscope, AFM)



AFM Betriebsarten



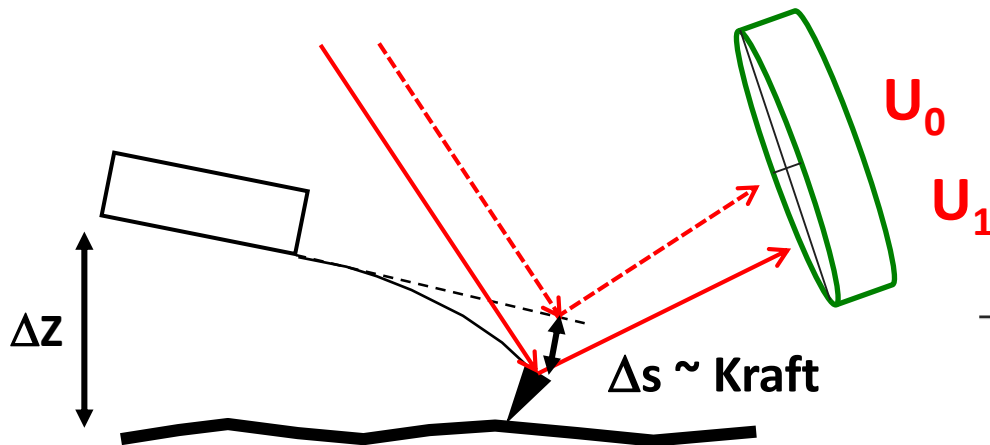
- **Kontakt:** die Messspitze steht in direktem mechanischem Kontakt mit dem Präparat, die **Auslenkung der Feder** liefert die topographische Information.
 - **Z-Rückkopplung:** die Auslenkung des Cantilevers und damit die Kraft zwischen Spitze und Probe wird mit dem „Setpoint“ verglichen. Die Regelung 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

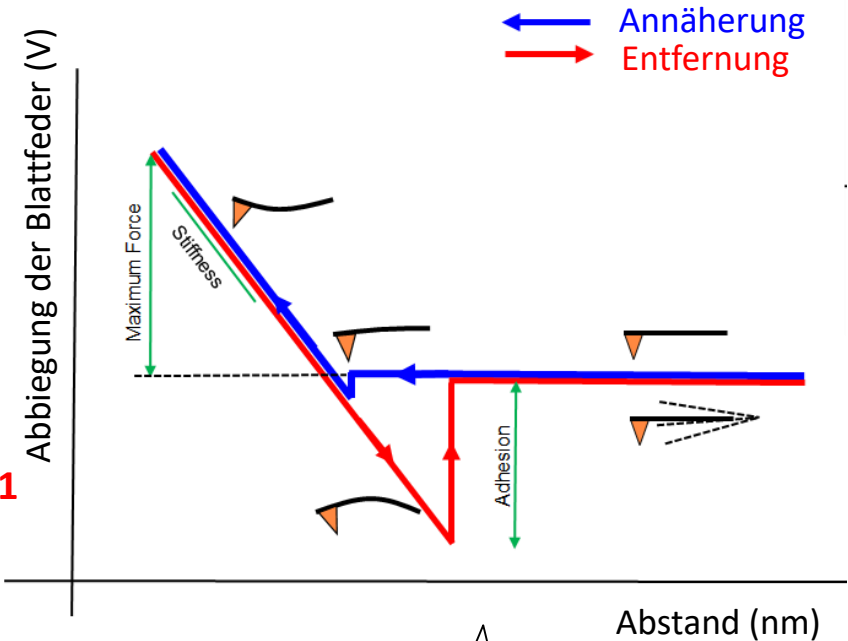
Detektor
(Photodiode)



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

Δs : Abbiegung der Blattfeder

D: Federkonstante

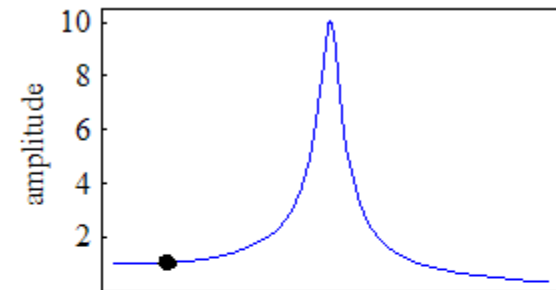
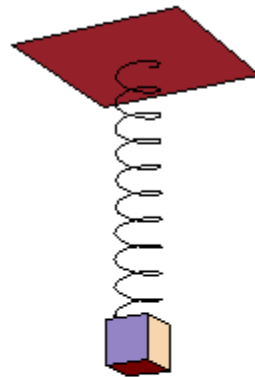


Kraftmessung /
Elastizitätsmessung an
biologischen Präparaten

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.

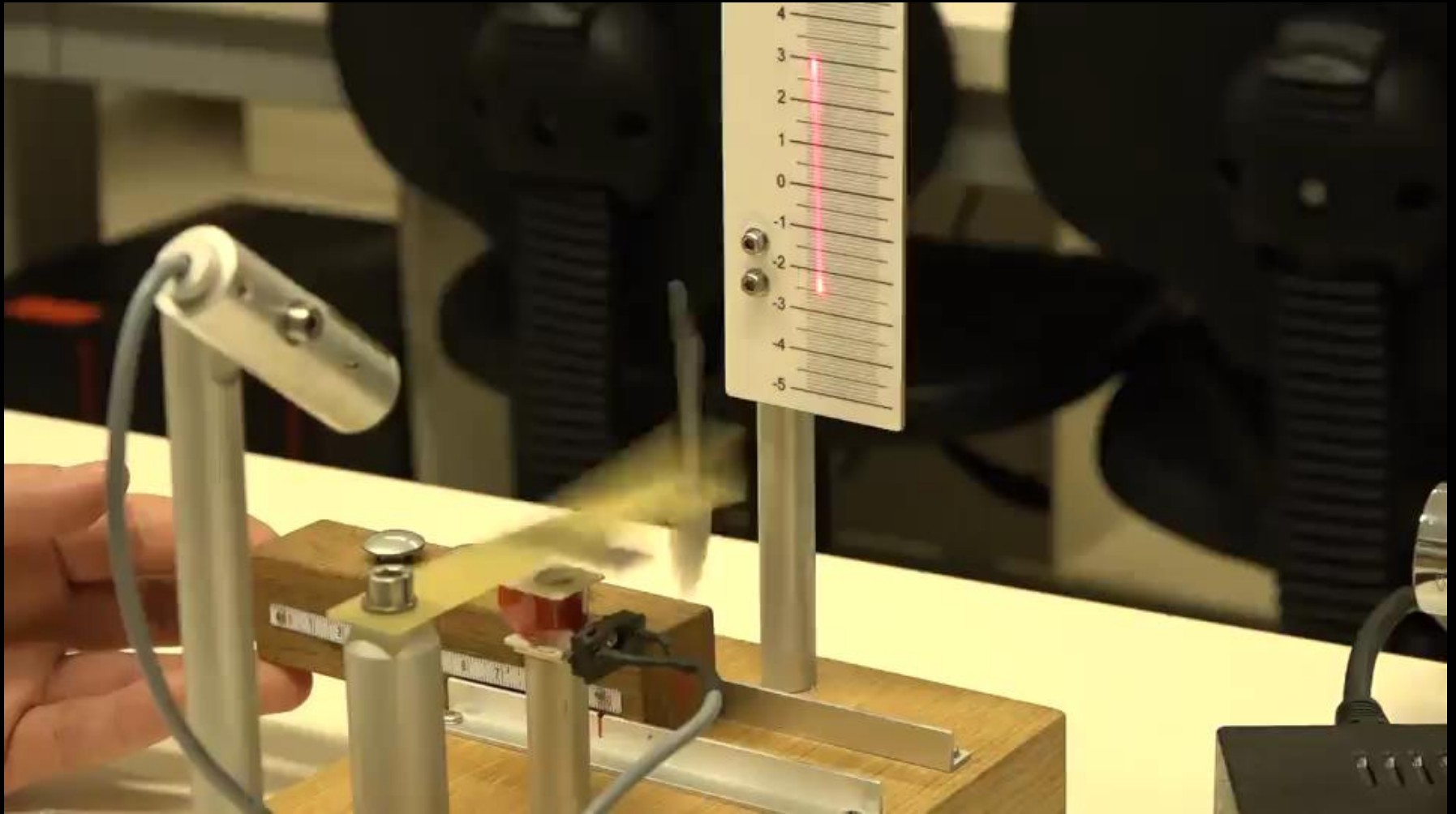
Erzwungene Schwingung



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

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

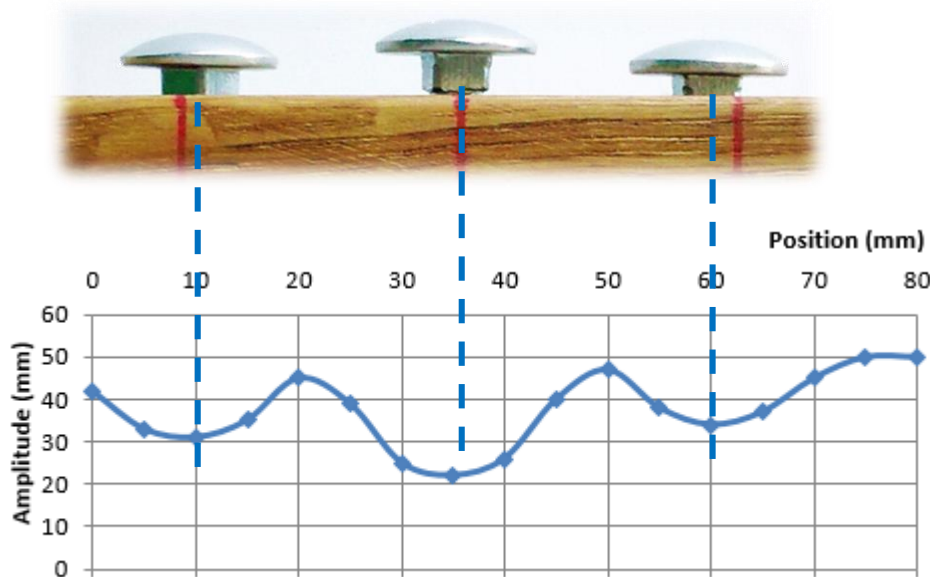
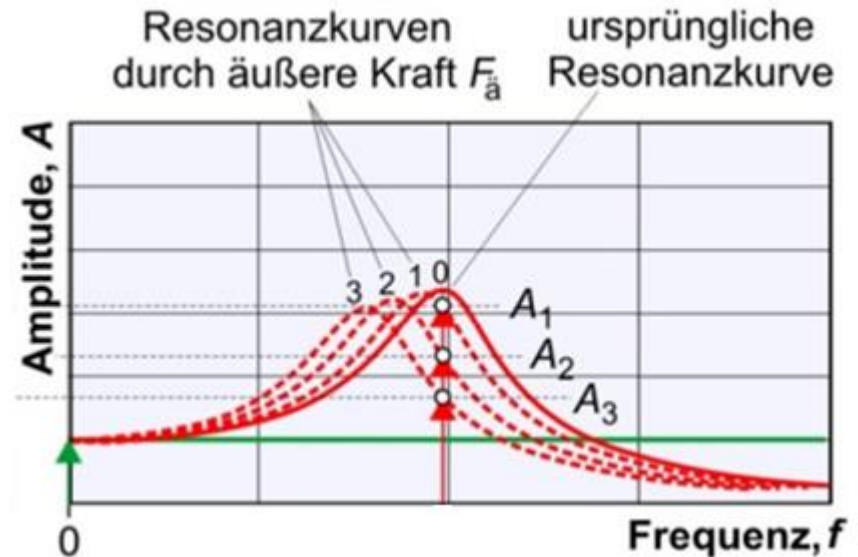
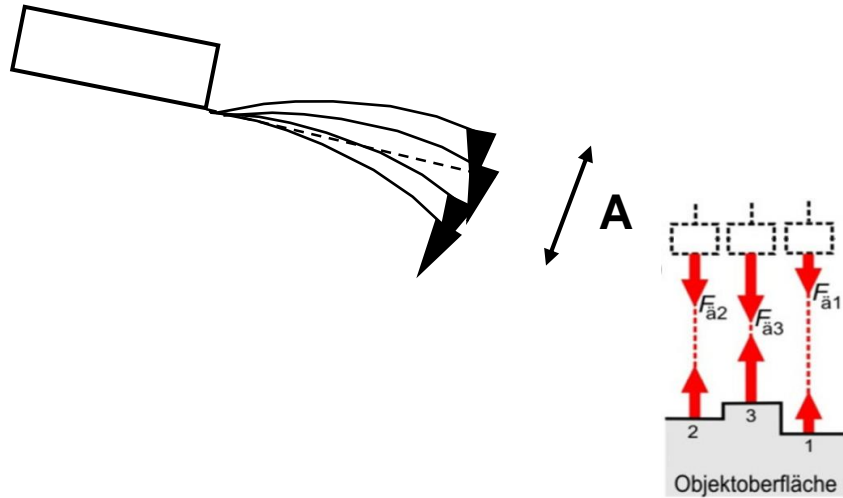
AFM Modell: Nicht-Kontakt-Modus



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

Zur Erinnerung

AFM: Nicht-Kontakt-Modus

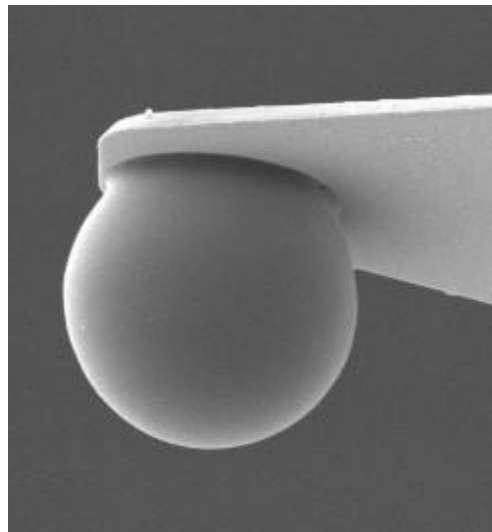
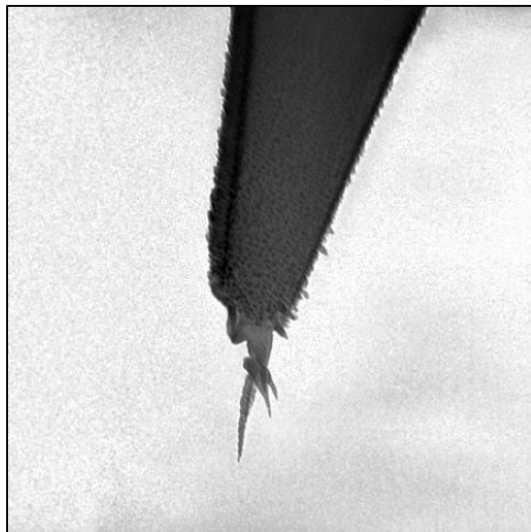
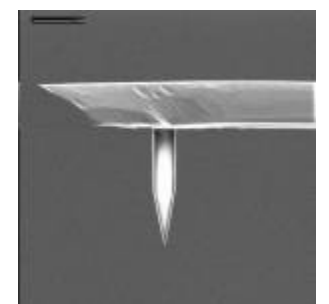
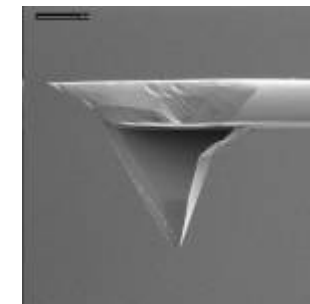
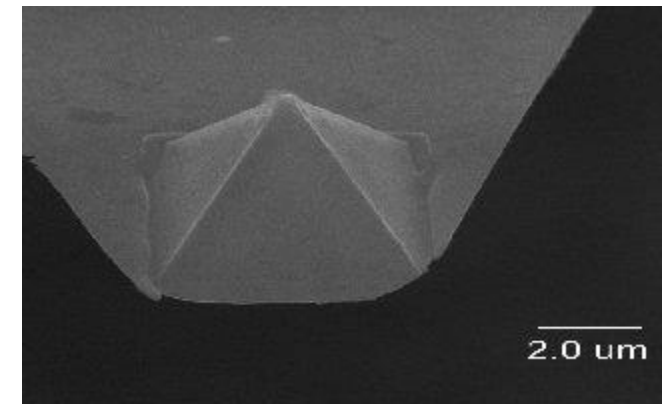
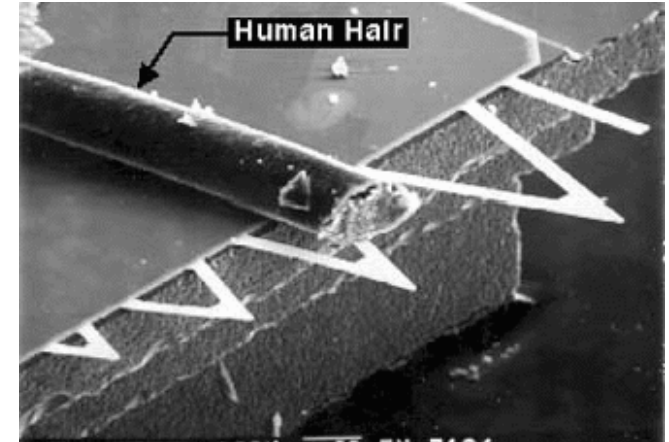


$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m}} \downarrow$$

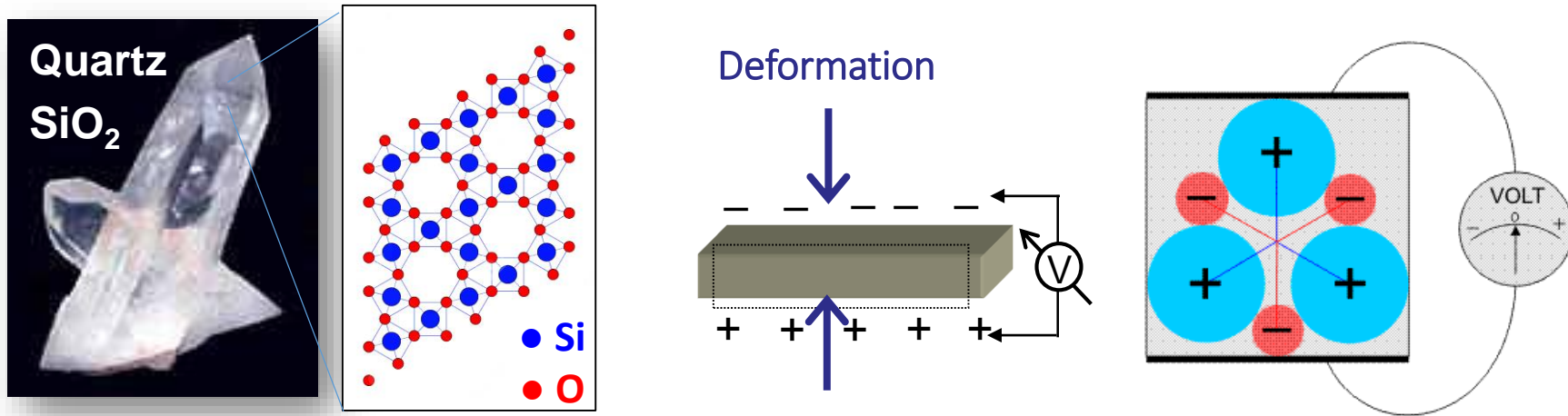
- **Objekthöhe** kann **nur mit Rückkopplung** gemessen werden.

Blattfeder / Cantilever

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

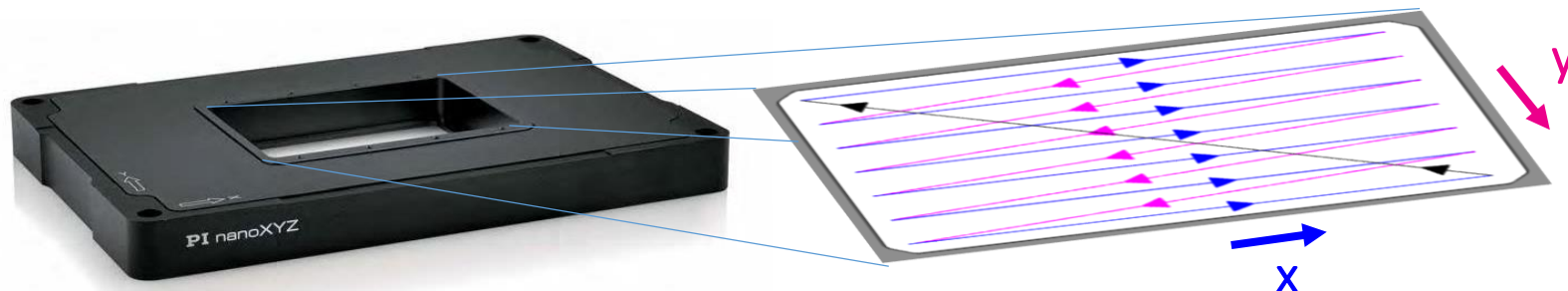


Das Rasterprinzip: Piezoelektrizität



- **Inverser piezoelektrischer Effekt: Spannung → Deformation**
- X, Y, Z Piezotransducer: 150 V → 40 μm

präzise Schrittgröße:
0,1 nm



AFM - Eigenschaften

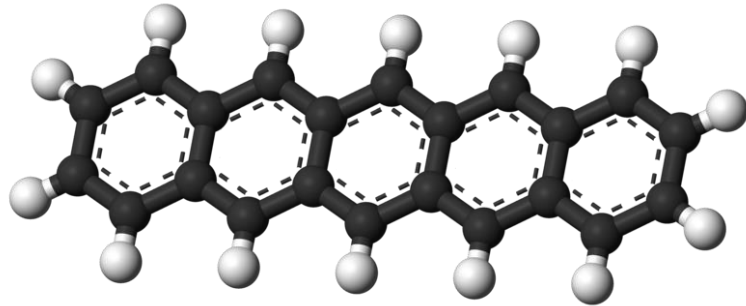
- **Vorteile:**

- 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 ($10 \times 10 \mu\text{m}$ Rechteck).
- Teuer (Instrument, Vorbereitung des Präparats, Cantilever).

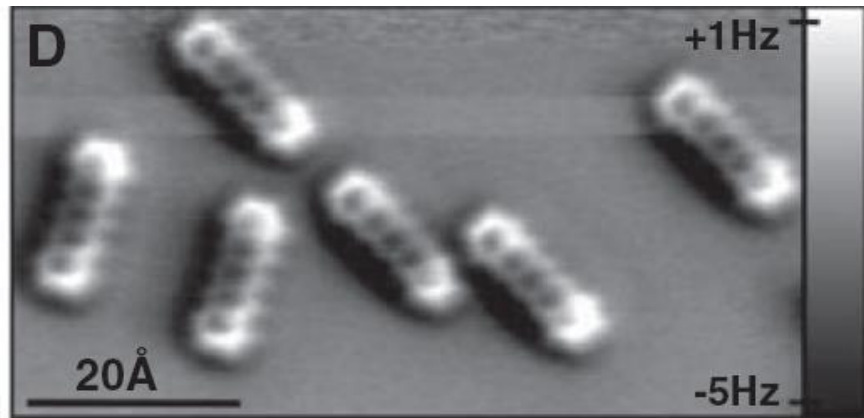
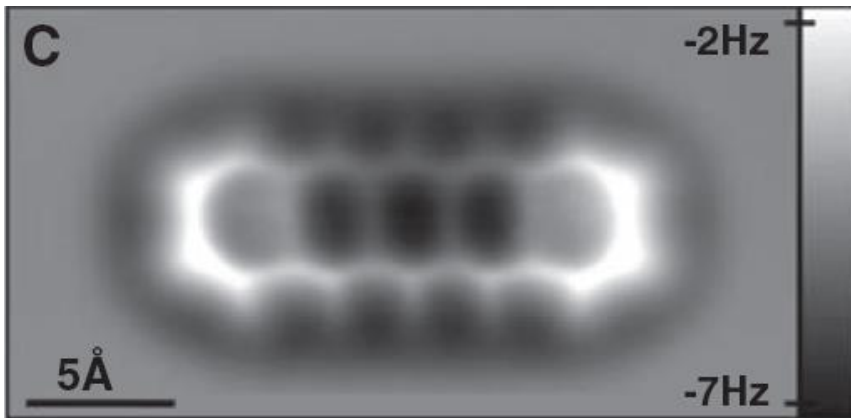
Pentacen Molekül



Tunnelstromstärke durch die Nadel



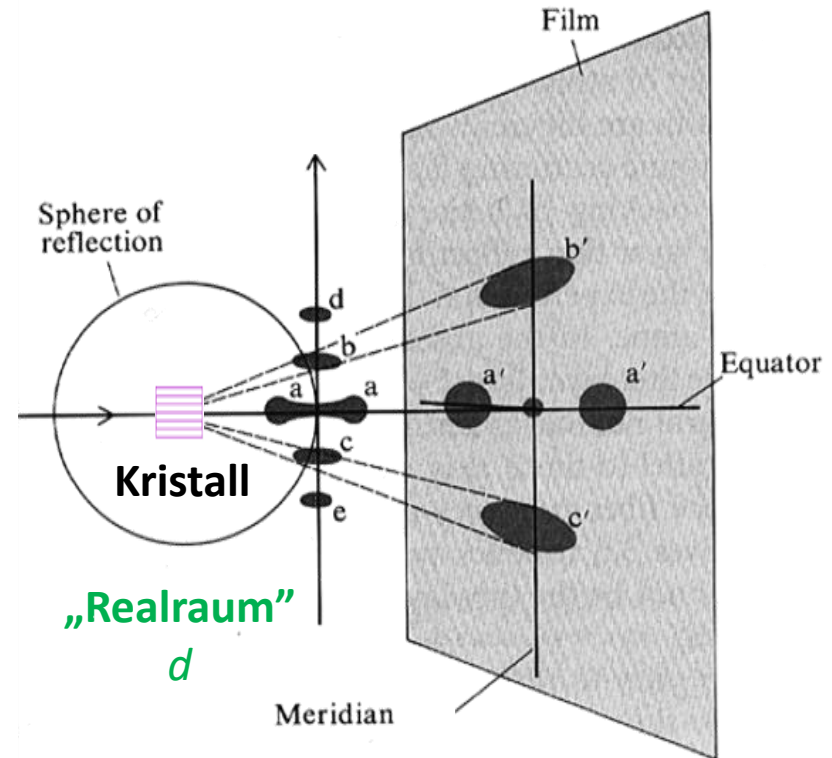
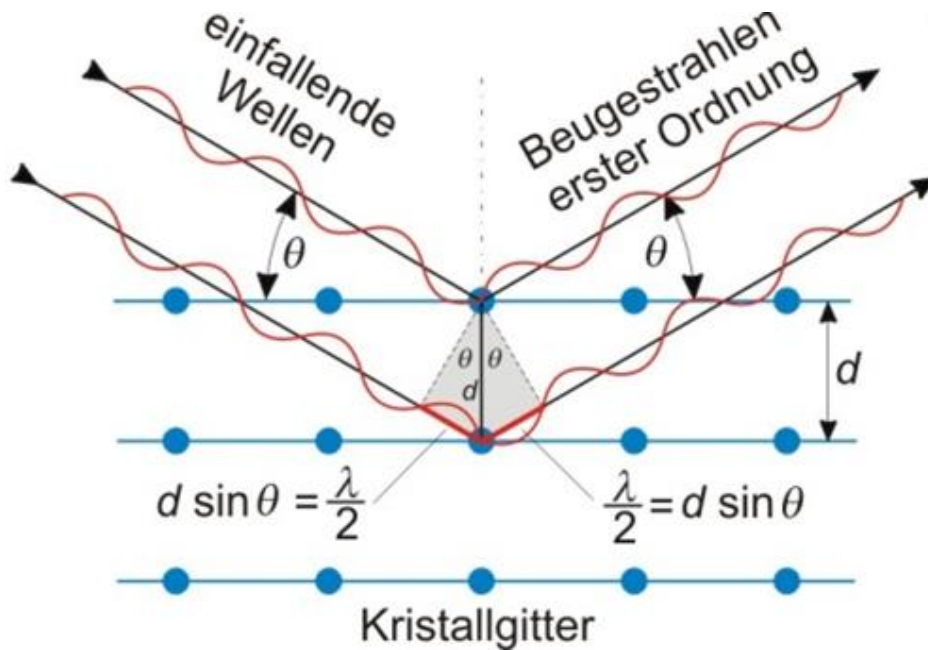
Topographie (AFM, die Spitze der Nadel ist mit CO-bedeckt)



Nature Chemistry 1, 597 - 598 (2009)

Diffraktionsmethoden

Röntgendiffraktion - Grundlagen



Bragg-Gleichung:

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

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

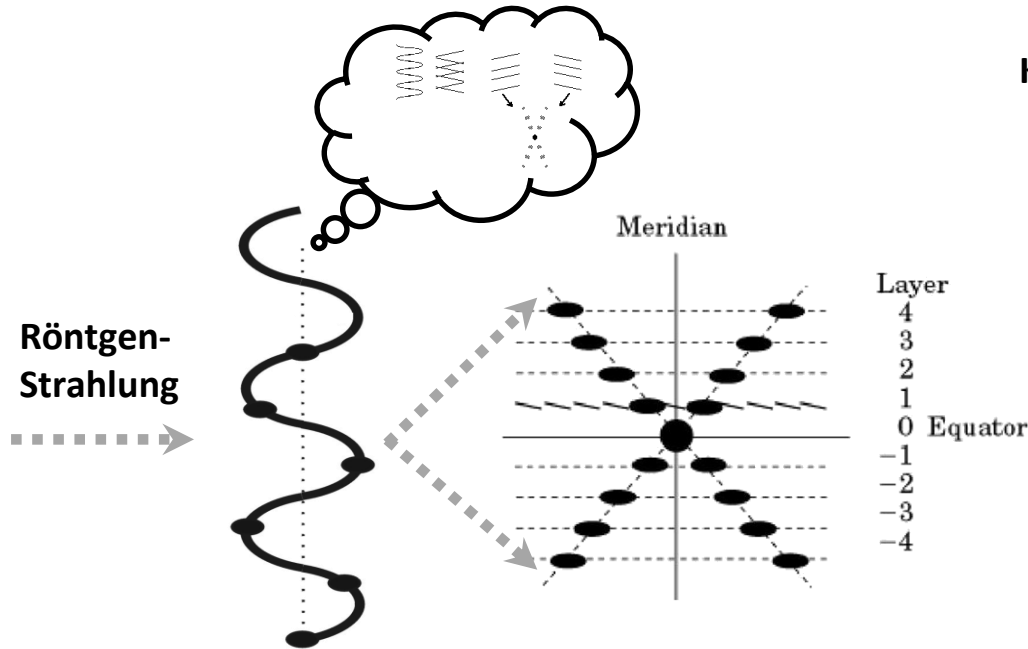
$$\text{„Reziprokraum“} \quad \frac{1}{\theta}$$

d : Gitterabstand
 θ : Beugungswinkel
 λ : Wellenlänge

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

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

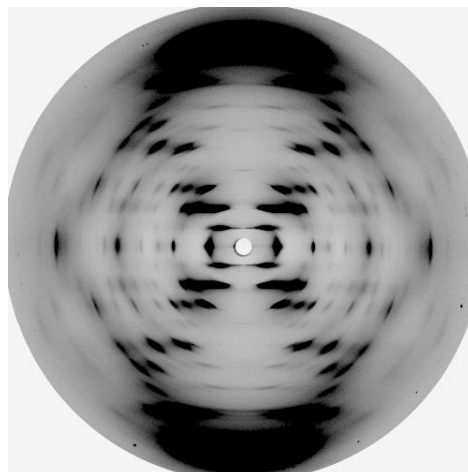
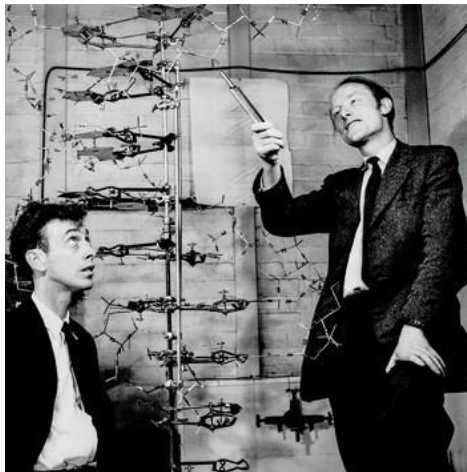
Röntgendiffraktion an Fasern



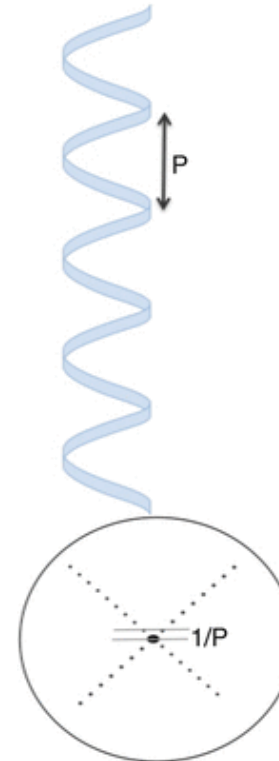
DNS

„Realraum“

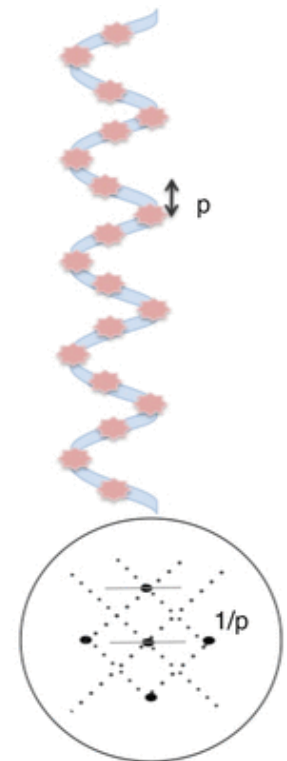
„Reziprokraum“



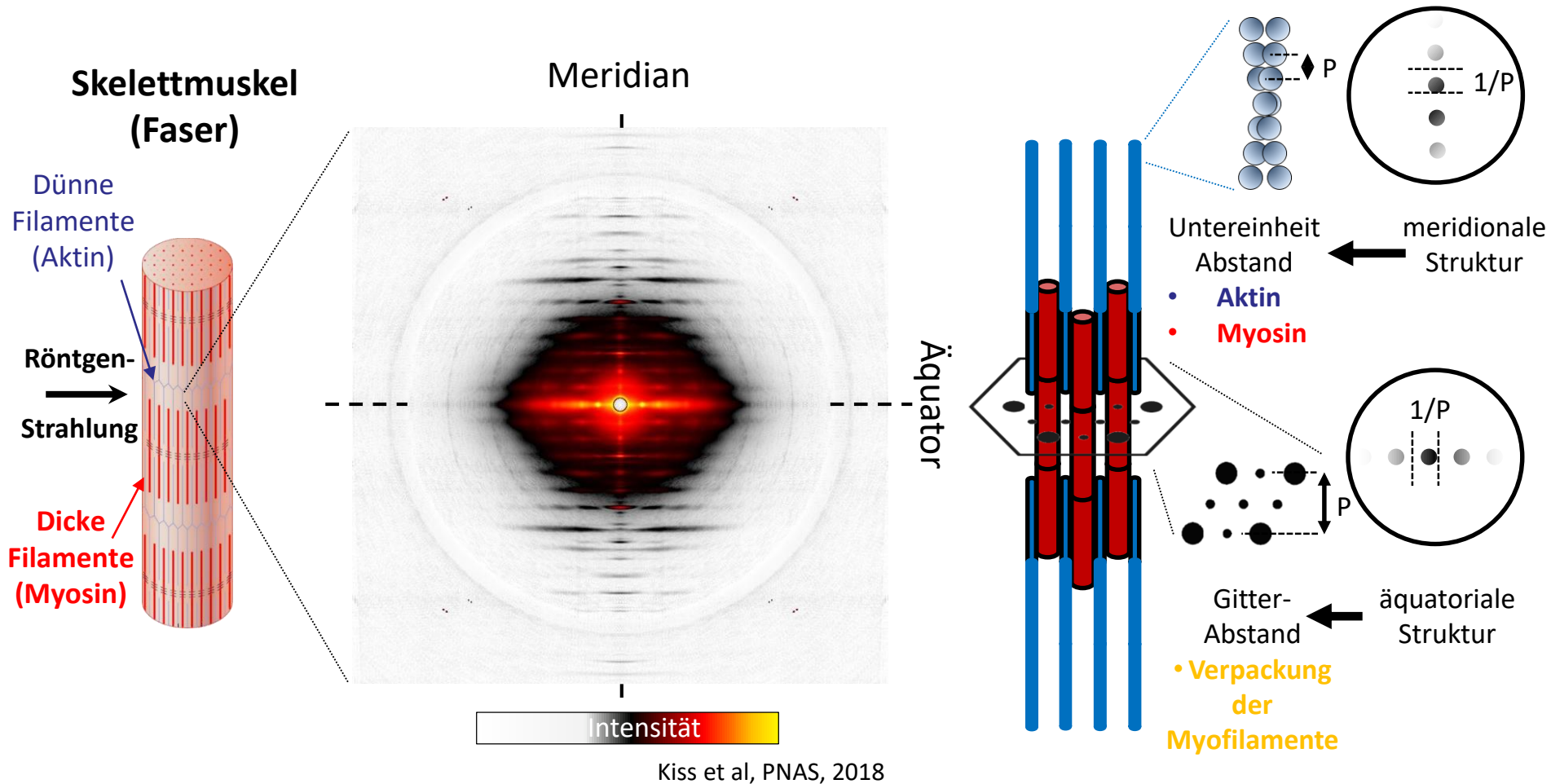
Kontinuierliche
Helix



Diskontinuierliche
Helix



Röntgendiffraktion an Skelettmuskel

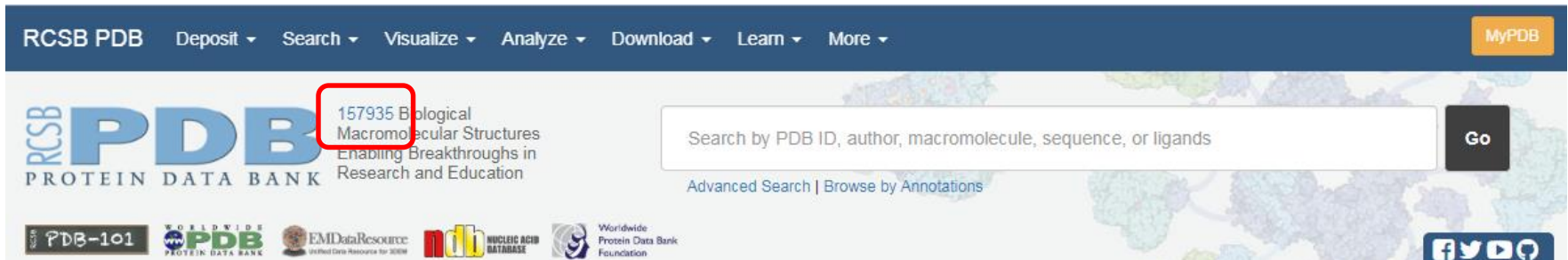


Realraum ↔ Reziprokraum

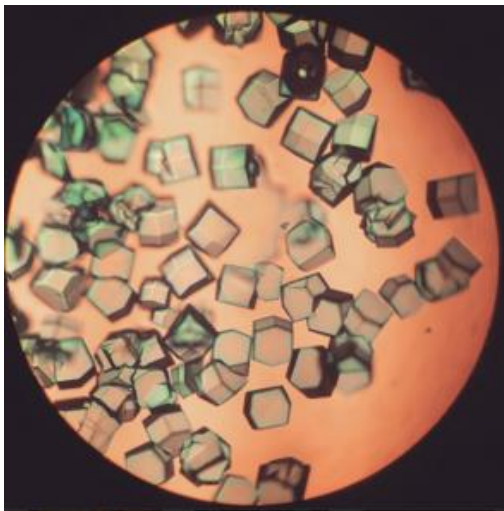
Real-Raum ↔ Reziprok-Raum

Röntgendiffraktion – weitere Beispiele

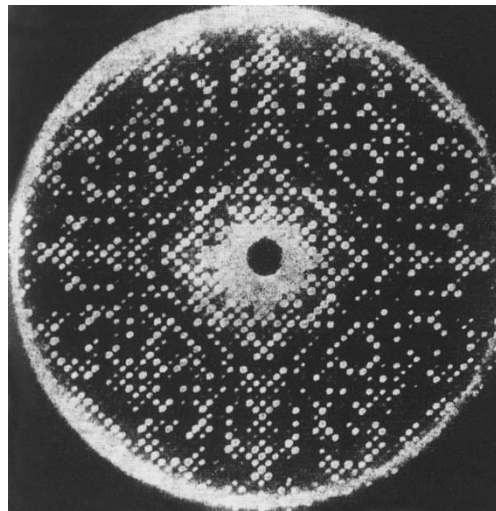
<https://www.rcsb.org/>



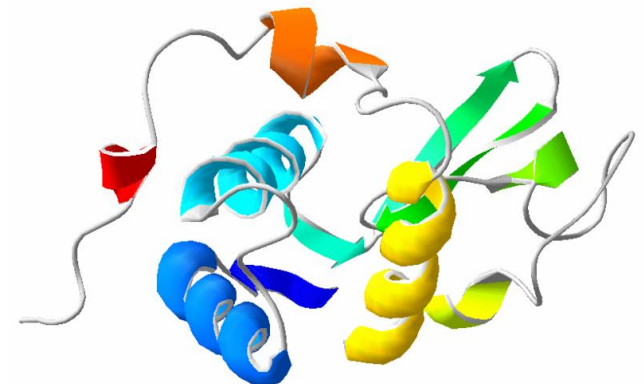
**Lysozym
Kristalle**

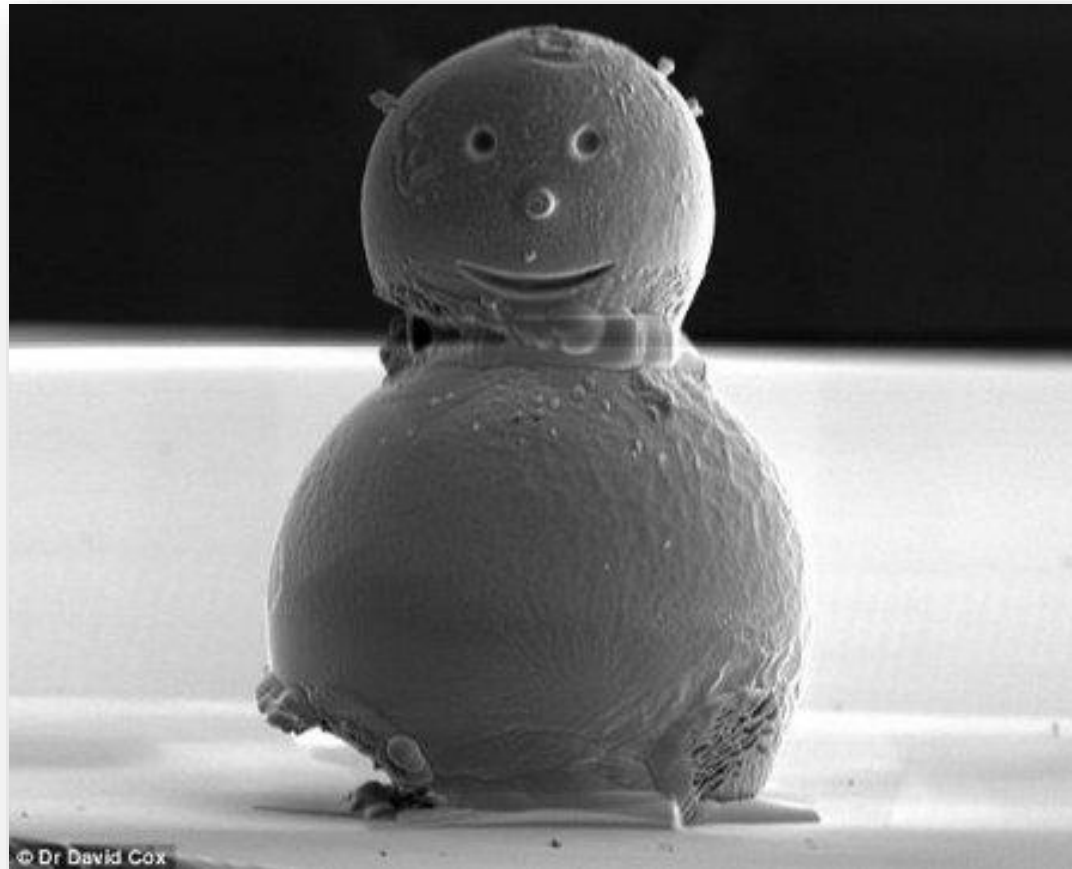


Diffraktionsbild



3D-Struktur





10 μm