

Mikroskopie mit Röntgenstrahlen – Anwendungen in den Lebenswissenschaften

(vorgetragen in der Plenarsitzung am 2. Dezember 2011)

GÜNTER SCHMAHL

Einleitung

Bereits unmittelbar nach der Entdeckung der Röntgenstrahlen durch W. C. Röntgen im Jahr 1895 wurde versucht, diese Strahlung für die Mikroskopie nutzbar zu machen. Weil die Versuche erfolglos waren, verfestigte sich die Ansicht, dass man mit solchen Versuchen aus physikalischen Gründen keinen Erfolg haben könne. So hat noch 1979 Ernst Ruska, einer der Erfinder des Elektronenmikroskops und späterer Nobelpreisträger, zwei Argumente gegen die Entwicklung eines Röntgenmikroskops vorgebracht [1]: Weil für Röntgenstrahlen die Brechzahl nur wenig von 1 abweicht, könne man keine Brechungsinsen für Röntgenstrahlen bauen. Zum anderen sei die Wechselwirkung von Röntgenstrahlen mit Materie so gering, dass man nicht hoffen könne, Teilchen von sublichtmikroskopischer Ausdehnung mit genügendem Kontrast sichtbar zu machen.

Dennoch gab es gute Argumente für die Entwicklung eines Röntgenmikroskops: 1. Nach Ernst Abbe ist die kleinste Struktur, die man mit einem Mikroskop sichtbar machen kann, proportional zur Wellenlänge der benutzten Strahlung. Die kurzen Wellenlängen der Röntgenstrahlen lassen daher prinzipiell eine hohe räumliche Auflösung zu. 2. Hinreichende Kontraste kann man bei der Abbildung mit Röntgenstrahlen dadurch erzielen, dass man sehr weiche Röntgenstrahlen nutzt. Das hat schon Hans Wolter in den fünfziger Jahren erkannt [2]. 3. Zur Abbildung kann man statt der Brechung die Beugung nutzen, d. h., man kann Zonenplatten als Beugungsoptiken einsetzen. Die Eigenschaften solcher Kreisgitter sind schon seit 1875 bekannt. Frühe Vorschläge zum möglichen Einsatz von Zonenplatten als Röntgenoptiken sind in einem Übersichtsartikel [3] zusammenfassend dargestellt. 4. Da für Röntgenstrahlen die Brechzahl nur wenig von 1 abweicht, gibt es – ganz im Gegensatz zur Abbildung mit sichtbarem Licht – keine Streureflexion an Grenzflächen des abzubildenden Objekts. Diese für

die Röntgenmikroskopie sehr wichtige Erkenntnis findet man bereits im bekannten Lehrbuch „Einführung in die Physik“ von R. W. Pohl [4] und bedeutet, dass sehr klare Bilder auch von relativ dicken Objekten erwartet werden können. Besonders wichtig ist dies für tomographische Untersuchungen.

Die moderne hochauflösende Röntgenmikroskopie wurde möglich durch die Entwicklung von Zonenplatten als Röntgenobjektive und Röntgenkondensoren, die in der Optischen Abteilung der Göttinger Sternwarte entwickelt wurden [5]. Die Zonenplattenstrukturen, d. h. konzentrische Ringe mit nach außen abnehmender Ringbreite, wurden mit Hilfe von Laserinterferenzen erzeugt und anschließend mit Verfahren der Nanostrukturtechnik in absorbierende bzw. phasenschiebende Strukturen übertragen. Neben der Optikentwicklung war für die Röntgenmikroskopie sehr wichtig, dass Elektronenspeicherringe als Röntgenquellen zur Verfügung standen, deren spektrale Brillanz – ein Maß für die Helligkeit – seit 1960 um mehr als zehn Größenordnungen gesteigert werden konnte. Ende der siebziger/Anfang der achtziger Jahre wurden in Göttingen die ersten Röntgenmikroskope mit Zonenplatten entwickelt und am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg [6], am Elektronenspeicherring ACO in Paris/Orsay [7] und ab 1982 am Elektronenspeicherring BESSY in Berlin [8] aufgebaut und betrieben. Die Röntgenkondensoren dienen dabei zur Beleuchtung der zu untersuchenden Objekte, die Röntgenobjektive zur Erzeugung vergrößerter Bilder der Objekte. Anfang der achtziger Jahre ist es so gelungen, Strukturen mit einer Auflösung von 50 nm abzubilden und damit das oben genannte Vorurteil experimentell zu widerlegen.

Durch diese Ergebnisse sowie durch die Entwicklung der Rasterröntgenmikroskopie in Göttingen, London und insbesondere an der State University of New York in Stony Brook, USA, hat sich ein großes Forschungsgebiet entwickelt. Im Fachbereich Physik der Universität Göttingen wurde dafür das Institut für Röntgenphysik gegründet, in dem von 1988 bis 2002 in gut ausgestatteten Laboratorien an der Weiterentwicklung von Röntgenoptiken, Röntgenmikroskopen und Röntgenquellen gearbeitet werden konnte. In Göttingen wurde die Phasenkontrast-Röntgenmikroskopie entwickelt [9], die es ermöglicht, auch mit härterer Röntgenstrahlung hohe Kontraste zu erzielen, ebenso die Kryo-Röntgenmikroskopie [10] und die röntgenmikroskopische Tomographie [11] zur dreidimensionalen Abbildung von Objekten mit hoher Auflösung. Mit dem am BESSY betriebenen Röntgenmikroskop wurden mit polarisierter Röntgenstrahlung magnetische Strukturen abgebildet [12]. Genannt seien auch die Untersuchungen zur Morphologie und Dynamik kolloidaler Systeme [13].

Inzwischen werden weltweit Röntgenmikroskope sowie Rasterröntgenmikroskope weiterentwickelt und für Grundlagenforschung und angewandte Forschung eingesetzt. Die Grundlagenforschung wird noch vorwiegend an Synchrotronstrahlquellen, also in großen Forschungszentren durchgeführt. Es gibt aber immer bessere kompakte Laborquellen mit hinreichender Intensität. Mehrere Firmen bauen und vertreiben Röntgenmikroskope und Rasterröntgenmikroskope.

Diffraktive Röntgenlinsen werden inzwischen in vielen Labors weiterentwickelt. Dabei werden die Zonenstrukturen mit modernen Methoden der Elektronenstrahl-Lithographie erzeugt mit dem Ziel, die beste bisher erreichte Auflösung von etwa 10 nm noch zu verbessern und mit einem hohen Wirkungsgrad der Optiken zu verbinden [14].

Parallel zur Verbesserung der Röntgenoptiken, der Röntgenquellen und der Mikroskope sind viele Anwendungsgebiete erschlossen worden. In [15] sind Anwendungsgebiete mit den jeweiligen Literaturstellen zusammengestellt. Genannt seien hier aus der Materialforschung Untersuchungen an integrierten Schaltkreisen unter Nutzung der großen Reichweite der Röntgenstrahlen, Untersuchungen zur Morphologie und zu dynamischen Prozessen magnetischer Nanostrukturen sowie Untersuchungen an Polymeren, Solarzellen, Batterien, Brennstoffzellen und Katalysatoren. Da die Röntgenmikroskopie gut geeignet ist für die Untersuchung von Systemen, deren natürliche Struktur und Funktion an ein wässriges Medium gebunden sind, werden kolloidale Systeme, Bodenstrukturen, Sedimente und Biofilme analysiert. Morphologische Untersuchungen dienen dabei zur Untersuchung von Aggregations- und Ausfallreaktionen, die Nahkantenspektroskopie zur chemischen Analyse mit hoher räumlicher Auflösung. Aus dem Gebiet der Lebenswissenschaften sollen im folgenden zwei Anwendungsgebiete diskutiert werden, nämlich die röntgenmikroskopische Tomographie zur dreidimensionalen Darstellung intakter Zellen und die röntgeninduzierte Röntgenfluoreszenz zur Elementanalyse und zur Messung von Spurenelementen in biologischen Proben.

Röntgenmikroskopische Tomographie

Der wesentliche Vorteil der Röntgentomographie besteht darin, dass mit ihr 3D-Bilder von relativ dicken (5–15 μm), intakten Zellen ohne chemische Fixierung, ohne Dehydratation und chemische Färbung und ohne Schneiden in dünne Scheiben gewonnen werden können.

Zur dreidimensionalen Darstellung von Zellen werden diese nacheinander unter verschiedenen Winkeln in Winkelschritten von z. B. einem Grad

abgebildet. Aus dem Datensatz von 120 bis 180 2D-Bildern, aufgenommen mit einer CCD-Kamera, wird mit Hilfe von Rekonstruktionsalgorithmen, wie sie z. B. aus der medizinischen Computertomographie (CT) bekannt sind, die 3D-Struktur der Objekte rekonstruiert. Im Institut für Röntgenphysik gelang im Jahre 2000 die erste röntgenmikroskopische tomographische Rekonstruktion der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* mit 60 nm Auflösung [11], in Berkeley wurden Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* mit der gleichen Auflösung tomographisch dreidimensional dargestellt [16]. Diese Arbeiten haben gezeigt, dass die röntgenmikroskopische Tomographie sehr gut geeignet ist, die subzelluläre Architektur und Organisation in intakten Eukaryontenzellen dreidimensional darzustellen, ohne dass kontrasterhöhende Färbungen notwendig sind. Die sehr hohen Bildkontraste werden durch die unterschiedliche Absorption der Röntgenstrahlen durch das biologischen Material und durch Wasser gegeben. Es ist lediglich notwendig, die Objekte bei tiefen Temperaturen abzubilden (Kryomikroskopie bei einer Temperatur von etwa 90 K), weil dadurch der Einfluss von Strahlenschäden auf die strukturelle Stabilität der Zellen deutlich reduziert und störende Bewegungsvorgänge vermieden werden. Bereits 1998 hat G. Schneider in einer für die Tomographie grundlegenden Arbeit theoretisch und experimentell gezeigt, dass es mit Hilfe der Kryomikroskopie möglich ist, Zellen mit einer Auflösung von besser als 10 nm abzubilden, ohne dass auf dieser Skala strukturelle Änderungen sichtbar werden [10]. In den benutzten Röntgenmikroskopen war allerdings in der Fokalebene des Kondensors nur Platz für kleine Objekthalter in Form dünner Glaskapillaren. Zellen, die auf Objektträgern flach angewachsen sind – wie in der Licht- und der Elektronenmikroskopie üblich – konnten nicht untersucht werden.

Nachdem die Fakultät für Physik sich 2002 dafür entschieden hatte, in Göttingen auf linsenlose röntgenmikroskopische Verfahren zu setzen, wurde das in Göttingen begonnene Forschungsgebiet der Röntgenmikroskopie mit diffraktiven Röntgenlinsen Schritt für Schritt in Berlin wieder neu aufgebaut. Am Helmholtz-Zentrum für Materialien und Energie wurde unter Leitung von G. Schneider neben der Weiterentwicklung der Röntgenlinsen [14] ein neues Röntgenmikroskop entwickelt, das mehrere Vorteile gegenüber den bisher eingesetzten Systemen aufweist [17]. Das Mikroskop ist hinter einem Monochromator aufgebaut und enthält eine elliptisch geformte Glaskapillare als Spiegelkondensor, gefolgt von einem Zonenplattenobjektiv. Diese optische Anordnung lässt Untersuchungen mit hoher spektraler Auflösung zu. Die hohe Photonendichte in der Objektebene erlaubt die Aufnahme von Bildern mit Belichtungszeiten im Sekundenbereich. P. Guttman et al. haben diese Eigenschaften des neuen

Mikroskops genutzt, um mit einer spektralen Auflösung von $\lambda/\Delta\lambda = 10^4$, einer räumlichen Auflösung von 25 nm und einem Bildfeld von 15–20 μm mit Hilfe der Nahkantenspektroskopie und polarisierter Röntgenstrahlung die elektronischen Eigenschaften von Titandioxyd-Nanostäbchen zu untersuchen [18]. Bemerkenswert ist u. a., dass die Daten hundert Mal schneller gesammelt werden können als mit Rasterröntgenmikroskopen, die bisher für solche Untersuchungen eingesetzt werden. Damit können eine große Zahl von Nanostrukturen untersucht und statistische Informationen gewonnen werden.

Für die Tomographie reicht der Platz in der Fokalebene des Kondensors aus, um auch Zellen abzubilden, die auf flachen, drehbar in einer Kryokammer angeordneten Objektträgern gewachsen sind. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um intakte Adenokarzinomzellen der Maus im Kryozu-

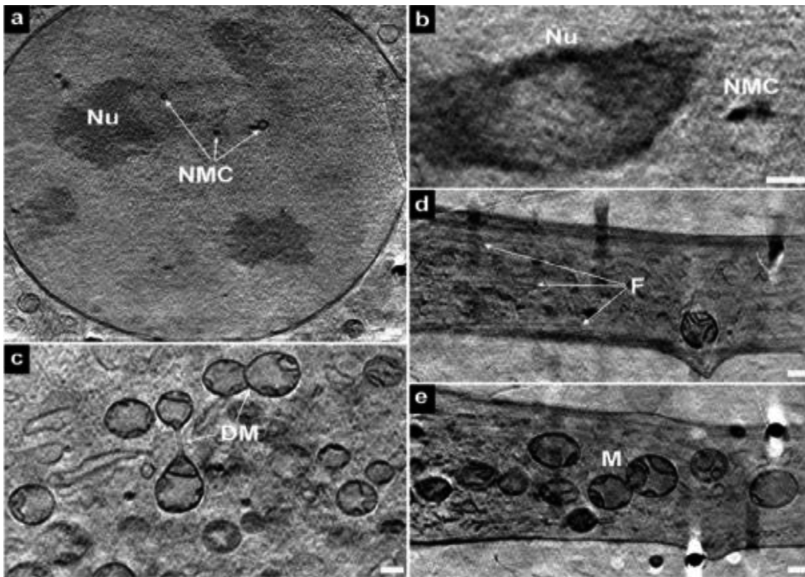


Abbildung 1: Röntgenmikroskopische Bilder einer intakten Adenokarzinomzelle der Maus. Die Bilder sind optische Schnitte durch das tomographisch rekonstruierte Volumen der unfixierten, ungefärbten Zelle im Kryozustand und zeigen hohe natürliche Kontraste. Skala 0.39 μm . Man erkennt Nucleoli (Nu) und Kernmembrankanäle (NMC) im Zellkern, Mitochondrien (M), sich teilende Mitochondrien (DM) und Filamente (F) im Cytoplasma, Auflösung 36 nm. (Reproduziert mit Erlaubnis der Nature Publishing Group aus G. Schneider et al., Three-dimensional cellular ultrastructure resolved by X-ray microscopy, Nature Methods 7, 985–987, Supplement 2010).

stand dreidimensional abzubilden. Abbildung 1 zeigt fünf 20 nm dicke optische Schnitte durch das rekonstruierte Volumen einer solchen Zelle mit sehr hohen natürlichen Kontrasten [19]. Eine ausführliche Darstellung von Ultrastrukturen von Zellen aus solchen Untersuchungen und ein Vergleich mit Aufnahmen der Elektronenmikroskopie finden sich in [20]. Die Kryoelektronentomographie liefert zwar Bilder mit höherer Auflösung, ist aber auf kleine Objekte bzw. Schnitte von Zellen mit Schichtdicken von 1 μm oder weniger beschränkt. Die 3D-Rekonstruktion ganzer Zellen ist damit sehr aufwendig. Um für die 3D-Darstellung von Zellen mit der röntgenmikroskopischen Tomographie eine höhere Auflösung zu erreichen, müssen in Zukunft Röntgenobjektive mit höherer räumlicher Auflösung eingesetzt werden. Damit verringert sich aber die Schärfentiefe der Optiken auf Werte, die die Dicke von typischen, auf flachen Substraten gewachsenen Zellen unterschreiten.

Verschiedene Lösungen dieses Problems sind in [17] diskutiert. So können z. B. tomographische Abbildungen mit Röntgenstrahlen kürzerer Wellenlängen – und damit wesentlich größerer Schärfentiefen der Optiken – im Phasenkontrast durchgeführt werden. In der Röntgenholographie, einer scheinbar naheliegenden Methode zur dreidimensionalen Abbildung von Zellen, müssen die durch die Verwendung kohärenter Strahlung entstehenden Störinterferenzen (Speckel) eliminiert werden. Das ist ein Grund dafür, dass die holographische Mikroskopie komplexer Strukturen im Sichtbaren, obwohl wesentlich einfacher als die Röntgenholographie, bereits in den sechziger Jahren praktisch gescheitert ist.

Die Auflösung von Röntgenmikroskopen reicht aus, biologische Fragestellungen zu bearbeiten. Ein Beispiel ist die quantitative Analyse der dreidimensionalen Verteilung von Viren verschiedener Reifegrade in Zellen [21]. Ein anderes Beispiel sind Untersuchungen von Virus-induzierten Vesikeln in Zellkernen mit Hilfe der Korrelationsmikroskopie, d. h. Untersuchungen der gleichen Objekte mit Fluoreszenzstrahlung im Sichtbaren und mit Röntgenstrahlen, wie sie mit dem Röntgenmikroskop in Berlin möglich sind [22].

Röntgenfluoreszenzanalyse

Bestrahlt man Objekte mit Röntgenstrahlen oder Elektronen, senden diese für die bestrahlten Elemente charakteristische Röntgenstrahlen aus, die es erlauben, Elementhäufigkeiten zu messen und biologische Proben auf Spurenelemente zu untersuchen. In Mikroskopen gelingt dies mit ho-

her räumlicher Auflösung. Die Anregung der charakteristischen Röntgenemission mit Röntgenstrahlung hat gegenüber der Anregung mit Elektronen zwei Vorteile: Zum einen ist die Empfindlichkeit 100 bis 1000 Mal größer. So wird mit der röntgeninduzierten Röntgenfluoreszenzanalyse eine Empfindlichkeit von etwa 10^{-19} Mol/ μm^2 erreicht, dem entsprechen einige 1000 Atome im bestrahlten Gebiet. Zum anderen haben die anregenden Röntgenstrahlen eine wesentlich größere Reichweite in den Objekten als Elektronen.

Zur röntgenmikroskopischen Fluoreszenzanalyse werden Rasterröntgenmikroskope mit diffraktiven Optiken eingesetzt. Dabei wird die Probe punktförmig nacheinander abgetastet, und es wird für jeden Punkt mit Hilfe von Silizium-Detektoren, die um den Probenhalter angeordnet sind, die elementspezifische Röntgenstrahlung gemessen. Inzwischen hat die röntgeninduzierte Röntgenfluoreszenzanalyse eine breite Anwendung gefunden. Aus den Lebenswissenschaften seien hier drei Beispiele erwähnt. Untersucht werden z. B. die durch Asbestfasern verursachten Eisen- und Magnesiumverteilungen in Lungenzellen [23], die Verteilung der Kupferkonzentration in Leberzellen (Morbus Wilson Krankheit) [24] und die Verteilung von Aluminium in Blättern von Teepflanzen [25], die auch auf Böden mit großer Aluminiumkonzentration wachsen. Die Messungen haben gezeigt, dass sich das Aluminium nur im Apoplast der Epidermis, nicht aber im intrazellulären Kompartiment sammelt. Eine detaillierte Würdigung der mit Röntgenmikroskopen und Rasterröntgenmikroskopen erzielten Ergebnisse in den Gebieten der röntgenmikroskopischen Tomographie und der röntgeninduzierten Röntgenfluoreszenzanalyse würde den Rahmen dieses Beitrags sprengen.

Literatur

1. E. Ruska, Die frühe Entwicklung der Elektronenlinsen und der Elektronenmikroskopie, Acta Historica Leopoldina Nummer 12 (1979)
2. H. Wolter, Spiegelsysteme streifenden Einfalls als abbildende Optiken für Röntgenstrahlen, Ann. Physik 6. Folge, Bd. 10, 94 (1952)
3. G. Schmahl, D. Rudolph, B. Niemann, P. Guttmann, J. Thieme, G. Schneider, Röntgenmikroskopie, Naturwissenschaften 83. Jahrgang Heft 2, 61 (1996)
4. R. W. Pohl, Einführung in die Physik, Optik und Atomphysik, Neunte Auflage, § 130, Springer-Verlag (1954)
5. G. Schmahl, D. Rudolph, P. Guttmann, O. Christ, Zone plates for X-ray microscopy, in: X-Ray Microscopy, eds. G. Schmahl, D. Rudolph, 63, Springer-Verlag (1984)
6. B. Niemann, D. Rudolph, G. Schmahl, X-ray microscopy with synchrotron radiation, Applied Optics Vol. 15, 1883 (1976)

7. G. Schmahl, D. Rudolph, B. Niemann, O. Christ, Zone-plate X-ray microscopy, *Quarterly Reviews of Biophysics* 13,3, 297 (1980)
8. D. Rudolph, B. Niemann, G. Schmahl, O. Christ, The Göttingen X-ray microscope and X-ray microscopy experiments at the BESSY storage ring, in: [5], 192 (1984)
9. G. Schmahl, D. Rudolph, Proposal for a phase contrast X-ray microscope, in: *X-ray microscopy – Instrumentation and Biological Applications*, eds. P. C. Cheng, G. J. Jan, 231, Springer-Verlag (1987)
10. G. Schneider, Cryo X-ray microscopy with high spatial resolution in amplitude and phase contrast, *Ultramicroscopy* 75, 85 (1998)
11. D. Weiß, G. Schneider, B. Niemann, P. Guttman, D. Rudolph, G. Schmahl, Computed tomography of cryogenic biological specimens based on X-ray microscopic images, *Ultramicroscopy* 84, 185 (2000)
12. P. Fischer, G. Schütz, G. Schmahl, P. Guttman, D. Raasch, Imaging of magnetic domains with the X-ray microscope at BESSY using X-ray magnetic circular dichroism, *Z. Phys. B.* 101, 313 (1996)
13. J. Thieme, J. Niemeyer, P. Guttman, T. Wilhein, D. Rudolph, G. Schmahl, X-ray microscopy studies of aqueous colloid systems, *Progr Colloid & Polym Sci* 95, 135 (1994)
14. S. Rehbein, S. Heim, P. Guttman, S. Werner, G. Schneider, Ultrahigh-resolution soft X-ray microscopy with zone plates in high order of diffraction, *Physical Review Letters* 103, 110801-1 (2009)
15. A. Sakdinawat, D. Attwood, Nanoscale X-ray imaging, *Nature Photonics* 4, 840 (2010)
16. C. A. Larabell, M. A. Le Gros, X-ray tomography generates 3-D reconstructions of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, at 60 nm resolution, *Mol. Biol. Cell* 15, 957 (2004)
17. G. Schneider, P. Guttman, S. Rehbein, S. Werner, R. Follath, Cryo X-ray microscope with flat sample geometry for correlative fluorescence and nanoscale tomographic imaging, *Journal of Structural Biology* 177, 212 (2012)
18. P. Guttman, C. Bittencourt, S. Rehbein, P. Umek, X. Ke, G. van Tendeloo, C. P. Ewels, G. Schneider, Nanoscale spectroscopy with polarized X-rays by NEXAFS-TXM, *Nature Photonics* 6, 25 (2012)
19. G. Schneider, P. Guttman, S. Heim, S. Rehbein, F. Mueller, K. Nagashima, J. B. Heymann, W. G. Müller, J. G. McNally, Three-dimensional cellular ultrastructure resolved by X-ray microscopy, *Nature Methods* 7, 985 (2010)
20. W. G. Müller, J. B. Heymann, K. Nagashima, P. Guttman, S. Werner, S. Rehbein, G. Schneider, J. G. McNally, Towards an atlas of mammalian cell ultrastructure by soft X-ray tomography, *Journal of Structural Biology* 177, 179 (2012)
21. F. J. Chicon, M. J. Rodriguez, E. Pereiro, M. Chiappi, B. Perdiguero, P. Guttman, S. Werner, S. Rehbein, G. Schneider, M. Esteban, J. L. Carrascosa, Cryo X-ray nanotomography of vaccinia infected cells, *Journal of Structural Biology* 177, 202 (2012)
22. C. Hagen, P. Guttman, B. Klupp, S. Werner, S. Rehbein, T. C. Mettenleiter, G. Schneider, K. Grünwald, Correlative VIS-fluorescence and soft X-ray cryo-microscopy/tomography of adherent cells, *Journal of Structural Biology* 177, 193 (2012)

23. L. Pascolo, A. Giannoncelli, B. Kaulich, C. Rizzardi, M. Schneider, C. Bottin, M. Polentarutti, M. Kiskinova, A. Longoni, M. Melato, Synchrotron soft X-ray imaging and fluorescence microscopy reveal novel features of asbestos body morphology and composition in human lung tissues, *Particle and Fibre Toxicology* 8, (2011)
24. M. Ralle, D. Huster, S. Vogt, W. Schirrmeister, J. L. Burkhead, T. R. Capps, L. Gray, B. Lai, E. Maryon, S. Lutsenko, Wilson disease at a single cell level, *J. Biological Chemistry* 285, No.40, 30875 (2010)
25. R. Tora, K. Vogel-Mikus, R. Hajiboland, P. Kump, P. Pongrac, B. Kaulich, A. Giannoncelli, V. Babin, J. Barcelo, M. Regvar, C. Poschenrieder, Localization of aluminium in tea (*Camellia sinensis*) leaves using low-energy X-ray fluorescence spectroscopy, *J. Plant Research* 124, 165 (2010)