

Nobel Kimya Ödülü

Yaşamı Atomik Çözünürlükte Görüntüleyenlerin Oldu

Çeviri: İlay Çelik Sezer [TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi

2017 Nobel Kimya Ödülü, yaşamın moleküllerinin üç boyutlu görüntülerini oluşturmaya yarayan etkin bir yöntem geliştirmelerinden dolayı Jacques Dubochet, Joachim Frank ve Richard Henderson'a verildi.

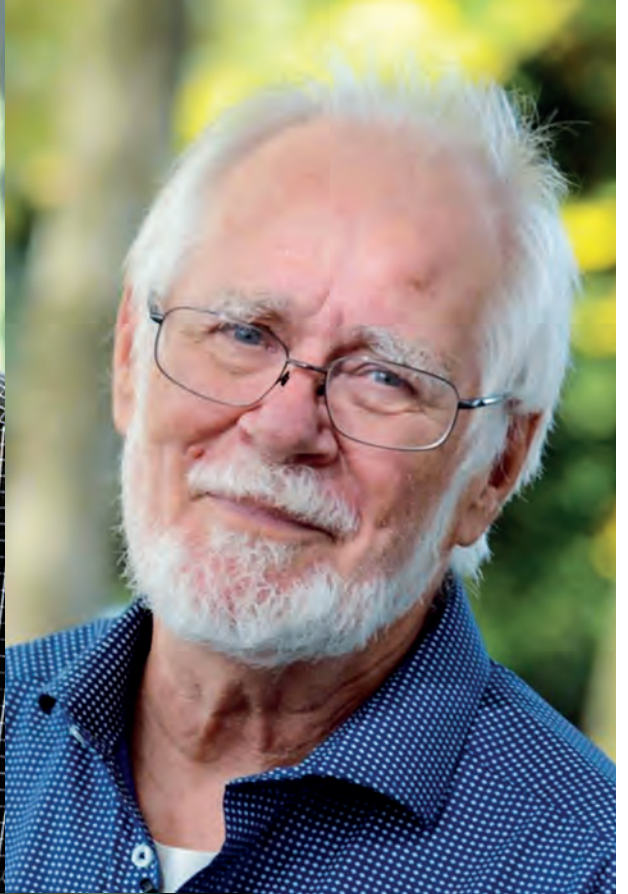
Bugün araştırmacılar kriyoelektron mikroskopisini kullanarak biyomolekülleri hareket halindeyken dondurabiliyor ve onları atomik çözünürlükte görüntüleyebiliyor. Bu teknoloji biyokimyada yeni bir çağın başlangıcı oldu.





Joachim Frank

1940'ta (Siegen, Almanya) doğdu.
Doktora derecesini 1970'te Almanya'daki
Münih Teknik Üniversitesi'nden aldı.
Halen New York'taki (ABD)
Columbia Üniversitesi'nde Biyokimya
ve Moleküler Biyofizik ile Biyolojik Bilimler
bölümlerinde profesör.



Jacques Dubochet

1942'de (Aigle, İsviçre) doğdu.
Doktora derecesini 1973'te
İsviçre'deki Cenevre ve
Basel üniversitelerinden aldı.
Halen İsviçre'deki Lozan
Üniversitesi'nde
fahri biyofizik profesörü.



Richard Henderson

1945'te (Edinburgh, İskoçya) doğdu.
Doktora derecesini 1969'da
Birleşik Krallık'taki
Cambridge Üniversitesi'nden aldı.
Halen aynı üniversitedeki
MRC Moleküler Biyoloji
Laboratuvarı'nda
program lideri.



Geçtiğimiz birkaç yıl içinde bilimsel literatür yaşamın moleküler düzeneklerinin yapısını gösteren hayranlık uyandırıcı görüntülerle dolup taşı (Şekil 1): Salmonella bakterisinin hücrelere saldırmak için kullandığı enjeksiyon iğnesi; kemoterapiye ve antibiyotiklere direnç sağlayan proteinler; sirkadiyan ritmi yöneten moleküler kompleksler; fotosentezde ışığın soğurulmasını sağlayan tepkime kompleksleri ve işitme sürecinde rol oynayan bir basınç algılayıcı. Bunlar bugün kriyoelektron mikroskopisi (cryo-EM) kullanılarak görüntülenen yüzlerce biyomolekülden sadece bazıları.

Araştırmacılar Brezilya’da kendini beyin hasarlı bebek doğumlarıyla gösteren salgının sorumlusunun Zika virüsü olduğundan şüphe ettiklerinde virüsü görüntülemek için cryo-EM’e başvurdu. Birkaç ay içinde virüsün atomik çözünürlükteki üç boyutlu yapısını gösteren görüntüler elde edilmiş ve araştırmacılar ilaçlar için potansiyel hedefler arama imkânı bulmuştu.

Jaques Dubochet, Joachim Frank ve Richard Henderson cryo-EM’in geliştirilmesini sağlayan çığır açıcı keşifler yaptı. Yöntem biyomolekülleri görüntülemeyi her zamankinden daha kolay hale getirerek biyokimyada yeni bir çığır açtı.

Şekil 1.

Geçtiğimiz birkaç yıl içinde araştırmacılar çok sayıda karmaşık protein kompleksinin atomik yapılarını yayımladı.

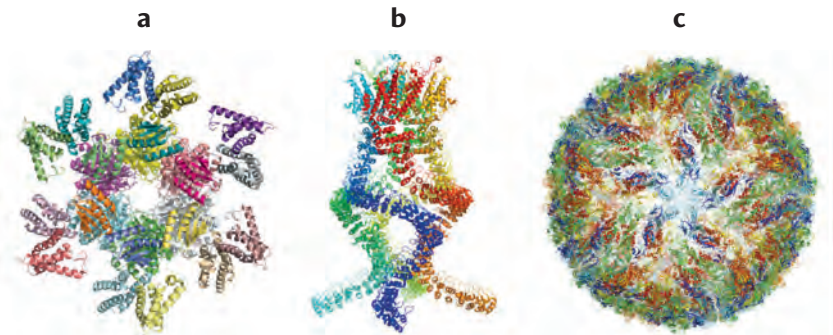
- Sirkadiyan ritmi yöneten bir protein kompleksi
- Kulakta basınç değişimlerini algılayarak işitmemizi sağlayan bir algılayıcı
- Zika virüsü

Yirminci yüzyılın ilk yarısında biyomoleküller -proteinler, DNA ve RNA- biyokimyayın bilinmeyen topraklarıydı. Bilim insanları bunların hücrede temel görevler üstlendiğini biliyordu ancak neye benzedikleri konusunda hiçbir fikirleri yoktu. Biyomoleküllerin dalgalı ve sarmallı yapılarının görüntülenebilmesi ancak Cambridge’deki araştırmacılar 1950’lerde protein kristallerini X-ışınları kullanarak incelemeye başlayınca mümkün oldu.

1980’lerin başında proteinlerin katı halde ve çözelti içinde incelenmeleri için X-ışını kristalografisi kullanımı nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi kullanımıyla destekleniyordu. Bu yöntem proteinlerin yapısını ortaya çıkarmakla kalmayıp nasıl hareket ettiklerini ve başka moleküllerle nasıl etkileştiklerini de ortaya çıkarıyor.

Bugün bu iki yöntem sayesinde biyomoleküllerin binlerce modelini barındıran ve temel araştırmalardan ilaç geliştirme çalışmalarına kadar çok çeşitli amaçlara hizmet eden veri tabanları var.

Ancak her iki yöntemin de temel kısıtlılıkları var. Çözeltide uygulanan NMR sadece bazı proteinler için işe yarıyor.



X-ışını kristalografisi de tıpkı su buza dönüştüğünde olduğu gibi moleküllerin düzenli kristaller oluşturmasını gerektiriyor. Görüntülense ilkel fotoğraf makineleriyle elde edilen siyah beyaz fotoğrafları andırıyor, hareketsiz pozlar proteinin dinamikleriyle ilgili çok az bilgi veriyor.

Ayrıca pek çok molekülün kendini kristal biçiminde düzenlemesi mümkün değil ki bu Richard Henderson'un 1970'lerde X-ray kristalografisinden vazgeçmesine neden oldu. İşte 2017 Nobel Kimya Ödülü'nün öyküsü tam da burada başlıyor.

Kristallerle İlgili Problemler Henderson'a Rota Değiştirtti

Richard Henderson doktorasını Cambridge Üniversitesi'nde X-ray kristalografisi üzerine yaptı. Yöntemi proteinleri görüntülemek için kullandı ancak doğal olarak hücreyi çevreleyen hücre zarında gömülü halde bulunan bir proteini kristalleştirmeye çalıştığında aksaklıklar baş gösterdi.

Hücre zarı proteinlerini yönetmek zordur. Bu proteinler doğal ortamlarından yani hücre zarından ayrıldıklarında büzüşür ve işe yaramaz bir yığına dönüşürler. Richard Henderson'un üzerinde ilk çalıştığı protein gerekli miktarda üretilmesi zor bir proteindi; ikinci protein ise kristalleştirilemiyordu. Yıllar süren hayal kırıklıklarının ardından Henderson var olan tek alternatif yöneldi: Elektron mikroskobu.



Richard Henderson

Elektron mikroskobunun o zamanlar gerçekten bir seçenek olup olmadığı ise tartışmalı. Aslen geçirimli elektron mikroskopisi olarak adlandırılan bu yöntem aşağı yukarı sıradan mikroskop gibi çalışıyor ancak örneğe ışık yerine bir elektron ışını gönderiliyor. Gönderilen elektron ışınının dalga boyu ışığinkinden çok daha kısa olduğu için elektron mikroskobu çok küçük yapıları -hatta tek tek atomların konumlarını- görünür hale getirebiliyor.

Dolayısıyla kuramsal olarak elektron mikroskobunun çözünürlüğü Henderson'un hücre zarı proteinlerinin atomik yapısını ortaya çıkarması için fazlasıyla uygundu, ancak bu projeyi uygulamak neredeyse imkânsızdı. 1930'larda icat edildiğinde bilim insanları elektron mikroskobunun sadece ölü maddeyi incelemek için uygun olduğunu düşünüyordu. Yüksek çözünürlüklü görüntüler elde etmek için gerekli yoğun elektron ışını biyolojik malzemeleri küle çeviriyordu, ışın zayıflatıldığında ise görüntü kontrast kaybına uğrayıp bulanıklaşıyordu.

Dahası elektron mikroskopisi vakum gerektiriyor ve bu durumda kendilerini çevreleyen su buharlaştığı için biyomoleküller bozuluyordu. Biyomoleküller kuruduklarında bozulur ve doğal yapılarını kaybeder, bu durumda elde edilen görüntülerse hiçbir işe yaramaz.

Neredeyse her şey Richard Henderson'un başarısız olacağını gösteriyordu. Ama proje onun incelemek üzere özel bir proteini, bakteriyorodopsini seçmesi sayesinde başarısızlıktan kurtuldu.

O Zamana Kadarki En İyi, Henderson İçin Yeterince İyi Değildi

Bakteriyorodopsin fotosentez yapan bir organizmanın hücre zarına gömülü halde duran, mor renkli bir protein. Richard Henderson ve ekibi, Henderson'un daha önce yapmaya çalıştığı gibi bu hassas proteini hücre zarından ayırmak yerine mor hücre zarını bütün halinde alıp elektron mikroskopunun altına yerleştirdi. Protein hücre zarıyla çevrelenmiş halde kalınca yapısını korudu; araştırma ekibi vakum altında kurumasını önlemek için örneğin yüzeyini bir glikoz çözeltisiyle kapladı.

Güçlü elektron ışınları önemli bir problem teşkil ediyordu ancak araştırmacılar bakteriyorodopsin molekülünün organizmanın hücre zarı içindeki organizasyonundan yararlandı. Tam doz elektron bombardımanına tutmak yerine örneğe daha zayıf bir elektron ışını gönderdiler. Görüntünün kontrastı düşüktü ve atomları ayrı ayrı göremiyorlardı, ancak proteinlerin hücre zarı içinde düzenli

bir şekilde istiflenmiş olması ve aynı doğrultuda bulunması gerçeğinden faydalandılar. Tüm proteinler elektron ışınlarını neredeyse aynı şekilde kırınma uğratınca araştırmacıların kırınım deseni üzerinden hesaplamalı olarak daha ayrıntılı bir görüntü elde etmesi mümkün oldu. Bunu yaparken X-ışını kristalografisinde kullanılan benzer bir matematiksel yaklaşım kullandılar.

Sonraki aşamada araştırmacılar elektron mikroskopu altındaki hücre zarını çevirerek farklı açılardan görüntüler aldı. Bu yolla 1975'te bakteriyorodopsinin yapısını gösteren üç boyutlu bir taslak model oluşturmak mümkün oldu (Şekil 2). Model protein zincirinin hücre zarı kesitini yedi defa diklemesine kat ettiğini gösteriyordu.



Şekil 2.
Bakteriyorodopsinin
1975'te yayımlanan ilk taslak
modeli

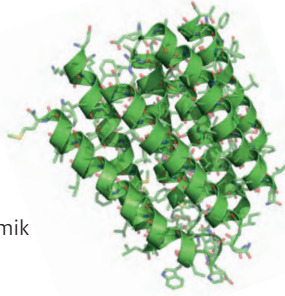
Kaynak: *Nature*,
Sayı 257, s. 28-32

Bu bir proteinin o zamana kadar bir elektron mikroskopuyla elde edilmiş en iyi görüntüsüydü. Pek çok insan elde edilen 7 Ångström'lük (0,0000007 milimetrelik) çözünürlükten etkilenmişti, ancak bu Richard Henderson için yeterli değildi. Onun amacı X-ışını kristalografisiyle elde edilen yaklaşık 3 Ångström'lük çözünürlüğe ulaşmaktı ve elektron mikroskopisiyle daha iyisinin yapılabileceğinden emindi.

Henderson Atomik Çözünürlükteki İlk Görüntüyü Elde Ediyor

Sonraki yıllarda elektron mikroskopisi aşama aşama gelişti. Daha iyi mercekler üretilmeye başlandı ve örneklerin ölçümler sırasında sıvı azotla soğutularak elektron ışınlarının zararlı etkilerinden korunmasını sağlayan kriyoteknoloji (bu konuya daha sonra döneceğiz) gelişti.

Richard Henderson bakteriyorodopsin modeline gitgide daha fazla ayrıntı ekledi. En net görüntüleri alabilmek için dünyanın dört bir tarafındaki laboratuvarlarda bulunan en iyi elektron mikroskoplarından faydalandı. Hepsinin kendine özgü zayıflıkları vardı ancak birbirlerinin eksikliklerini tamamlıyorlardı. Sonunda 1990'da, ilk modeli yayımlamasından 15 yıl sonra Henderson amacına ulaştı ve bakteriyorodopsinin atomik çözünürlükte bir görüntüsünü ortaya çıkarabildi (Şekil 3).



Şekil 3.
Henderson 1990'da bakteriyorodopsinin atomik çözünürlükteki yapısını ortaya koydu.

Böylece cryo-EM'in X-ışını kristalografisiyle elde edilenler kadar ayrıntılı görüntüler üretebildiğini kanıtlamış oldu. Bu da önemli bir dönüm noktasıydı. Ancak bu ilerleme bir istisna üzerine inşa edilmişti: Proteinin kendini hücre zarı içinde düzenli bir şekilde istiflemiş olması. Çok az sayıda protein kendini bu şekilde düzenleyebilir. Sorun yöntemin genelleştirilmesiydi:

Elektron mikroskopuyla örnek içinde rastgele dağılmış halde olan ve farklı doğrultularda bulunan proteinlerin yüksek çözünürlüklü üç boyutlu görüntüleri elde edilebilecek miydi? Başkaları bunun bir ütopya olduğunu düşünse de Richard Henderson mümkün olduğu görüşündeydi.

Atlantik'in diğer tarafında, New York Eyalet Sağlık Dairesi'nde Joachim Frank tam da bu probleme çözüm bulmak için uzun zamandır çalışmaktaydı. 1975'te elektron mikroskopuyla elde edilen iki boyutlu görüntülerin sahip olduğu görünürde minimal düzeydeki bilgilerin yüksek çözünürlüklü üç boyutlu bir bütün oluşturmak üzere birleştirileceği kuramsal bir strateji ortaya koydu. Bu düşüncüyü hayata geçirmesi ise on yıldan fazla sürdü.



Joachim Frank

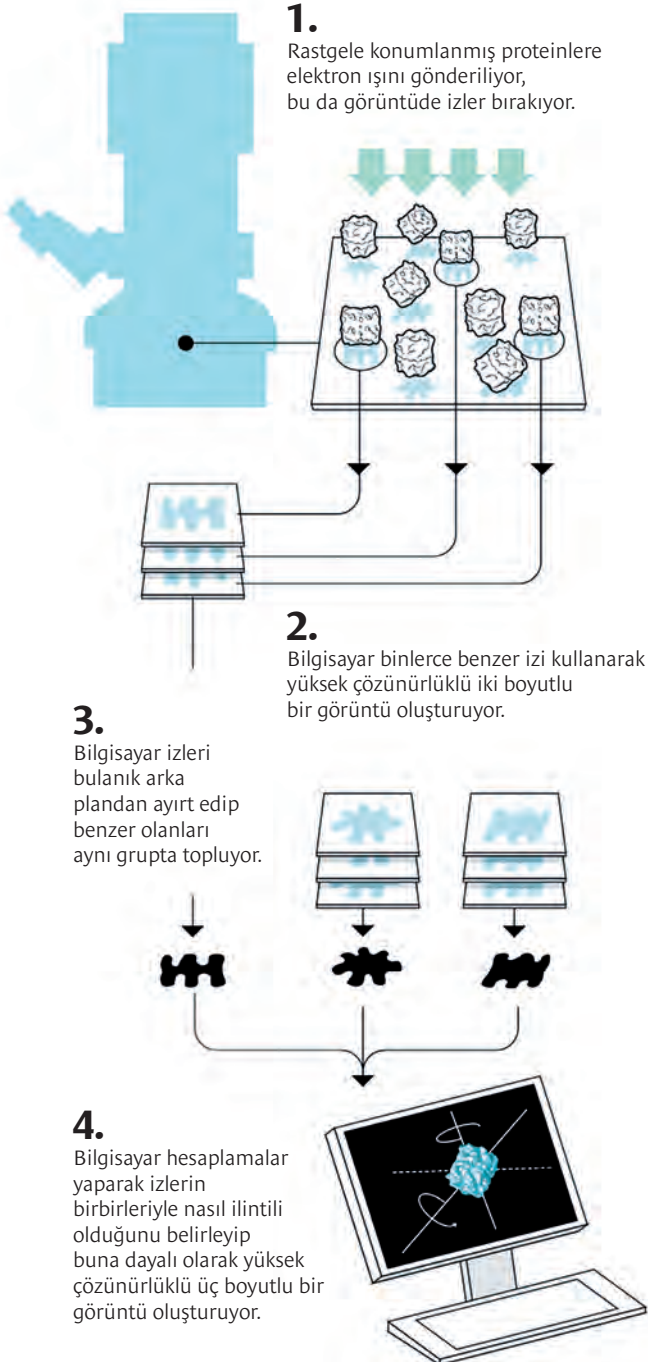
Frank Görüntü Analizini Geliştiriyor

Joachim Frank'ın stratejisi (Şekil 4) bir bilgisayarın bulanık bir elektron mikroskobu görüntüsünde rastgele konumlanmış proteinlerin izlerini arka plandan ayırt etmesine dayanıyordu. Frank bilgisayarın görüntüdeki yineleyen farklı desenleri belirlemesini sağlayan matematiksel bir yöntem geliştirdi.

Bilgisayar benzer desenleri aynı grupta topluyor ve bu görüntülerdeki bilgileri birleştirerek ortalama ve daha net bir görüntü oluşturuyordu. Bu yolla aynı proteini farklı açılardan gösteren bir dizi yüksek çözünürlüklü, iki boyutlu görüntü elde etti. Yazılımı oluşturan algoritmalar 1981’de tamamlandı.

Şekil 4.

Frank’in Üç Boyutlu Yapılar İçin Görüntü Analizi



Sonraki aşama iki boyutlu farklı görüntülerin birbirleriyle nasıl ilintili olduğunu belirlemek ve buna dayalı olarak üç boyutlu bir görüntü oluşturmaktır. Frank görüntü analiz yönteminin bu kısmını 1980’lerin ortalarında yayımladı ve bunu hücrede proteinlerin üretildiği devasa moleküler düzenek olan ribozomun yüzeyini gösteren bir model oluşturmada kullandı.

Joachim Frank’ın görüntü işleme yöntemi cryo-EM’in gelişiminde çok önemli bir rol oynadı. Şimdi birkaç yıl geriye, 1978’e gidiyoruz. Frank bilgisayar programlarını kusursuzlaştırmaya çalışmaktayken Jaques Dubochet Heidelberg’deki (Almanya) Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’nda işe başlamış ve elektron mikroskopunun bir başka temel problemine odaklanmıştı: Vakumlu ortamdaki biyolojik örneklerin kuruyup zarar görmesi.

Dubochet Sudan Cam Yapıyor

Henderson 1975’te hücre zarının kurumasını önlemek için bir glikoz çözeltisi kullanmıştı, ancak bu yöntem suda çözünen biyomoleküllerde işe yaramıyordu. Başka araştırmacılar örnekleri dondurmayı denemişti çünkü buz suya göre daha yavaş buharlaşıyordu, ancak buz kristalleri elektron ışınlarını o kadar dağıtıyordu ki elde edilen görüntüler bir işe yaramıyordu.

Buharlaşan su başlıca ikilemlerden biriydi. Ancak Jaques Dubochet potansiyel bir çözüm buldu: Suyu sıvı haliyle katılaştırmak yani kristal yerine cam oluşturmasını sağlayacak kadar hızlı soğutmak. Cam katı gibi görünse de aslında sıvı bir maddedir, çünkü molekülleri düzensiz haldedir.

Dubochet eğer sudan cam (camlaştırılmış su da deniyor) oluşturmayı başarırsa elektron ışınının dengeli şekilde kırınıma uğrayıp düzenli bir arka plan oluşturacağını fark etti.

Araştırma grubu başlangıçta minik su damlalarını -196°C 'deki sıvı azotta camlaştırmaya çalıştı. Ancak azot yerine sıvı azot yardımıyla soğuttukları etan kullandıklarında başarılı oldular. Mikroskopta incelediklerinde bir damlanın daha önce gördükleri hiçbir şeye benzemediğini gördüler. Önce bunun etan olduğunu sandılar. Ancak damlayı hafifçe ısıttıklarında moleküller birden aşına oldukları buz kristali yapısına büründü. Bu, özellikle de bazı araştırmacıların su damlalarını camlaştırmamanın imkânsız olduğunu iddia ettiği düşünülürse bir zaferdi. Bugün suyun evrende en yaygın bulunan halinin camlaşmış su olduğu sanılıyor.

Kontrast İçin Basit Bir Teknik

1982'deki büyük ilerlemeden sonra Dubochet'nin araştırma grubu hızla cryo-EM'de hâlâ kullanılan bir tekniğin temellerini geliştirdi (Şekil 5). Başlangıçta çeşitli biçimlerdeki virüslerden oluşan biyolojik örneklerini suda çözdüler. Daha sonra çözeltiyi ince bir metal kafes üzerine ince bir film şeklinde yaydılar. Sonra da kafesi çok hızlı bir şekilde sıvı etana batırarak suyun camlaşmasını sağladılar.

Jaques Dubochet 1984'te yuvarlak ve altıgen yapıdaki farklı bir dizi virüsün ilk görüntülerini yayımladı. Virüsler arka plandaki camlaşmış su ile keskin bir kontrast içinde görünüyordu.



Jaques Dubochet

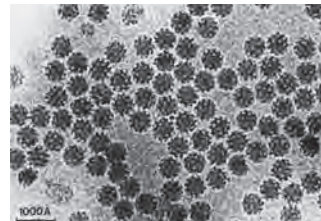
Artık biyolojik materyaller elektron mikroskobu için görece kolay bir şekilde hazırlanabiliyordu. Araştırmacılar kısa süre içinde yeni tekniği öğrenmek için Dubochet'nin kapısını aşındırmaya başladı.

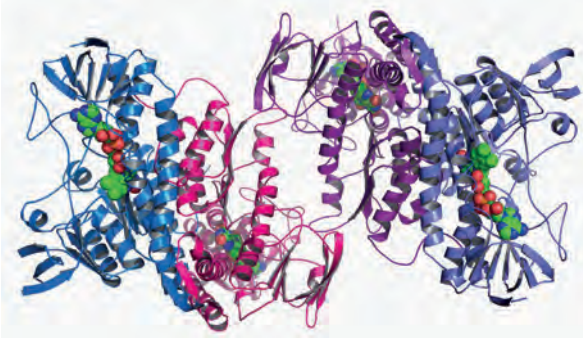
Şekil 5.
Dubochet'nin
Camlaştırma Yöntemi



Dubochet 1984'te camlaşmış suyla çevrelenmiş virüslerin ilk görüntülerini elde etti.

Kaynak: *Nature*, Sayı 308, s. 32-36





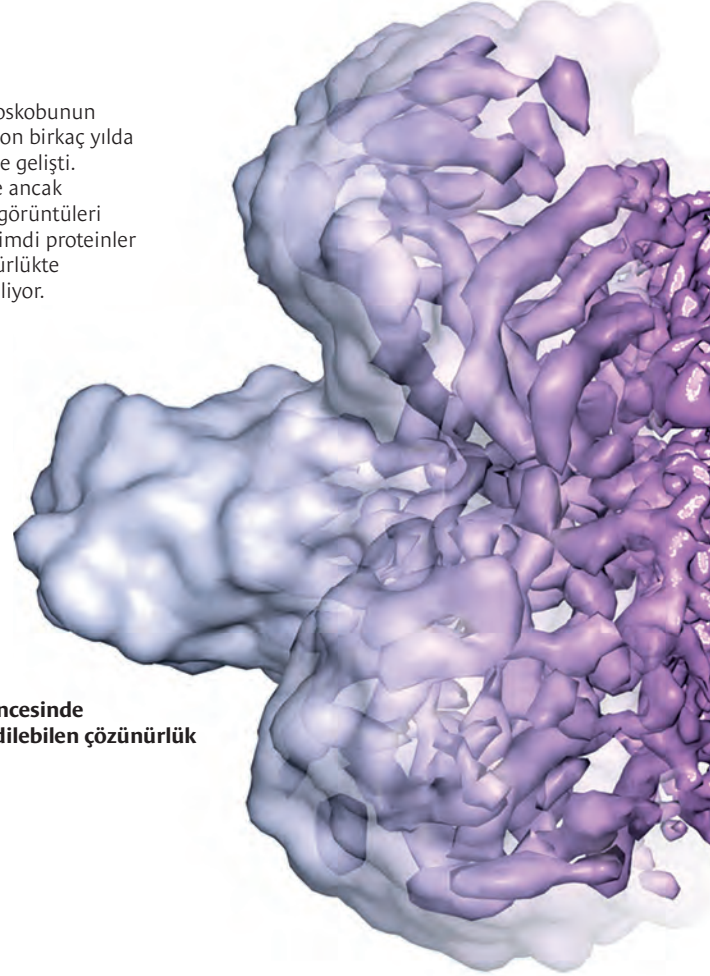
“Bloboloji”den Devrime

Sonuçta cryo-EM’in en önemli parçaları yerine oturmuştu ancak görüntülerin çözünürlükleri hâlâ düşüktü. 1991’de Joachim Frank, Dubochet’nin camlaştırma yöntemini kullanarak ribozom örnekleri hazırladı ve görüntüleri kendi yazılımını kullanarak analiz etti. 40 Ångström’luk çözünürlüğe sahip üç boyutlu yapı modelleri oluşturdu. Bu elektron mikroskopisi için müthiş bir gelişmeydi ancak görüntü sadece ribozomun dış hatlarını gösteriyordu. Görüntünün çözünürlüğü X-ışını kristalografisiyle elde edilenin yanından bile geçemiyordu.

Cryo-EM’le düzensiz bir yüzey dışında bir görüntü elde etmek pek mümkün değildi. Bu yüzden Frank’in bu görüntüleri bir su damlasınunkine benzetmesinden yola çıkılarak yöntem “bloboloji” (İngilizce “blob” su damlası) diye anılarak alay konusu ediliyordu. Ancak zamanla elektron mikroskopunun pek çok yönü optimize edildi. Bu, büyük ölçüde Richard Henderson’un elektron mikroskopunun günün birinde tek tek atomları gösteren görüntüler sağlayan rutin bir araç olacağı yönündeki vizyonunu inatçı biçimde koruması sayesinde mümkün oldu.

Çözünürlük Ångström Ångström arttı ve 2013’te yeni tür bir elektron detektörünün kullanıma girmesiyle son teknik engel de aşılmış oldu (Şekil 6).

Şekil 6. Elektron mikroskopunun çözünürlüğü son birkaç yılda çarpıcı biçimde gelişti. Birkaç yıl önce ancak şekilsiz yüzey görüntüleri alınabilirken şimdi proteinler atomik çözünürlükte görüntülenebiliyor.

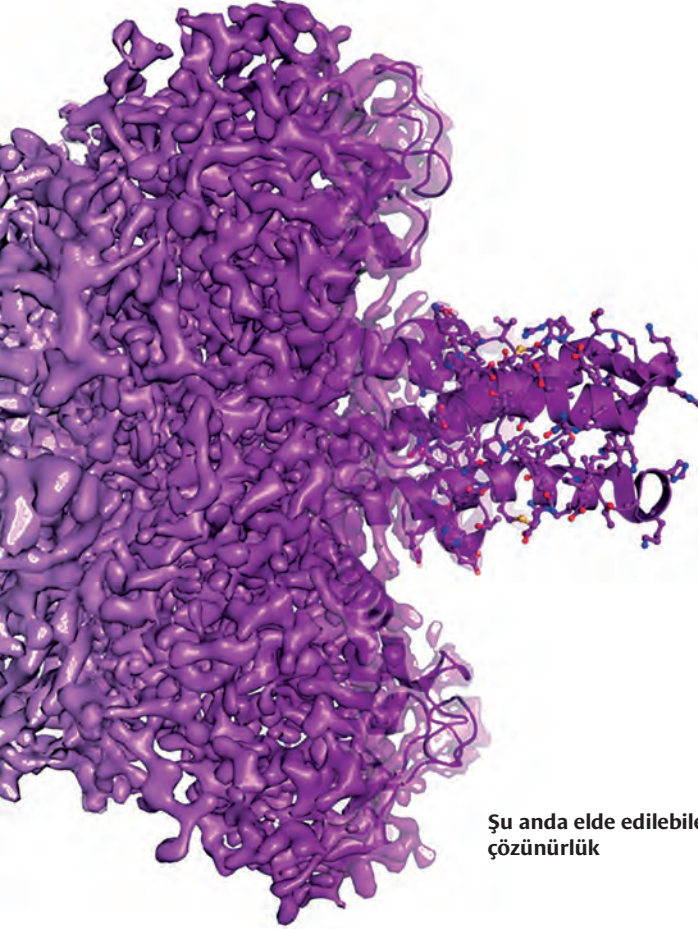


2013 öncesinde elde edilebilen çözünürlük

Hücrenin En Gizli Saklı Köşeleri Keşfedilebilir

Artık rüya gerçek oldu ve bugün biyokimya alanındaki gelişmelerde bir patlama yaşanıyor. Cryo-EM sağladığı faydalar nedeniyle çığır açıcı: Dubochet’nin camlaştırma yöntemi görece kolay kullanılabilir ve çok az miktarda örnek gerektiriyor.

Hızlı soğutma işlemi sayesinde biyomoleküllerin hareket halindeyken dondurulması mümkün oluyor ve araştırmacılar bir sürecin farklı kısımlarını gösteren görüntü dizileri oluşturabiliyor.



Şu anda elde edilebilen çözünürlük

Böylece proteinlerin nasıl hareket edip başka moleküllerle etkileştiğini gösteren “filmler” üretebiliyorlar.

Cryo-EM’i kullanarak büyük moleküler kompleksleri ve sıklıkla ilaçlar için hedef rolü üstlenen hücre zarı proteinlerini görüntülemek de her zamankinden daha kolay. Ancak küçük proteinler elektron mikroskopuyla incelenemiyor.

Ama onlar da NMR spektroskopisi ve X-ışını kristalografisi kullanılarak görüntülenebiliyor.

Joachim Frank 1975’te görüntü işleme yöntemine ilişkin stratejisini sunduğunda bir araştırmacı şöyle yazmıştı: “Eğer bu tür yöntemler mükemmelleştirilebilirse bir bilim insanının deyimiyle sınır gökyüzü olur.”

İşte şimdi o noktadayız, sınır gökyüzü. Jaques Dubochet, Joachim Frank ve Richard Henderson araştırmalarıyla -Nobel Ödülü’nün tanımındaki deyimle- “insalığa en büyük faydayı” sağladılar.

Bugün hücrenin her bir köşesi atomik ayrıntıda görüntülenebiliyor ve biyokimyayı heyecan verici bir gelecek bekliyor. ■

Kaynaklar
“The Nobel Prize in Chemistry 2017 - Popular Information: They captured life in atomic detail”. [Nobelprize.org](http://www.nobelprize.org).
Nobel Media AB 2014. Web. 14 Nov 2017.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/popular.html

