

Işık Mikroskopunun Asırlık Sınırının Ötesine Geçiř

**Nobel'e Giden Yolda
Fluoresan Mikroskopun
Nanoskoba Dönüřümü**

Prof. Dr. Nuhan Puralı [Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

Yaşadığımız dünyayı ve evreni algılayışımız duyularımızla ve bilincimizle sınırlıdır. Yani ne kadar duyar, ne kadar tadarsak, ne kadar görürsek dünyamız da o ölçüde genişleyip zenginleşir. Duymadıklarımız, tattıklarımız ve görmediklerimiz dünyamızda yer almaz, bizim için yoktur. Var olmadıklarını düşünür, farkına varmadan öyle eksik yaşarız. İnsanoğlunun bilgiye ve yeniliklere olan bitmek bilmeyen tutkusu onu yeni dünyaları keşfetmeye ve yaşadığı evreni genişletmeye yöneltmiştir. Bunun için duyularının yetersiz kaldığı durumlarda yeni cihazlar ve yöntemler geliştirip biyolojik

sınırları nedeniyle algılamasının olanaksız olduğu evrenlere erişmiş, bilgisini ve bilincini geliştirmiştir. Mikroskop da böyle bir cihazdır, mikron ölçeğindeki göremediğimiz evreni bize görünür kılar. Bu yazımızda ışık mikroskobunun çözünürlük limitini Ernst Abbe'nin 1873'te koyduğu sınırın altına çekmeleri ve floresan mikroskobu da mikrometre (μm) çözünürlük aralığından nanometre (nm) çözünürlük aralığına taşıma yolundaki çalışmaları nedeniyle 2014'te Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülen Eric Betzig, Stefan Hell ve William E. Moerner'in çalışmalarını ve süper çözünürlük mikroskopları konu alıyoruz.



Eric Betzig



Stefan Hell



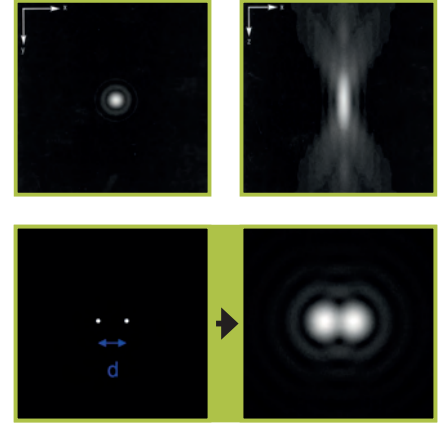
William E. Moerner

Işık Mikroskobu ve Çözünürlük Sınırı

Modern zamanlarda araştırma laboratuvarlarındaki cihazlar ve kullanılan yöntemler o kadar karmaşık hale gelmiştir ki bunlara kullanışlı ve bir ölçüde anlamlı bir isim verebilmek için bu cihazları ve yöntemleri tarif eden kelimelerin sadece baş harflerini kullanmak gerekir: Örneğin LASER, NMRI, TIRF. Ancak mikroskop bu açıdan farklıdır, yani tek kelimelik ismi cihazın tüm işlevlerini tanımlar: “Mikroskop” mikron ölçeğindeki yapıları görmeye yarayan cihaz. Mütevazı ismine karşın mikroskopun öyle sıra dışı bir işlevi vardır ki, 17. yüzyılda Antonie van Leeuwenhoek tarafından icat edilmesinden sonra başta biyoloji olmak üzere hemen hemen tüm alanlarda bilime ve uygarlığımıza devasa katkılar sağlamıştır.

Örneğin bileşik mikroskopun mucidi Robert Hooke mantar şişe tıpasından kestiği ince dilimi mikroskopta incelerken gördüğü delikli yapı için ilk defa “hücre” terimini kullanmıştır. Daha sonra bu kavram mikroskop sayesinde biyolojiye uygulanmış ve canlıların fonksiyonel birimini tanımlamak için kullanılmıştır. Mikroskop olmasaydı bugünkü sıradan “hücre”, “mikrop” gibi kelimeler dilimizde olmayacaktı. Işık mikroskopu eşsiz işlevi nedeniyle günümüzde en karmaşık laboratuvarlardan en mütevazı olanlarına kadar istisnasız her yerde kullanılmaktadır. Kurgusunun basit, kullanımının kolay ve maliyetinin düşük olmasının yanı sıra kontrast oluşturmak için kullanılan ışığın elektromanyetik dalga tayfının iyonize edici olmayan görünür bandından geliyor olması ışık mikroskopunun en büyük avantajlarıdır.

Tek bir nokta ışık kaynağının kırınım nedeniyle objektif merceğinde oluşan görüntüsü. Sol üst lateral düzlem, sağ üst dikey düzlem. Çözünürlük sınırına kadar yaklaştırılmış iki nokta ışık kaynağı (alt sol) ve bunların mercekteki görüntüleri (alt sağ).



Antonie van Leeuwenhoek



Yıpratıcı, zarar verici olmaması yani noninvazif özelliği nedeniyle ışık mikroskobu kolaylıkla canlı dokulara ve hücrelere uygulanabilir ve biyolojik süreçler gerçek yaşam döngüsü içinde takip edilebilir. Bu üstünlüklerine karşın ışık mikroskobunda temel bir kısıtlılık vardır: Çözünürlük. Elektromanyetik dalgalar fiziki özellikleri nedeniyle hem parçacık hem de dalga gibi davranır. Elektromanyetik tayfta dalga boyu kısalıkça parçacık karakteri, uzadıkça da dalga karakteri öne çıkar. Aynen bir yarıktan geçerken olduğu gibi, ışık objektif merceğinden geçerken dalga karakteri nedeniyle kırınımına uğrar. Bu nedenle 0,2 μm 'den daha küçük yapıları ışık mikroskobunda ayırt etmek mümkün değildir. Buna Abbe'nin çözünürlük sınırı denir. Bu sınır kritik bir değerdir, iki kat iyileşse ve çözünürlük sınırı yarıya inerse 100 nm büyüklüğündeki bazı polimer yapıları görmek mümkün olabilir, on kez iyileşse 20-30 nm büyüklüğündeki proteinler görüntülenebilir yani moleküler çözünürlüğe ulaşılabilir. Aslında elektron mikroskobu ile elektron ışınları kullanarak ışık mikroskobundan 1000 kat daha yüksek çözünürlükte görüntü elde etmek mümkündür. Ancak elektron ışınları o kadar güçlüdür ki kontrast oluşturmak için biyolojik örneğin metalle kaplanması gerekir.

Metalle kaplanan örneğin canlı kalması mümkün olmadığından bu yöntemi pratikte canlı hücrelere uygulamak mümkün değildir. İşte tam bu noktada araştırmacılara "ışık mikroskobu gibi zararsız bir mikroskop olsa ve çözünürlüğü ondan 10 veya 100 kat fazla olsa, nasıl olur?" diye sorulsa eminim hepsi "süper olur" diye cevap verecektir.

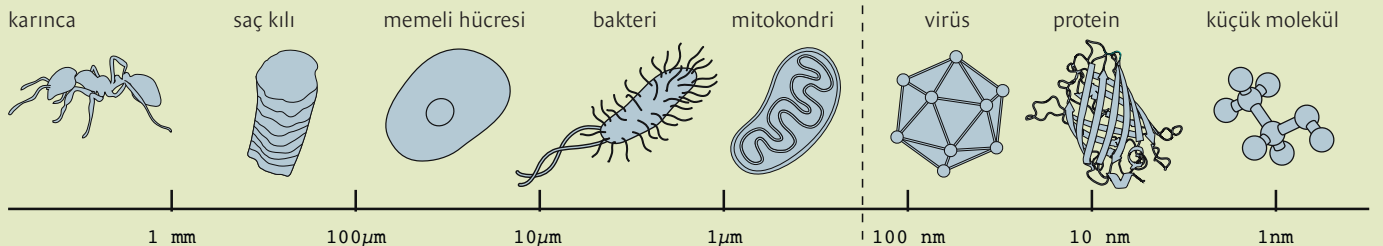
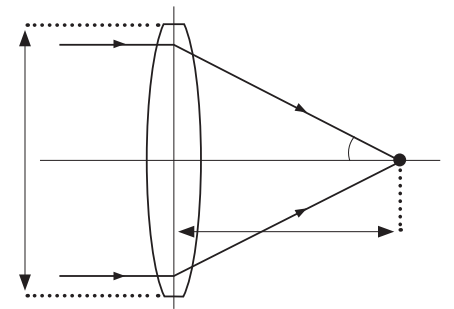
Bu yazımızda süper çözünür fluoresan mikroskopların gelişimi ve Nobel Kimya Ödülü'ne giden yol anlatılıyor. Ancak teknik detaylara geçmeden önce mikroskop objektif merceğinde kırınım, güç dağılım fonksiyonu ve fluoresan ilke kavramlarını kısaca gözden geçirmek gerekir.

Bir yarıktan geçen ışık ışınları dalga özellikleri nedeniyle kırınımına uğrar. Benzer şekilde objektif merceğinde de kırınım deseni oluşur. Bir nokta ışık kaynağına objektif mercekten bakacak olursak nokta şeklinde bir görüntü oluşmadığını görürüz. Kırınım nedeniyle ortada bir merkezî aydınlanma çemberi ve onun etrafında ardışık halde sönme aydınlanma halkalarından oluşan bir girişim deseni görülür. Yani odak noktası aslında bizim geometrik optikte varsaydığımız gibi sonsuz küçüklükte bir nokta değil lateralde çember, dikeyde ise elips ile sınırlı bir aydınlanma bölgesidir.

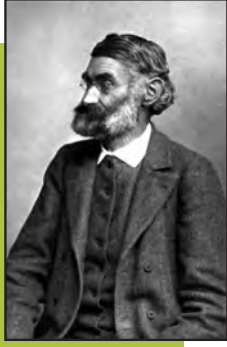
Bileşik mikroskobun mucidi Robert Hooke mantar şişe tıpasından kestığı ince dilimi mikroskopta incelerken gördüğü delikli yapı için ilk defa "hücre" terimini kullanmıştır.

Kırınım deseni oluştuğunda aydınlanma bölgesinin büyüklüğü ışık kaynağının büyüklüğü ile ilişkilidir. Belli bir büyüklükten sonra nokta ışık kaynağı ne kadar küçültürseniz küçültün merkezî aydınlanma bölgesinin boyutu değişmeyecektir. Çözünürlük kavramı tanımı gereği ayırt etme anlamına geldiğinden belli bir boyuttan daha küçük cisimleri mikroskop görüntülerinden ayırt etme imkânı olmayacaktır.

Objektif merceğinde çözünürlük sınırının hesaplanmasında kullanılan kırılma olgusunun geometrik gösterimi



İki tane nokta ışık kaynağımız olduğunu ve bunları yavaş yavaş birbirlerine yaklaştırdığımızı düşünelim, belli bir sınırdan sonra bu iki ışık kaynağına ait görüntü birbirinin içine geçecek ve tek bir görüntü olarak algılanacaktır. İki örneğin görüntülerinden ayırt edilebildiği son yaklaşma mesafesine “çözünürlük sınırı” denir. Bu sınırın altındaki cisimleri çok küçük olmalarına rağmen ancak merkezî aydınlanma alanı büyüklüğünde, eğer birden fazla cisim varsa tek bir cisim olarak görüntüleyebiliriz. Her iki durum da çözünürlüğün yetersiz olduğu şartları açıkça tanımlar.



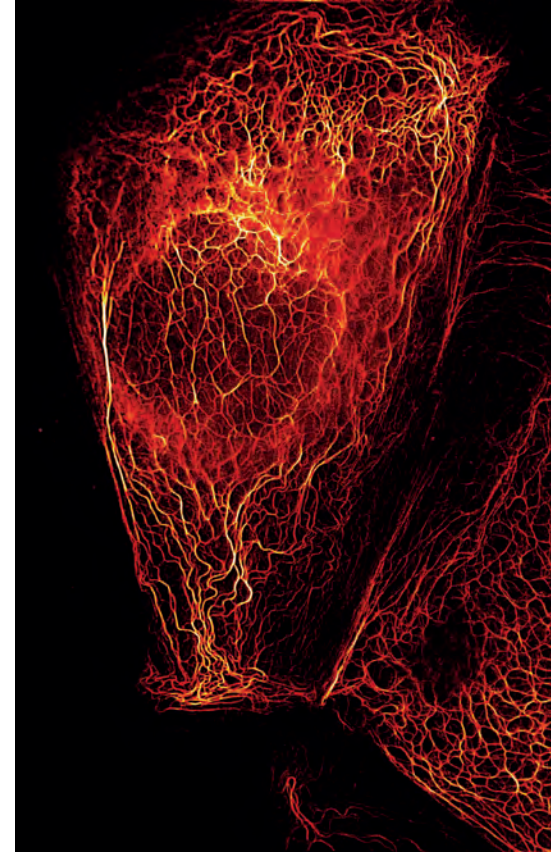
Ernst Karl Abbe
(1840-1905)
Alman fizikçi ve sanayici. 1861'den başlayarak Göttingen Üniversitesi'nde kuramsal fizik profesörlüğü ve gözlemevi yöneticiliği yapmıştır.

Ünlü Alman fizikçi Ernst Abbe, mikroskop merceğinin çözünürlük sınırlarını veren denklemi en yalın haliyle $s = \lambda / 2$ şeklinde ifade etmiştir. Denklem güncel hali $s = \lambda / (2n \sin(\theta))$ veya $s = 0,61 \lambda / (n \sin(\theta))$ şeklindedir. Burada λ ışığın dalga boyunu, $n \sin(\theta)$ ortamın kırma indisi ile odak konisinin merkezî eksenle yaptığı açının sinüsünün çarpımını verir. İkinci terim nümerik açıklık (NA) olarak tanımlanır, bu durumda denklem $s = 0,61 \lambda / NA$ halini alır.

Görüldüğü gibi çözünürlüğü artırmak için alınabilecek önlemlerden biri ortamın kırma indisini artırmak ve odak konisini genişletmektir. Örneği immersiyon yağına batırmak, odak konisi geniş büyük mercekler kullanmak çözünürlüğü sınır değere kadar ulaştırabilir; bu da $0,2 \mu\text{m}$ 'dir ve Abbe'nin çözünürlük sınırı olarak ifade edilir. Yıllar boyu bu sınırın ötesine geçmek birçok araştırmacı için büyük bir bilimsel tutku olmuştur.

Görüldüğü gibi merkezî aydınlanma alanı yatay ve dikey eksendeki çözünürlüğü belirleyen en başat unsurdur. Bu kısım görüntülerin oluşturulmasında birim yapı görevi görür. Cisim ne kadar küçükse ayrıntıları da o ölçüde detaylı olarak görüntüye yansiyacaktır. Tersi durumda çözünürlük kötüleşecektir. Fotonun bir objektif merceği konisinin belli bir bölgesinde bulunma olasılığını veren denkleme “güç dağılım fonksiyonu” denir. Fotonun merkezî aydınlanma bölgesinde bulunma olasılığı diğer bölgelerde bulunma olasılığından milyonlarca kat fazladır. Dolayısıyla çözünürlüğü artırmak için yapılacak müdahalelerin bu bölgeye odaklanması gerekir. Doygun ışık kaynaklarının kullanıldığı standart mikroskoplarda buraya müdahale etmek pek mümkün olmaz. Ancak floresan mikroskoplar bu iş için daha uygun olabilir. Floresan ilkesine göre temel yörüngede dönen bir elektron uygun dalga boyundaki ışıkla uyarılsa, ışıktaki enerjiyi emip bir üst yörüngeye sıçrayabilir. Ancak elektron yüksek enerjili bu yörüngede kararlı olmadığından üstündeki enerjiyi bir ışıma ile yayarak tekrar kararlı yö-

rüngesine düşer. Bu olayın bütününe floresan döngü denir. Uyarı ışığının enerjisinin molekül tarafından alınmasına emilim, temel yörüngeye düşme sırasında oluşan ışımaya da emisyon denir. Bu ilkeyle çalışan ışık mikroskopları floresan mikroskop olarak sınıflandırılır. Parlak alan mikroskopisinde görüntü aydınlatma ışığının yansıma ve saçılmasıyla oluşan kontrast sayesinde oluşurken floresan mikroskoplarda cismin kendi yaydığı emisyon ışığı sayesinde oluşur. Uyarı ve emisyon ışıkları farklı dalga boylarında oldukları için filtrelerle tamamen ayrılabilir. Bu durum çözünürlüğü artırmak için önemli iki alternatif sunar: Merkezî aydınlanma bölgesindeki emisyonu kısarak veya uyarılma bölgesini sınırlandırarak çözünürlüğü iyileştirmek.



Her iki yöntem de uzun uğraşlar sonucunda yakın zamanda hayata geçirilmiş ve molekülleri görüntüleyebilen süper çözünür mikroskopların mucitleri 2014 yılı Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür. Bundan sonraki kısımda mucitleri ve bu iki yöntemi göreceğiz.

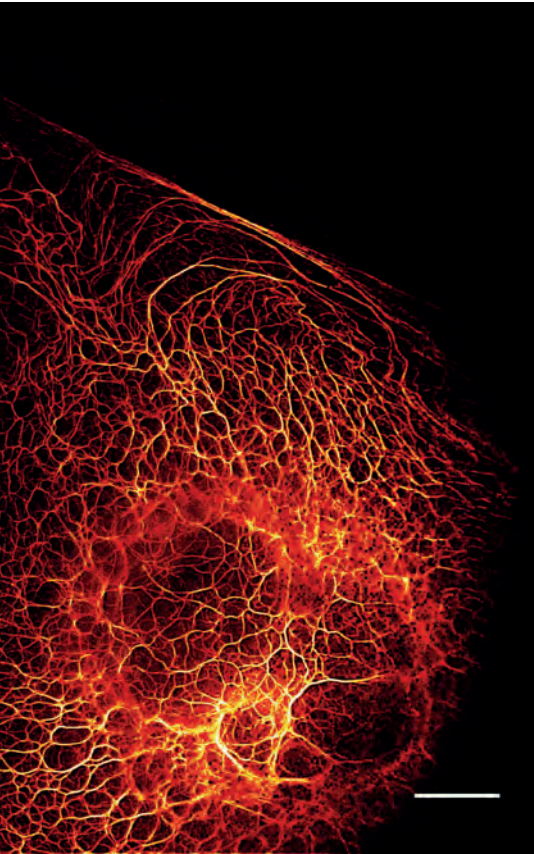
Stefan Hell ve STED Mikroskobunun Geliştirilmesi

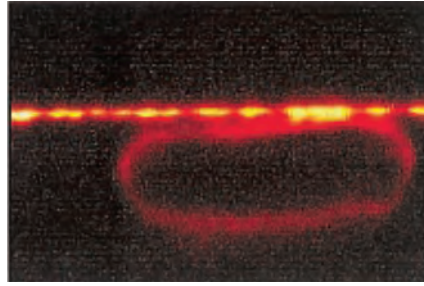
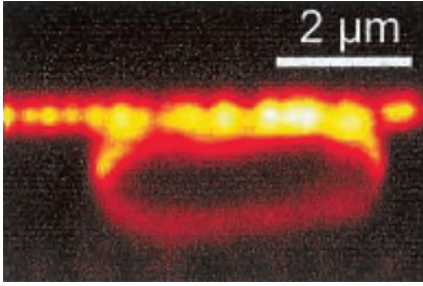
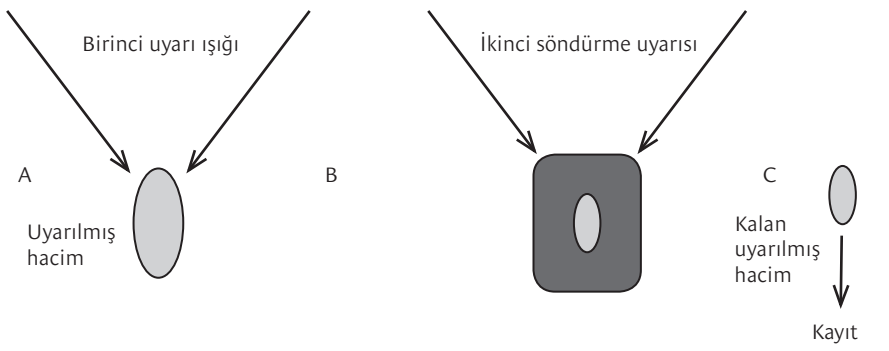
Stefan Hell 1962'de Arad'da (Romanya) mühendis ve ilkökul öğretmeni bir ana babanın tek çocuğu olarak dünyaya geldi. Etnik kökenleri

nedeniyle geçmişte sürgüne maruz kalan aile sadece bilgi ve deneyimlerini beraberlerinde götürebileceklerini, bunların kendilerinden alınmayacağını biliyor ve bu nedenle eğitime çok önem veriyordu. Annesinin öğretmen olması sayesinde erken yaşta okumayı öğrendi. Bilim insanı olmaya çok küçük yaşta karar verdi. 14 yaşında Timasoara Nikolaus Lenau Lise'sine kabul edildi.

Okulun idealist öğretmenlerinin eğitimine ciddi katkısı oldu. Ancak o zamanlar Romanya'daki rejimin azınlıklara karşı sertleşmesi ve annesinin hastalığı nedeniyle 1978'de ailesiyle beraber Almanya'ya göçtü. Almanya'daki eğitim olanakları müthişti, kendisine bir hedef koydu ve yaşlılarından 1 yıl erken mezun olarak 1981'de Heidelberg Üniversitesi'nde fizik okumaya başladı. Başlarda çekirdek fiziğine, daha sonra görüntüleme araçlarına yöneldi. Bitirme tezini hazırlarken optikteki açışal sınırlamayı kuramsal olarak test etti. Bu sayede daha sonra 4Pi olarak geliştirilecek olan mikroskop yönteminin kuramını geliştirdi. Lisansüstü eğitimi sırasında hayatını kazanmak için hocasının teknoloji şirketinde çalışmaya başladı. Buradaki işinden çok memnun değildi. Daha sonra bir burs kazanınca tekrar araştırmalarına yoğunlaşma fırsatını elde etti. Araştırmaları sonucunda çözünürlük sınırı probleminin aradığı konu olduğuna karar verdi ve o günden sonra hayatını bu konuya adadı. 1990'da iki mercekli sistem konusundaki araştırmalarına dayanan doktora çalışmasını tamamladı. Ama tekrar işsiz kalmıştı. O zamanlar Almanya'da genç araştırmacıların projelerine destek bulmak

amacıyla bağımsız olarak başvurabileceği fonlar yok denecek kadar azdı. Heidelberg'deki hocalarıyla yazışmalarından birinde Prof. Christoph Cremer kırınım sınırını aşacak kadar küçük tarama halogramından oluşan kuramsal 4Pi yönteminden bahsetti. Bu Hell'in düşünce sisteminde büyük bir etki yarattı ve hologramı oluşturabilirse çözünürlüğü sınırın ötesine taşıyabileceğini anladı. Bu konu üzerinde 1993'e kadar çalıştı. Aldığı burs bitmişti ve Alman araştırma fonlarına başvurmak için istenen özelliklere de sahip değildi. Tam bu sırada daha önce birlikte çalıştığı Finli gruptan Pekka Hanninen onu Turku Üniversitesi'nden Prof. Erkki Soini ile tanıştırdı. 4Pi mikroskobu geliştirmek için bir proje hazırlayıp Turku'ya göç etti ve orada çalışmaya başladı. O zaman eldeki tek sağlam konu da buydu. Hell daha sağlam bir yöntem araştırırken, fluoresan durumlar arasındaki geçişin aradığı fiziksel temel olabileceğinin farkına vardı. Kısa bir araştırmadan sonra kafasında bir tür ters lazer de diyebileceğimiz uyarılmış emisyon söndürmesi ilkesi (*stimulated emission depletion*, STED) oluşmuştu. Kısa bir hesapla bunun mümkün olabileceğini de gördü. Ancak bu ilkeyi Turku'daki imkânlarla hayata geçirmek pek mümkün değildi. Önce patent başvurusunda bulundu ve daha sonra kuramsal çalışmalara başladı. STED yöntemiyle ilgili kuramsal çalışmasını bir fizik dergisine gönderdi ama sonuç olumlu olmadı. Daha da vahimi her ortamda STED yöntemini anlatmasına rağmen o dönemde kimse STED yöntemini kendi laboratuvarında test etmeyi düşünmedi bile.





STED ilkesinin grafik anlatımı (üstte) ve ilk makalede kullanılan fotoğraf.

Aynı örneğin konfokal (solda) ve 3 kez daha yüksek çözünürlükte STED ile elde edilmiş görüntüsü (sağda) (Hell ve ark., *PNAS*, Sayı 97, s. 8201-8210, 2000.)

1995'te yaptıkları bir proje başvurusu da reddedildi. Bu durumda iş başa düştü. Hell 4Pi mikroskobu üzerindeki patent haklarını, Turku Üniversitesi'ne 100.000 dolar araştırma bursu vermeleri karşılığında bir Fin teknoloji şirketine sattı. Turku çalışmaları Hell'in hayatında en önemli aşamalardan birini oluşturur. 1996'da çalışmalarını Heidelberg'de eski hocalarına başarı ile sundu. Bu sunum sayesinde Almanya'da geçerli olan bir tür doçentlik sınavı olan *habilitation* aşamasını geçti. Böylece Alman makamlarına fon başvurusu yapma ve resmî olarak doktora öğrencisi kabul etme imkânını yakaladı. Bundan sonrası daha kolaydı, 1996'da Göttingen'de bir göreve atandı, bu arada Alman Araştırma Bakanlığı'nun fonlarına yaptığı başvurular hep reddediliyordu. Ancak sonunda hakemlerin muhalefetine rağmen ulusal

araştırma destek kurumu idari karar alıp projeye fon sağladı. Bu uygun ortamda Hell hızla sistemini geliştirdi ama ilk araştırma sonuçlarını içeren makalesi önce *Nature* sonra *Science* tarafından reddedildi. Sonunda 2000 yılında *Proceedings of the National Academy of Sciences*'da (PNAS) ilk STED makalesi yayımlandı. Bu arada kendisine Max Planck Enstitüsü'nde kalıcı bir kadro verildi. Ancak süper çözünürlüğü kabul ettirmek kolay değildi. 2003'te *Nature* dergisine yolladığı başka bir yayın daha reddedildi. Tüm bu karmaşa 2006'nın sonunda duruldu ve STED tüm akademik camia tarafından Abbe'nin çözünürlük sınırının ötesine geçen bir yöntem olarak benimsendi. Bugün STED üzerindeki patent süresi bitmiştir, piyasada tak çalıştır şeklinde, hiçbir ek ayar veya özel yapılmış parça gerektirmeden kullanılabilen cihazlar vardır.

Stefen Hell'in kendine ve bilgisine olan sarsılmaz inancı ve azmi sayesinde insanlık bu imkâna kavuşmuştur. Hell, halen Max Planck Enstitüsü'ndeki görevine devam ediyor ve başka görevlerinin yanı sıra genç araştırmacıların riskli projelerine destek olmak amacıyla oluşturulmuş bir fonun da yöneticisi.

STED mikroskobunun temel çalışma ilkesi fluoresan döngüye müdahale ederek merkezî aydınlanma bölgesindeki emisyon hacminin dıştan içe doğru söndürülerek küçültülmesidir. Lazer ışını, mikroskop altında nokta ışık kaynağı olarak kullanılabilir. Lazer ışını kullanılması durumunda, nokta ışık kaynağı örnek içinde belli bir noktayı aydınlatacak ve oradaki fluoresan molekülleri uyaracaktır. Dolayısıyla merkezî aydınlanma bölgesindeki fluoresan moleküller uyarılmış duruma geçecektir. Uyarılmış elektrona kendi enerjisine eşit bir ışın uygulanırsa elektron emisyonuna geçip temel yörüngeye düşer. Bu durum zaten lazer ilkesinin de temelini oluşturmaktadır. Ancak uyarılmış emisyon söndürmesi ilkesi bir tür ters lazer gibi çalışır ve emisyonun büyütülmesi yerine söndürülmesi için kullanılır. Şimdi olayları zamanlamaları ile birlikte tekrar gözden geçirelim. Lazer uyarısı ile merkezî aydınlanma bölgesindeki fluoresan molekülleri uyardığımızı düşünelim. Tüm elektronlar üst yörüngeye pompalandı. Eğer müdahale etmezsek bunlar zamanla fluoresan emisyon yaparak temel yörüngeye düşecektir. Ancak bu ilk lazerden sonra, uyarılmış molekülleri emisyon dalga boyuna sahip ikinci bir lazer ile tekrar uyarırsak hepsini anında söndürebiliriz.

Bu ikinci uyarı ışığını bir maske şeklinde gönderdiğimizizi yani ışığın merkezî aydınlanma bölgesinin çevresini hedef aldığını ve ortasını vurmadığını düşünürsek, merkezî aydınlanma bölgesinin dış kabuğunun hemen emisyon yapıp söndüğünü ortasının ise uyarılmış durumda kaldığını görürüz. Söndürülmemiş kısım daha sonra doğal seyri içinde fluoresan emisyon yaptığında, bu kısım ilk merkezî aydınlanma bölgesinden çok daha küçük olduğundan cismin çok daha yüksek çözünürlüklü görüntüleri ortaya çıkacaktır. STED ilkesi ile merkezî aydınlanma bölgesi süper küçültüldüğü için moleküler çözünürlüğe ulaşmak mümkündür. Burada en önemli teknolojik sınır lazerlerin zamanlaması ve maske uyarısının sentezidir. İlk başlarda STED sadece lateral (yani XY) düzleminde çözünürlük artışı sağlamak için tasarlanmıştır. Daha sonra geliştirilmiş ve Z ekseninde de çözünürlük artırılmıştır.

William E. Moerner, Eric Betzig ve PALM Mikroskobunun Geliştirilmesi

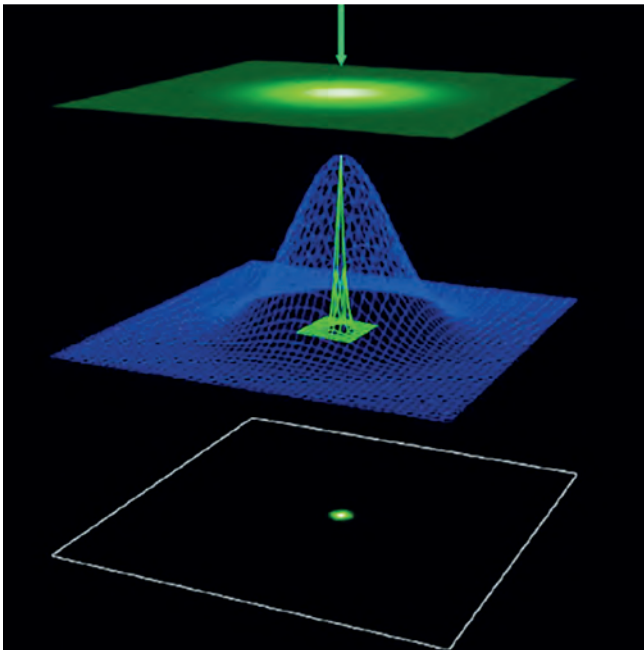
PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*) mikroskobu süper yer bulma ilkesine göre çalışmaktadır. Bu sistemin geliştirilmesi için uygun fluoresan problemlerin bulunması ve sistemin PSF başına tek bir molekül düşecek şekilde tasarlanması gerekmiş, bunlar da sırasıyla William E. Moerner ve Eric Betzig tarafından hayata geçirilmiştir. Biz de bu sıraya uyarak devam edeceğiz.

1953'te Kaliforniya'da doğan William E. Moerner'ın çocukluğu Teksas'ta, büyük aile ortamında geçmiştir. Annesi İngilizce öğretmenidir. Babası önce matematik ve fizik okumak istemiş ancak İkinci Dünya Savaşı nedeniyle Hava Kuvvetleri'ne katılmış, daha sonra yine Hava Kuvvetleri'nde fotoğrafçı olarak çalışmıştır.



Betzig'in Harald ile birlikte oturma odasında inşa ettiği ilk PALM mikroskop

William Moerner'ın bilime ve teknolojiye ilgisi ilkokulda kendisine hediye edilen telsiz seti ile başlamıştı. Okuldaki proje yarışmaları ve evin arka bahçesindeki barakada yaptığı deneyler sayesinde tüm gençlik yılları bilim ve araştırma ile geçti. 1970 yazında Loyola Üniversitesi'nin düzenlediği yaz bilim kampı gençlik yıllarının en önemli bilimsel deneyimiydi. Washington Üniversitesi'nden tam burs alarak mühendislik eğitimi almak üzere Teksas'tan ayrıldı. Katı hal fiziğine duyduğu ilgi nedeniyle Cornell Üniversitesi'nde doktora eğitimine başladı. Burada çok önemli bilim insanlarıyla birlikte çalışma imkânı buldu ve 1981'de doktorasını tamamladı. O dönemde fiziko-kimya konularıyla ilgilenmeye başladı. Daha sonraki IBM'in araştırma laboratuvarlarında çalışmaya başladı. Bu arada hayatının aşkı Sharon ile tanıştı ve 1983'te evlendiler. 1989'da yaptığı ilk çalışmada sıvı helyum içinde tek moleküle ait absorpsiyon olgusunu ölçtü. Benzer bir şekilde moleküller soğuk ortamda seyrek bir şekilde yerleştirildiğinde tek bir molekülden kaynaklanan emisyon standart geniş alan mikroskobunda görüntülenebileceğini düşündü. Bu fikir doğrudu ve test edilmeliydi. Ancak 1990'lı yıllarda IBM'de işler iyi gitmemeye başladı. Moerner tekrar akademide iş aradı.



PALM mikroskobunun temel işleme ilkesi.

Üstte

(soldan sağa sırayla) tek bir moleküle ait emisyon ışımalarının görüntüsü, bundan elde edilen şiddet yer grafiği ve merkezin belirlenmesi.

Altta,

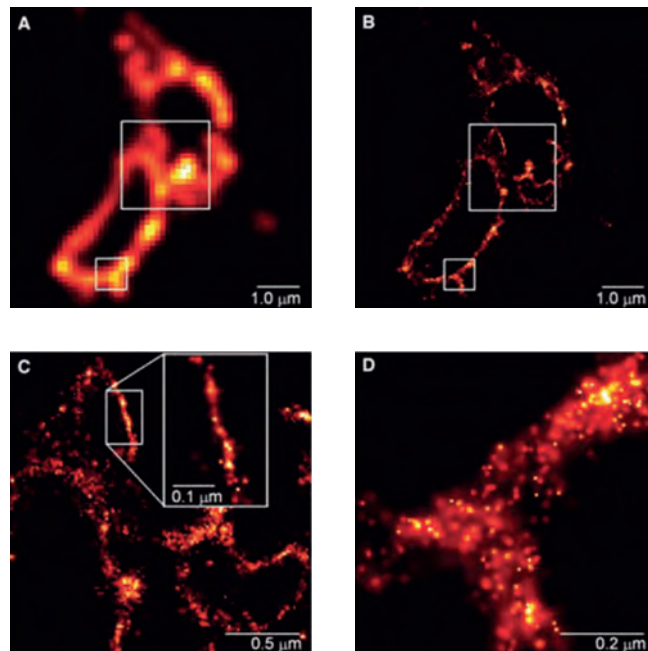
tam bir PSF'den tek bir molekülün yerinin tespit edilmesi.

California Üniversitesi'nde çalışmaya başlayınca yeşil fluoressan protein (GFP) üzerinde çalışan ve 2008'de Nobel Kimya Ödülü kazanacak olan Roger Tsien ile tanıştı. GFP varyantlarında yaptığı çalışmalar ile fluoressan moleküllerde durumlar arasında geçişin kontrol edilebileceğini ve bu sayede her bir molekülün birer moleküler lamba olarak kullanılabileceğini gösterdi (1997). Daha sonra Stanford Üniversitesi'ne geçti ve tek molekül görüntüleme çalışmalarına orada devam etti.

Eric Betzig üniversite şehri Michigan'da 1960'ta doğdu. Ailesinde akademisyen yoktu ama aile bireyleri çok çalışkan ve rekabet etmeyi seven kişilerdi. Genç yaşta bir arkadaşının bilim insanı olan babası onu çok etkilemişti. Onun sayesinde Bilim Postası isimli bir kulübe yazılmış ve her hafta yeni bir deney getiren postacının yolunu bekler olmuştu. Daha sonra eğitim hayatı boyunca çok çalışkan bir öğrenci olmuş, okul tarihinde biyoloji dersinden hiç kimsenin alamadığı A+ notunu alarak bir rekor kırmıştı. Kaybetmeyi sevmeyen bir yapısı vardı. Orta eğitimden sonra California Teknoloji Enstitüsü'nde fizik okumuş ve 1983'te mezun olmuştu. Cal-Tech'in çok iyi bir okul olmasına rağmen orada kuramsal eğitimin öne çıkması nedeniyle, o zamanlar uygulamalı fizik programı veren ender okullardan biri olan Cornell Üniversitesi'nde doktora çalışmalarına başlamıştı. Burada Aaron Lewis ve Mike Isaacson ile tanışınca süper çözünür mikroskop dünyasına giden yola çıkmış oldu. İlk çalışmaları yakın alan mikroskopisi üzerinedi.

Sabahları 4:30'da çalışmaya başlama- sına ve hiç ara vermeden devam et- mesine rağmen uzun bir süre dene- meleri hep başarısız oldu. Daha sonra elindekileri toplayıp gerçek bir fizikçi gibi hatanın nerde olduğunu bulma- ya ve probleme uzaktan bakarak ger- çekçi bir şekilde çözmeye yoğunlaştı. Bu sayede tarayıcı ucu geliştirip tarama cihazını üretmeyi başardı. Bunu 1992'de başarıyla canlı hücrelere uyguladı. 1989'da Moerner tek molekül- lü soğukta görüntülemeyi başarmıştı ama oda sıcaklığında bunu başa- ran henüz yoktu. Yaptığı yakın alan tarama cihazı ile tek molekülden kaynaklanan emisyonu görüntüledi- ğinde, ışığın bir top gibi değil de yay gibi yayıldığını ilk gören kişi oldu. Ancak yakın alan mikroskobu doğası gereği sadece yüzeylerde etkin çalışı- yordu ve hücre gibi düzensiz şekilli yapılara uygulanması da hemen he- men imkânsızdı. Bu nedenle bir süre umutsuzluğa düştü. Ayrıca 1994'te Bell Laboratuvarı da kapanacaktı.

Bu nedenle bir süre bilimsel araştırma çalışmalarına ara verdi ve evde kızı Kriya'ya bakmaya ve ara sıra da babasının şirketinde çalışmaya başladı. Bir gün kızını gezdirirken moleküllerin yerini belirlemenin süper çözünürlüğe giden yol olabileceğini düşündü. Bu arada babasının yanına taşındılar ve onun fabrikasında istediği gibi araştırma yapma imkânına kavuştu. Ancak sanayi üretim alanında aradığını bulamayınca babasının yanından ayrıldı. Tekrar bilimsel makaleler okumaya ve fizik bilgilerini yenilemeye başladı. Araştırmaya geri dönme kararında GFP (*green fluorescent protein*) keşfi çok etkili olmuştu. Kafasında süper çözünürlüğe giden yolu bulduğuna inanıyordu, kısa bir patent başvurusu yaptı. Dostu Harald ile beraber her ikisi ceplerinden 25.000 dolar koyarak 50.000 dolar bütçe ile ilk PALM mikroskobu evlerinin oturma odasında ürettiler. 2006'da *Science* dergisinde ilk yayınları çıktı.



GFP işaretli lizozomal proteinlerin görüntüsü.

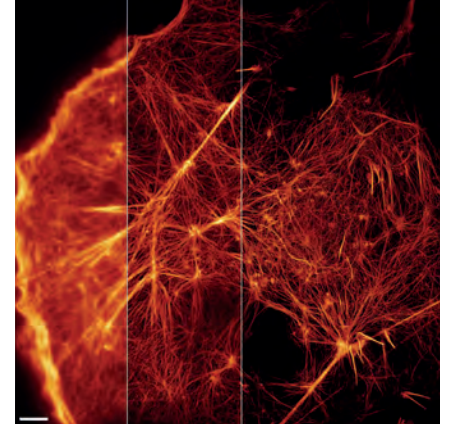
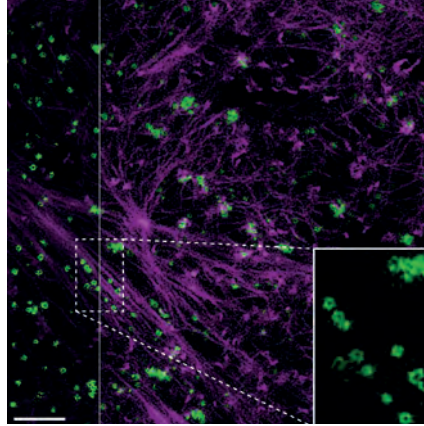
A normal mikroskopta, B, C ve D PALM ile elde edilmiş görüntüler. D'deki ölçü çizgisi Abbe'nin limitine eşittir.

(Betzig ve ark., *Science*, 2006)

Bu arada laboratuvarı da evden Howard Hughes Araştırma Kampüsü'ne taşıdılar. PALM mikroskopisi 2008'de *Nature Methods* dergisinde yılın yöntemi seçildi.

PALM mikroskopunun temel ilkesi süper yerleştirme üzerine kurulmuştur. Her seferinde çok az sayıda foton yollanarak çok az sayıda ve seyrek dağılımlı fluorensan molekül uyarılır. Sonuçta moleküller tek tek uyarıldıklarından arka plan gürültüsü olmayacaktır. Bunlardan yayılan emisyon kayıt edilir. Bu durum binlerce kez tekrar edilir. Eğer bu resim takımları bu amaçla filtrelenecek olursa, süper çözünürlüklü görüntüler elde etmek mümkün olacaktır. Güç dağılım fonksiyonu (PSF) incelendiğinde maksimum aydınlık şiddetinin molekülün yerleştiği yerde olacağı açıktır. Ardışık tekrarlarla her güç dağılım fonksiyonu için tek bir molekülün yeri belirlendiğinde güç dağılım fonksiyonu başına tek bir moleküle, diğer bir ifade ile moleküler düzeyde süper çözünürlüğe ulaşmak mümkün olur. PALM yönteminde merkezî aydınlanma bölgesine müdahale etmek yerine bu bölgedeki ışın sayısını tek moleküle kısıtlama yaklaşımı ön plana çıkmıştır. Tekrar ifade etmek gerekirse PALM diğer yöntemin aksine bir süper yerleştirme yöntemidir.

Sonuçta biri merkezî aydınlanmayı baskılayıp küçültme diğeri ise tek moleküle ait ışınmayı süper yerleştirme şeklinde özetlenebilecek farklı iki bilimsel yaklaşımla fluorensan mikroskopi yöntemi devrimsel ölçüde geliştirilerek, Abbe'nin çözünürlük sınırının ötesine taşınmıştır.



Bilimsel yaklaşımları farklı olmasına rağmen aynı hedefe yönelen bu biri Avrupalı diğeri ABD'li iki grup önderinin hikâyeleri ise âdeta birbirinin kopyasıdır. İkisi de çok zorlu eğitim süreçlerinden geçmiş ve hayatlarını tek bir amacın etrafında düzenlemiştir. Amaçlarına ulaşmak için çok kez göç etmek zorunda kalmışlardır. Yenilikçi yaklaşımları nedeniyle projeleri ve makaleleri sıkça reddedilmiştir. İşin belki de en ilginç kısmı ileri yaşlarında her ikisi de sistemlerini geliştirmek için gerekli parayı kendi birikimlerinden sağlamış olmalıdır ki bu gerçekten saygıyı hak etmektedir.

STED ve PALM sistemleri geliştirilmeye devam ediliyor. Bu yöntemler ilk başlarda sadece bazı önemli merkezlerde mevcutken, günümüzde her iki yöntemin geliştirilmiş modelleri tak çalıştır şeklinde hiçbir özel ek parça gerekmeksizin çalışacak şekilde ticari olarak temin edilebilir haldedir. Maalesef ülkemizde henüz bulunmayan bu görüntüleme yöntemleri özellikle biyoloji alanında çok önemli gelişmelere yol açmıştır. Önümüzdeki yıllarda süper çözünürlüklü mikroskopların yaygınlaşmasıyla bu etkinin daha da artması beklenmektedir. ■

Kaynaklar

- Moerner, W. E. ve Kador, L., "Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid", *Physical Review Letters*, Cilt 62, s. 2535-2538, 1998.
- Hell, S. W. ve Wichman, J., "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion-microscopy", *Optics Letters*, Cilt 19, s. 780-782, 1994.
- Hell, S. W. ve Kroug, M., "Ground-state depletion fluorescence microscopy, a concept for breaking the diffraction resolution limit", *Applied Physics*, 60, s. 495-497, 1995.
- Betzig, E., "Proposed method for molecular optical imaging", *Optics Letters*, Cilt 20, s. 237-239, 1995.
- Dickson, R. M., Cubitt, A. B., Tsieng, R. Y. ve Moerner, W. E., "On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein", *Nature*, Cilt 388, s. 355-358, 1997.
- Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. ve Hell, S. W., "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission", *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, Cilt 97, s. 8206-8210, 2000.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., Hess, H. F., "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution", *Science*, Cilt 313, s. 1642-1645, 2006.
- Puralı, N., *Hücre Elektrofizyolojisi ve Görüntülemenin Temelleri*, Veri Medikal Yayıncılık, 2008.