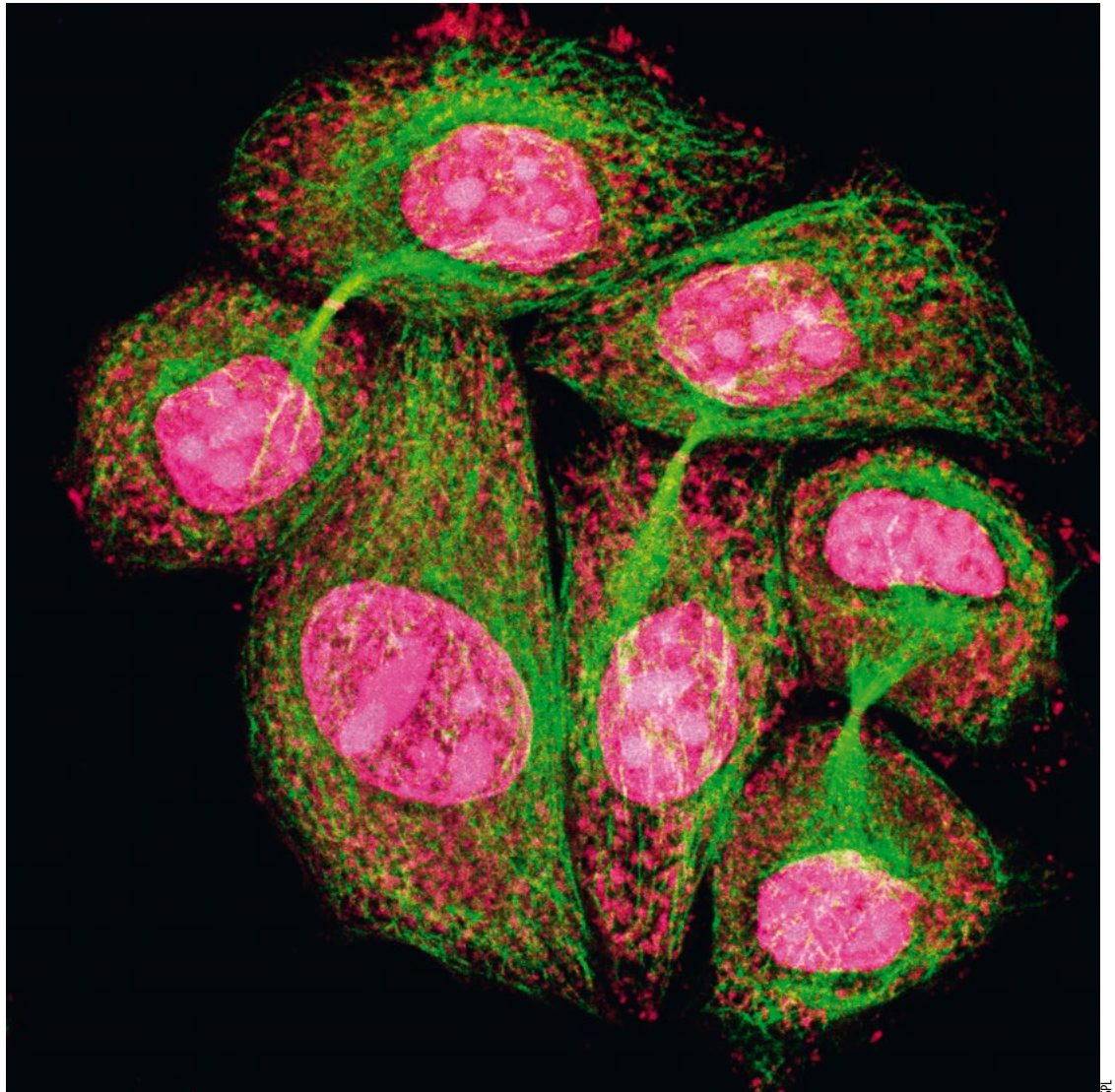


2014 Kimya Nobeli'nin Öyküsü:

# Işık Mikroskopu Nasıl Nanoskop Oldu?



Eric Betzig, Stefan W. Hell ve William E. Moerner, bir ışık mikroskopunun 0,2 mikrometreden daha yüksek bir çözünürlüğe sahip olamayacağı yönündeki bilimsel olarak kabul edilmiş kısıtlılığı aşmayı başardıkları için 2014 Nobel Kimya Ödülü'ne layık görüldü. Bugün bilim insanları moleküllerin flonşmasını kullanarak hücrenin içindeki moleküller arasındaki etkileşimleri inceleyebiliyor, hastalıklarla ilintili proteinlerin kümeleşmesini gözlemleyebiliyor ve hücre bölünmesini nano ölçekte takip edebiliyor.



#### Anahtar Kavram

Herhangi bir elektromanyetik radyasyonu, örneğin görünen ışığı soğuran bir maddenin bu soğurma sonucunda ışık yaymasına flonşma denir, bu özelliğe sahip maddeler de flonşil olarak nitelenir.



Eric Betzig

Stefan W. Hell

William E. Moerner

## Işık Yayan Moleküllerle Fiziksel Sınırları Aşmak

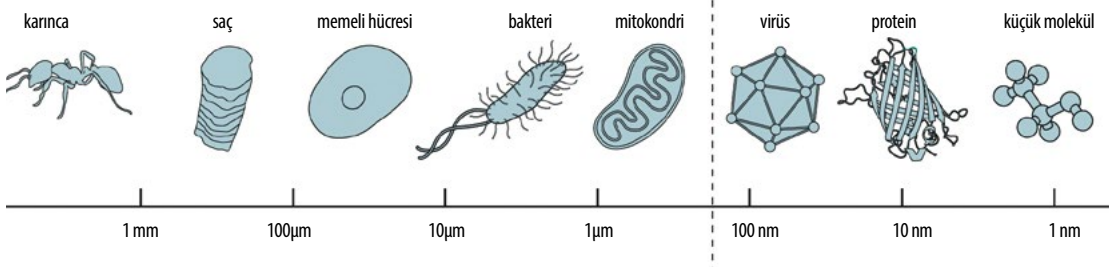
**K**ırmızı kan hücreleri, bakteriler, maya hücreleri ve spermatozoitler. On yedinci yüzyılda bilim insanları canlı organizmaları ışık mikroskopu altında ilk defa incelediğinde gözlerinin önünde yeni bir dünya açılmış oldu. Bu, mikrobiyolojinin doğuş anydı ve o zamandan beri ışık mikroskopu yaşam bilimlerindeki en önemli araçlardan biri olageldi. Diğer mikroskopi yöntemleri, örneğin elektron mikroskopisi hücrenin ölümüyle sonuçlanan örnek hazırlama işlemleri gerektiriyor. Bu yüzden de ışık mikroskopisi dışındaki yöntemlerin, canlı haldeki hücrenin içinde neler olup bittiğine ilişkin sağladığı bilgi çok sınırlı.

Öte yandan ışık mikroskopisi, incelenen yapıların ayırt edilebileceği en düşük ölçeğe ilişkin fiziksel kısıtlılık yüzünden, uzun bir süre yerinde saydı. 1873 yılında Ernst Abbe mikroskopun çözünürlüğünün, diğer etmenlerin yanı sıra ışığın dalga boyuyla da sınırlandığını gösteren bir denklem ortaya koydu. Bu yüzden bilim insanları 20. yüzyılın büyük bölümünde, ışığın dalga boyunun yarısından yani 0,2 mikrometreden daha küçük şeylerin mikroskopla görülemeyeceğini düşünüyordu (Şekil 1). Hücrenin organellerinden bazılarının, örneğin hücrenin enerji merkezi olan mitokondrinin dış hatları görülebiliyordu. Ancak daha küçük nesnelere görülmesi, örneğin hücrenin içindeki moleküller arasındaki etkileşimin izlenmesi mümkün değildi. Bu bir bakıma bir şehirdeki binaları görebilirken şehrin sakinlerinin nasıl yaşadığını ve nasıl hareket ettiğini göremeye benziyor. Bir hücrenin nasıl işlediğini tam olarak anlayabilmek için her molekülün işlevini izleyebilmek gerekiyor.

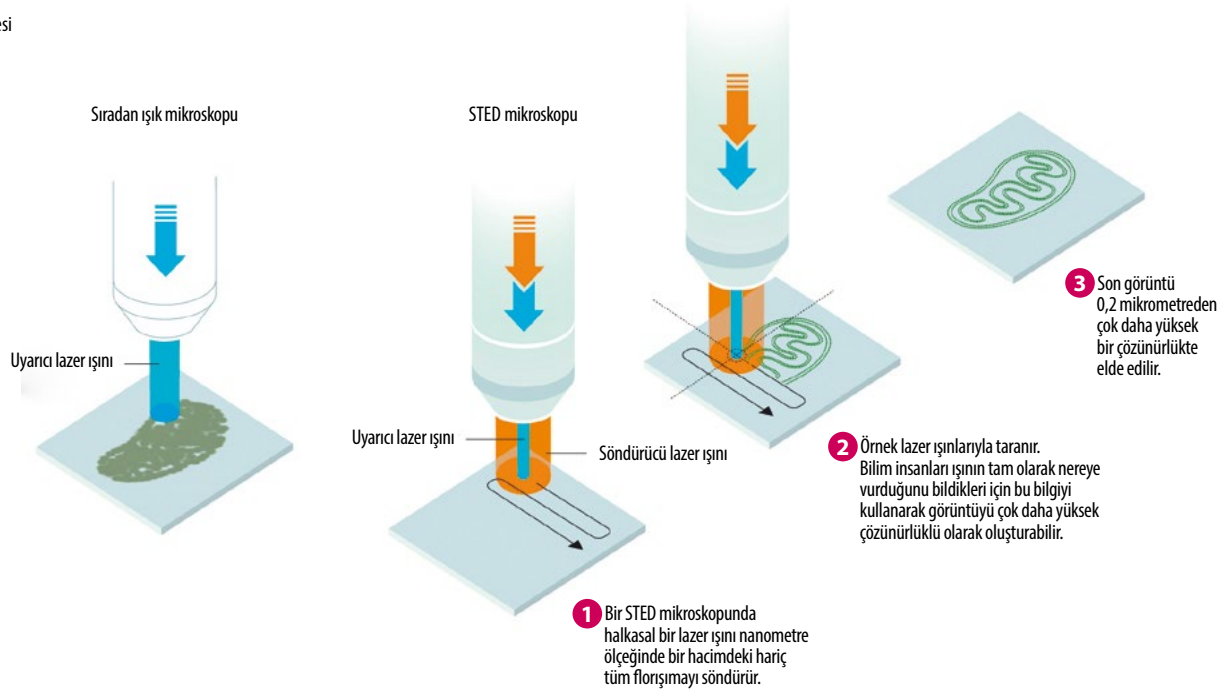
### Şekil 1

Ön dokuzuncu yüzyılın sonunda Ernst Abbe ışık mikroskopları için çözünürlük sınırını ışığın dalga boyunun yarısı yani 0,2 mikrometre olarak tanımladı. Bu, bilim insanlarının hücreleri ve organel denen hücre bölümlerinden bazılarını görebileceği anlamına geliyordu. Ancak normal büyüklükte bir virüs ya da tek bir protein molekülü kadar küçük şeylerin görülmesi imkânsızdı. (altta)

### ABBE'NİN KIRINIM SINIRI (0,2 µm)



**Şekil 2**  
STED Mikroskopisinin Çalışma İlkesi



Sıradan bir ışık mikroskopunda mitokondrinin dış hatları ayırt edilebilir ancak çözünürlük asla 0,2 mikrometreden daha iyi olamaz.

Abbe'nin denklemi geçerliliğini hâlâ koruyor, ancak denklemin temsil ettiği kısıtlılık bir şekilde aşıldı. Eric Betzig, Stefan W. Hell ve William E. Moerner florışıl molekülleri kullanarak ışık mikroskopisini yeni bir boyuta taşımalarından dolayı 2014 Nobel Kimya Ödülü'nü kazandı. Artık kuramsal olarak, incelenebilecek en küçük yapıyla ilgili bir sınır yok. Dolayısıyla mikroskopi, "nanoskopi"ye dönüşmüş durumda.

Abbe'nin kırınım sınırının aşılmasına ilişkin öykü birbirine paralel iki yol izledi; sonuç olarak birbirinden bağımsız olarak ortaya konan farklı iki ilke ödüllendirilmiş oldu. Önce 1993'te *Quantum Optics* (Kuantum Optiği) adlı ders kitabının sayfalarında gezinirken aklına muhteşem bir fikir gelen Stefan Hell'in öyküsüne bakalım.

### Genç Araştırmacının Abbe'nin Kırınım Sınırına "İsyanı" Kuşkuyla Karşılıyor

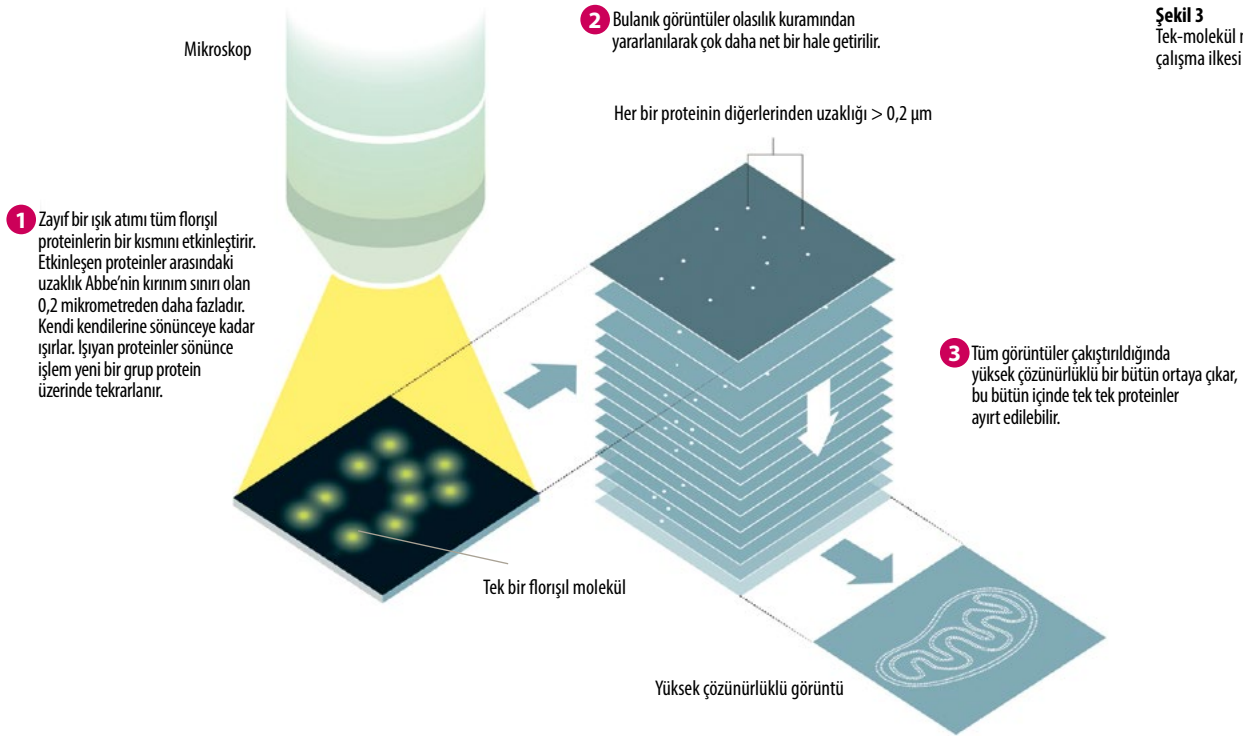
Stefan Hell 1990'da Heidelberg Üniversitesi'nden doktorasını aldığından beri Ernst Abbe'nin yüz yıldan uzun bir süre önce tanımladığı kısıtlılığı aşmanın bir yolunu bulmaya çalışıyordu. Bu kadar yerleşmiş bir ilkeye meydan okuma düşüncesi çok cezbediciydi. Ancak Almanyadaki kıdemli bilim insanları onun bu hevesini şüpheyle karşıladı, sonuçta Stefan Hell kendine soğuk Kuzey'de bir yer edinmek zorunda kaldı. Finlandiya'daki Turku Üniversitesi'nden florışım mikroskopisi ile uğraşan bir profesör Helle

araştırma grubunda iş teklif etti. Hell, Abbe'nin kırınım sınırının aşılabileceğine ikna olmuş durumdaydı ve *Quantum Optics* kitabında "uyarılmış salım" sözcüklerini okuduğunda kafasında yepyeni bir fikir uyandı: "O anda kafama dank etti. Nihayet üzerine eğilebileceğim somut bir kavram bulmuştum." diyordu 2009 yılında. Şimdi onun bu fikrini derinlemesine ele alalım.

### Çözüm: Örnek Üzerinde Gezdirecek Nano-Ölçekli Bir Işık Çakımı

Stefan Hell Turku'da florışıl moleküller kullanılarak hücrenin alt birimlerinin görüntülenmesini sağlayan florışım mikroskopisi alanında çalıştı. Bu yöntemde, örneğin özel olarak hücre DNA'ya bağlanan ve florışım özelliği taşıyan antikorlar kullanılabilir. Araştırmacılar antikorları basit bir ışık atımıyla uyatarak kısa bir süreliğine parlamalarını sağlıyor. Eğer antikorlar DNA'ya bağlanırsa, DNA'nın hücre çekirdeği içinde paketlenmiş halde bulunduğu merkez kısımdan ışıyor. Araştırmacılar bu şekilde belirli bir molekülün nerede konumlandığını görebiliyor. Ancak Hell bu alanda çalışmaya başladığı dönemde bu yöntemle sadece molekül öbeklerinin, örneğin dolanık haldeki DNA zincirlerinin yeri belirleliyordu. Çözünürlük ayrı ayrı DNA zincirlerinin ayırt edilebilmesi için yetersizdi. Bu durum yumağı görebilirken ipliğin kendisini takip edemiyor olmaya benzetilebilir.





**Şekil 3**  
Tek-molekül mikroskopisinin çalışma ilkesi

Stefan Hell uyarılmış salım konusunu okuduğunda, bir örneğin her seferinde bir nanometrelik kısmını tarayacak bir çeşit nano-ışık çakımı oluşturmanın mümkün olabileceğini fark etti. Bilim insanları uyarılmış salımdan yararlanarak florışıl molekülleri söndürebiliyor. Molekül üzerine bir lazer ışını yönlüyorlar ve molekül anında enerjisini kaybedip karanlık hale geliyor. Stefan Hell 1994 yılında bu konudaki fikirlerini açıkladığı bir makale yayımladı. Öne sürdüğü tetiklenmiş salım azaltımı (STED) adlı yöntemde, bir ışık atımı tüm florışıl molekülleri uyarırken bir başka ışık atımı da odak altındaki bölgenin ortasında yer alan nanometre ölçeğindeki bir hacimdekiler hariç tüm moleküllerden gelen florışımaya söndürüyor (Şekil 2.). Böylece sadece o hacimdeki ışımaya kaydedilmiş oluyor. Örnek üzerinde tarama yapıp ışık düzeylerini sürekli kaydederek bütüncül bir görüntü elde etmek mümkün oluyor. Tek bir anda ışımaya izin verilen hacim ne kadar küçük olursa son görüntünün çözünürlüğü de o kadar yüksek oluyor. Dolayısıyla ilkesel olarak artık ışık mikroskopunun çözünürlüğü için bir sınır yok.

## Almanya'da İlk Nano-Işık Çakımı Geliştiriliyor

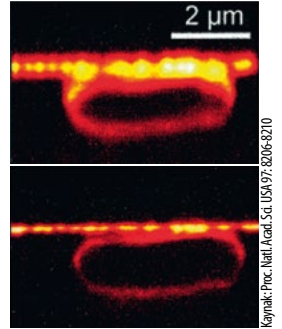
Stefan Hell'in makalesi kısa vadede hiçbir kırır-danma yaratmadıysa da Göttingen'deki Max Planck Biyofiziksel Kimya Enstitüsü'nden bir iş teklifi almaya yetecek kadar ilginç bulunmuştu. Takip eden

yıllarda Hell fikirlerini ürüne dönüştürdü; bir STED mikroskopu geliştirdi. 2000 yılında bir *E. coli* bakterisini o zamana kadar bir ışık mikroskopuyla elde edilemeyen bir çözünürlükte görüntüleyerek ve başka bazı deneyler yaparak, fikirlerinin uygulamada da işe yaradığını göstermeyi başardı (Şekil 4.).

STED mikroskopu büyük bir görüntü oluşturmak üzere çok sayıda küçük hacimden ışık topluyor. Buna karşılık, keşfi 2014'te Kimya Nobelini getiren diğer yöntem olan tek-molekül mikroskopisi birkaç görüntünün çakıştırılmasını gerektiriyor. Eric Betzig ile W. E. Moerner birbirlerinden bağımsız olarak bu ikinci yöntemin geliştirilmesine farklı katkılar sağladı. Yöntemin temeli W. E. Moerner'in tek bir küçük florışıl molekül saptamayı başarmasıyla atıldı.

## Tek Bir Florışıl Molekül Saptamayı Başaran İlk Kişi: W. E. Moerner

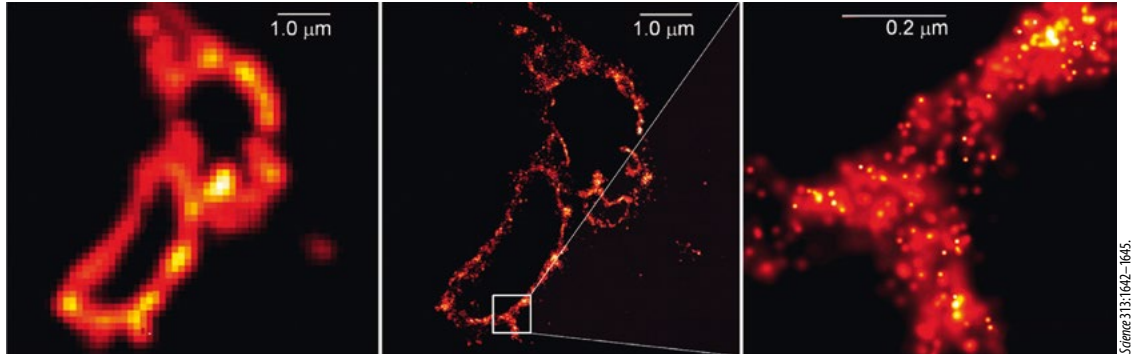
Çoğu kimyasal yöntemde, örneğin soğurma ve florışımaya ölçülürken, bilim insanları milyonlarca molekülü aynı anda inceler. Bu tür deneylerin sonuçları tipik, ortalama bir molekülü temsil eder. Başka bir şey mümkün olmadığı için bilim insanları bunu kabul etmek zorundaydı, ancak molekülleri tek tek inceleyebilmenin hayalini de uzun süre kurmuşlardı, çünkü moleküller hakkında ne kadar zengin ve ayrıntılı bilgi edinilebilirse, örneğin hastalıkların nasıl geliştiğini anlama olasılığı da o kadar fazla olacaktı.



**Şekil 4**  
Stefan Hell tarafından STED mikroskopuyla çekilmiş ilk görüntülerden biri. Solda *E. coli* bakterisinin sıradan mikroskopıyla elde edilmiş bir görüntüsü, sağdaysa aynı bakterinin STED kullanılarak elde edilmiş bir görüntüsü.

**Şekil 5**

Lizozom zarlarını gösteren ortadaki görüntü Betzig tarafından tek-molekül mikroskopisi kullanılarak çekilen ilk görüntülerden biri. Aynı görüntünün normal ışık mikroskopuyla kaydedilmiş hali, solda. Sağda ise zarların büyütülmüş görüntüsü. 0,2 µm'lik ölçek çizgisine dikkat edilirse çözünürlüğün kat kat daha iyi olduğu fark edilebilir.



Science 313:1642-1645.

Bu yüzden de W. E. Moerner'in 1989 yılında tek bir molekülün ışığı soğurmasını ölçmeyi başaran ilk bilim insanı olması çok önemli bir başarıydı. Moerner o sırada California San Jose'deki IBM araştırma merkezinde çalışıyordu. Yaptığı deney yeni bir geleceğin kapılarını araladı ve çok sayıda kimyacıya dikkatlerini tek moleküllere yöneltme konusunda esin kaynağı oldu. Bunlardan biri de aşağıda başarılarından bahsedilecek olan Eric Betzig'di.

Sekiz yıl kadar sonra Moerner, keşfi daha önce Nobel Ödülü kazandırmış olan yeşil florışıl proteinden yola çıkarak tek-molekül mikroskopisine doğru sonraki adımı attı.

## Molekül Ölçeğindeki Lambalar Açılıp Kapanıyor

1997 'de W. E. Moerner San Diego'daki California Üniversitesi'nde çalışmaya başlamıştı. Daha sonra Nobel Ödülü kazanacak olan Roger Tsien de o sıralar aynı üniversitede GFP'lerin gökkuşağının her bir renginde ışımaması sağlamaya çalışıyordu. Yeşil protein florışılan bir denizanasından elde edilmişti. Yeşil proteinin potansiyeli canlı hücre içindeki başka proteinlerin görünmesini sağlamasında yatıyor. Bilim insanları gen teknolojisini kullanarak yeşil florışıl proteini başka proteinlere bağlıyor. Sonuçta yeşil ışık, bu şekilde işaretlenmiş olan proteinin hücrenin tam olarak neresinde konumlandığını ortaya çıkarıyor.

W. E. Moerner GFP'nin belirli bir çeşidinin ışımamasının istenildiğinde başlatılıp durdurulabildiğini keşfetti. Proteini 488 nanometre dalga boyundaki ışıkla uyardığında protein ışımaya başlıyor ancak ışımaya bir süre sonra sönüyordu. O andan sonra proteine yönelttiği ışığın miktarından bağımsız olarak florışma ölmüş oluyordu. Ancak 405 nanometre dalga boyundaki ışığın proteini tekrar canlandırabildiği anlaşıldı. Protein yeniden etkinleştirdiğindeyse 488 nanometre dalga boyundaki ışıkta tekrar ışıyabiliyordu.

Moerner uyarılabilen bu proteinleri bir jelin içinde, her bir protein arasındaki uzaklık Abbe'nin kırınım sınırı olan 0,2 mikrometreden fazla olacak biçimde dağıttı. Proteinler seyrek olarak dağılmış olduğundan sıradan bir ışık mikroskopi ayrı ayrı moleküllerden gelen ışığı ayırt edebiliyordu; proteinler açma kapama anahtarları olan minik lambalar gibiydi. Deneyin sonuçları 1997'de *Nature*'da yayımlandı.

Moerner bu keşifle tek tek moleküllerin florışmasının ışık yoluyla kontrol edilebileceğini göstermiş oldu. Bu da Eric Betzig'in iki yıl kadar önce kuramsal olarak ortaya koyduğu bir problemin çözümüydü.

## Bir Yanda Akademiden Bıkmışken Diğer Yanda Abbe'nin Kırınım Sınırına Kafayı Takıyor

Tıpkı Stefan Hell gibi Eric Betzig de Abbe'nin kırınım sınırını aşma fikrine kafayı takmıştı. 1990'ların başında New Jersey'deki Bell Laboratuvarları'nda yakın-alan mikroskopisi denen bir ışık mikroskopisi çeşidi üzerinde çalışıyordu. Yakın-alan mikroskopisinde ışık ışını, örnekte sadece birkaç nanometre uzağa yerleştirilmiş aşırı derecede ince bir uçtan çıkıyordu. Abbe'nin kırınım sınırı bu yöntemle de aşılabiliyor, ancak yöntemin bazı ciddi zayıflıkları var. Örneğin yayılan ışığın menzili o kadar kısa ki hücre yüzeyinin altındaki yapıların görüntülenmesi zor.

1995 yılında Eric Betzig yakın-alan mikroskopisinin daha fazla geliştirilemeyeceği sonucuna vardı. Dahası artık akademide kendini rahat hissetmiyordu ve araştırma kariyerini bitirmeye karar vermişti. Sonraki adımının ne olacağına karar vermeden Bell Laboratuvarları'ndan ayrıldı. Ancak Abbe'nin kırınım sınırı aklında yer etmişti. Soğuk bir kış günü yürüyüş yaparken aklına yeni bir fikir geldi; acaba Abbe'nin kırınım sınırını farklı özelliklere sahip moleküller, farklı renklerde florışılan moleküller kullanarak aşmak mümkün olabilir miydi?

Eric Betzig daha önce W. E. Moerner'den esinle yakın-alan mikroskopisini kullanarak tek tek moleküllerden gelen florışmaları kaydetmeyi başarmıştı. Moleküller farklı renklerde örneğin kırmızı, sarı ve yeşil ışık yayarsa sıradan bir mikroskopun da aynı yüksek çözünürlüğü sağlayıp sağlayamayacağına kafa yormaya başladı. Aklındaki fikir mikroskopun her bir renk için bir görüntü kaydetmesiydi. Eğer belirli bir renkteki tüm moleküller dağılır ve birbirlerine hiçbir şekilde Abbe'nin kırınım sınırının öngördüğü 0,2 mikrometreden yakın olmazsa, konumları hassas biçimde belirlenebilirdi. Sonra da bu görüntüler çakıştırıldığında görüntünün tamamı Abbe'nin kırınım sınırının izin verdiği kadar çok daha yüksek bir çözünürlüğe sahip olurdu. Kırmızı, sarı ve yeşil moleküller de aralarındaki uzaklık yalnızca birkaç nanometre olsa bile ayırt edilebilirdi. Böylece Abbe'nin kırınım sınırı aşılmış olurdu. Ancak uygulamada bazı sorunlar vardı, örneğin ayırt edilmeyi sağlayacak yeterli optik özelliklere sahip moleküller yoktu.

1995'te Eric Betzig fikirlerini *Optics Letters* adlı dergide yayımladı ve sonunda akademiden ayrılarak babasının şirketinde çalışmaya başladı.

## Yeşil Florışıl Protein Betzig'i Yeniden Mikroskopiye Çekiyor

Eric Betzig araştırma camiasından uzun yıllar uzak kaldı. Ancak günün birinde içindeki bilim hasreti depreşip bilimsel literatürü incelemeye başladığında ilk defa yeşil florışıl proteinle karşılaştı. Hücre içindeki diğer proteinlerin görünmesini sağlayacak bir proteinin var olduğunu fark etmesi Betzig'in Abbe'nin kırınım sınırını aşmaya ilişkin düşüncelerini yeniden canlandırdı.

Asıl atılımsa 2005 yılında, W. E. Moerner'in 1997'de tek molekül düzeyinde görüntülediklerine benzer, istendiğinde etkinleştirilebilecek florışıl proteinlere rastlandığında gerçekleşti. Betzig böyle bir proteinin, on yıl önce aklına gelmiş olan fikri uygulamaya geçirmesi için gereken araç olduğunu fark etti. Florışıl proteinlerin farklı renklerde olması da gerekmiyordu, sadece farklı zamanlarda ışıyabilirlerdi.

## Görüntüleri Çakıştırarak Abbe'nin Sınırını Aşmak

Sadece bir yıl sonra Eric Betzig, uyarılabilen florışıl proteinlerle çalışan bilim insanlarıyla işbirliği yaparak fikrinin uygulamada işe yaradığını göstermeyi başardı.

Yaptıkları şeylerden biri ışıyan proteini, hücrenin geri dönüşüm istasyonu olan lizozomu saran zara bağlamaktı. Bir ışık atımıyla uyarılan proteinler florışıyorlardı, ancak atım o kadar zayıftı ki proteinlerin sadece bir kısmı parlamaya başlıyordu. Sayıları az olduğu için de neredeyse her biri birbirinden Abbe'nin kırınım sınırı olan 0,2 mikrometreden daha uzaktaydı. Böylece parlayan her bir proteinin konumu mikroskopta hassas biçimde kaydedilebiliyordu. Bir süre sonra florışımalar söndüğünde de araştırmacılar bir başka grup proteini etkinleştiriyordu. Yine atım çok zayıf olduğu için proteinlerin sadece bir kısmı parlamaya başlıyordu, sonuçta da başka bir görüntü kaydediliyordu. Sonra bu işlem defalarca tekrarlanıyordu.

Betzig elde edilen görüntüleri çakıştırdığındaysa lizozom zarının yüksek çözünürlüklü görüntüsünü elde etmiş oldu. Görüntünün çözünürlüğü Abbe'nin kırınım sınırının çok üzerindedi. Sonunda bu çığır açıcı çalışma 2006 yılında *Science*'ta yayımlanan bir makaleyle bilim dünyasına duyuruldu.

## Nobelli Araştırmacılar Hâlâ Hücre İçi Gizemlerin Peşinde

Eric Betzig, Stefan Hell ve W. E. Moerner'in geliştirdiği yöntemler çeşitli nanoskopi tekniklerinin geliştirilmesi için temel oluşturdu ve tüm dünyada kullanılıyor. Üçü de nanoskopi alanındaki yeniliklere öncülük eden geniş ve büyüyen topluluk içinde hâlâ etkin olarak araştırma yapıyor. Güçlü nanoskoplardan yaşamın en küçük bileşenlerine doğrultuklarında aynı zamanda en ileri düzeyde bilgi de üretiyorlar. Stefan Hell beyindeki sinapsları (sinirler arası bağlantı noktaları) daha iyi anlayabilmek için canlı sinir hücrelerinin içine odaklandı. W. E. Moerner Huntington hastalığıyla ilgili proteinleri inceledi. Eric Betzig embriyoların içindeki hücre bölünmelerini izledi. Bunlar çok sayıda örnekten sadece birkaçı. Kesin olan şeyse 2014 Nobel Kimya Ödülü'nün sahibi üç araştırmacının insanlık için çok önemli bilgilerin edinilmesinin temellerini atmış olması.

### Kaynak

- "The Nobel Prize in Chemistry 2014 - Popular Information". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 13 Jan 2015 <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2014/popular.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/popular.html)>
- Bilimsel Editörler: Måns Ehrenberg ve Sven Lidin, Nobel Kimya Komitesi
- Yazar ve Editör: Ann Fernholm
- Çizimler: ©Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences
- ©The Royal Swedish Academy of Sciences