

# 2014 NOBEL KİMYA ÖDÜLÜ SAHİP- LERİNİN PROFİL- LERİ



**Eric Betzig**



**Stefan Hell**



**W.E. Moerner**

# 2014 Nobel Kimya Ödülü Sahipleri Eric Betzig, Stefan Hell ve W.E. Moerner'in Profili

Gaye Ezgi Yılmaz ve Dr. Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

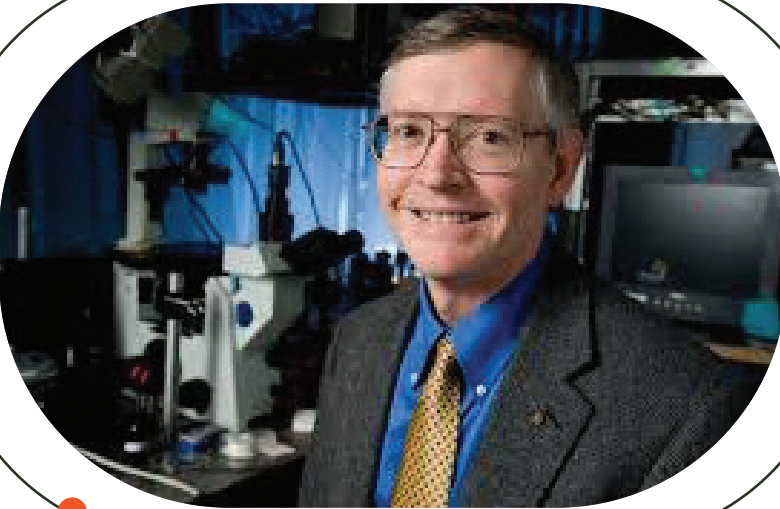
Bilim adamları bir zamanlar fizik yasalarının hücre yapılarına bakmalarını engelleyeceğine inanıyorlardı. 2014 Nobel Kimya Ödülü'nü kazananların hikayesi, hayal gücü kuvvetli üç bilim insanının, mikroskopiye nanoskopiye dönüştürerek bu sözde sınırları aşmanın yollarını nasıl öncülük ettiğini anlatıyor.

1873'te Alman fizikçi Ernst Abbe, fizik yasalarının, görünür ışığın birbirine yaklaşık 200 nm'den (görünür ışığın dalga boyunun yaklaşık yarısı) daha yakın olan ve kaçınılmaz olarak tek bir damla olarak görünen nesnelere arasında ayırım yapamayacağını zorunlu kıldığını teorileştirdi. Abbe'nin kırınım sınırı olarak bilinen bu seviyenin üzerindeki görsel çözünürlük, hücrelerin içindeki organelleri ortaya çıkaracak ancak ayrıntılı yapılarını göremeyecek düzeydeydi.

2014 kimya ödülü sahipleri Stefan Hell, Eric Betzig ve W.E. Moerner, bir takım araçları kavramsallaştırıp geliştirerek bu kısıtlamalara hep birlikte karşı çıktılar. Çalışmaları, ilk kez görünür ışık kullanılarak hücrelerin içindeki nanometrik düzeydeki yapıların görselleştirilmesine olanak tanıyan süper çözünürlüklü görüntüleme alanının bulunmasına yardımcı oldu.



**Şekil 1.** 2014 Kimya ödülü sahipleri ve onların önemli isimleri, Nobel Ziyafeti'nin ardından İsveç kraliyet ailesiyle birlikte sahneye çıkıyor. Soldan sağa: Sharon Stein Moerner, William E. Moerner, Na Ji, Eric Betzig, İsveç Kralı Carl XVI Gustaf, Kraliçe Silvia, Stefan W. Hell ve Anna Kathrin Hell. Telif Hakkı © Nobel Media AB 2014. Fotoğraf: Niklas Elmehed.



Stefan Hell, 1980'lerin sonlarında Heidelberg Üniversitesi'nde yüksek lisans öğrencisi olarak Abbe'nin sınırlarını aşmanın yollarını aramaya başladı. Çözünürlüğü artırmaya yönelik ilk fikri, her ikisi de aynı geometrik konuma odaklanmış, girişim yapan ışık yollarına sahip iki karşıt mercek kullanmaktı. Almanya'nın Heidelberg kentindeki Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda Ernst Stelzer'in grubuna katıldığında, bu yaklaşımı kullanarak çözünürlüğü yalnızca z eksenini boyunca üç ila yedi kat artıran 4Pi mikroskobunu geliştirdi (1). Süper çözünürlüğe ulaşmanın başka bir yolunu bulmaya kararlı olan Hell, Finlandiya'daki Turku Üniversitesi'ndeki bir floresans mikroskobu laboratuvarına taşındı. Hell ihtiyaç duyduğu ipucunu orada buldu. Bir kuantum optik kitabında uyarılmış emisyon hakkında okuduğunda, bunun

nanometre boyutunda bir hacim dışındaki tüm floresansı söndürmek için kullanılabileceğini fark etti. Hell, bir lazer kümesinin bir boya moleküllü kümesini floresans ışık saçması ve ikinci bir lazerin kullanılması durumunda küçültmenin gerçekleşebileceğini düşündü. Bu floroforların bazılarını kapatmak için farklı dalga boyundaki ışın kullanıldı. Bir floresan örneğini bu şekilde tarayarak, kırınım sınırlı bulanık floresan damlalarına ince ayrıntılar getiren süper çözünürlüklü bir görüntü elde etmek mümkün olacaktır. 1994 yılında Hell, uyarılmış emisyon tükenmesi (STED) adını verdiği bu yeni görüntüleme yöntemine ilişkin teorisini yayınladı (2).

Hell'in karşılaştığı bir sonraki zorluk STED'in işe yaradığını göstermekti. Neyse ki, Almanya'nın Göttingen kentindeki Max Planck Biyolojik Kimya Enstitüsü, birçok bilim insanının kırınım sınırını aşma olasılığı konusundaki şüphelerine rağmen onun denemesine izin vermeye istekliydi. Fizikçilerden oluşan bir ekip kuran Hell, bir STED mikroskobu oluşturmak için yorulmadan çalıştı.



1999'da *Escherichia coli* bakterisini daha önce optik mikroskopta elde edilemeyen bir çözünürlükte görüntüleyerek başarısını yazdı. Hem Nature hem de Science, tekniğin yeni bir biyoloji ortaya çıkarmadığını ve dolayısıyla sınırlı ilgiye sahip olacağını öne sürerek bunu hemen reddetti. Ancak PNAS, STED'in potansiyelini fark etti ve verileri 2000 yılında yayınladı (3). Sonraki 14 yıl boyunca Hell ve meslektaşları, nanometre ölçeğinde numunelerin görüntülerini elde etmek için artık dünya çapında kullanılan STED'i (4) geliştirmeye devam etti.

Buna paralel olarak Atlantik'in diğer tarafında Cornell Üniversitesi'ndeki genç bir yüksek lisans öğrencisi de Abbe'nin kırınım sınırını aşma fikrine takıntılıydı. Eric Betzig, alt kırınım sınırı çözünürlüğünü elde etmek için farklı, daha sezgisel bir yaklaşım kullandı. Dalga boyunun altındaki bir açıklıktan ışık tuttu (hem eksenel hem de yanal olarak 20 nm ile sınırlı, kaybolan bir dalga üreterek) ve onu bir yüzey boyunca taradı ve benzeri görülmemiş bir ayrıntı tespit etti. Yakın alan taramalı optik

mikroskopi (NSOM) adı verilen teknik (5), Abbe'nin sınırını tüm boyutlarda büyük ölçüde aştı ve bu nedenle başlangıçta yaygın bir ilgi uyandırdı. Bununla birlikte, açıklık ve numune arasındaki mesafe arttıkça çözünürlüğü azaldığı için NSOM, yüzeylerin incelenmesiyle sınırlıydı ve bu da biyolojik uygulanabilirliğini sınırlı hale getiriyordu. Bu nedenle Betzig, Abbe'nin kırınım sınırını aşmak için daha fazla araç aramaya karar verdi. Yanıt, tek molekül görselleştirmesinin beklenmedik kaynağından geldi.

Bu yaklaşımın temeli, yoğun bir ortamda tek bir florofordan ışık Emilimini ölçen ilk kişi olan W. E. Moerner tarafından atılmıştır (6). Moerner, San Jose, Kaliforniya'daki IBM araştırma merkezinde optik depolama aygıtları üzerinde çalışıyordu ve floroforlar kullanılarak farklı lazer dalga boylarında dijital bilgilerin kaydedilmesine ilişkin temel sınırları inceliyordu. Moerner, florofor toplulukları yerine tek bir florofordan gelen bilgiyi temsil eden spektral özellikleri aramaya karar verdi. 1989'da tek bir floroforu gözlemlemeyi başarması çok önemli bir andı. Bu sadece molekül eyleminin stokastik modlarının çalışabileceği fikrini güçlendirmekle kalmadı, aynı zamanda spektroskopi ve mikroskopide bir dizi tek moleküllü tekniğin önünü açtı. Moerner'in başarısından ilham alan Betzig, tek bir molekülden gelen floresansı tespit etmek için NSOM'u kullanmayı başardı (7). Bu, Betzig'in Abbe'nin kırınım sınırını aşma yaklaşımının temelini sağladı. Tek tek moleküllerin, molekülün yayılan fotonlarının Gaussian uyumu yoluyla kesin konularının belirlenmesine olanak tanıyan izole edilebilir optik özelliklere sahip olması durumunda, yoğun bir molekül topluluğunun süper çözünürlükte görüntülenebileceğini düşündü. Tek tek moleküllerin konuları daha sonra üst üste getirilerek tüm topluluğun tek bir süper çözünürlüklü görüntüsü elde edilebildi. 1995 yılında Betzig bu basit ve zarif fikri Optics Letters'da (8) yayınladı, ancak uygulamada pratik sorunlar olduğunu fark etti çünkü emisyonları yeterince kontrol edilebilecek moleküllere hala ihtiyaç

vardı. Tek molekül görüntüleme alanı olgunlaştıkça bu soruna bir çözüm ortaya çıktı. W. E. Moerner, biyolojik sistemleri tek molekül düzeyinde incelemek için San Diego'daki Kaliforniya Üniversitesi'ne taşındı. Orada, GFP teknolojisini geliştirdiği için 2008'de Nobel Kimya Ödülü'nü kazanan Roger Tsien'den GFP varyantlarını elde etti. Böyle bir değişkeni kullanan Moerner tuhaf bir şey gözlemledi. Diğer GFP'ler gibi, 488 nm'lik ışıktan sonra bu varyant floresans verdi ve

sonra söndü. Ancak tekrar floresans yayamayan birçok GFP'den farklı olarak bu varyant 405 nm ışık kullanılarak hayata döndürülebilirdi. Protein yeniden aktive edildiğinde bir kez daha 488 nm'de floresans verdi (9). Bu nedenle varyant optik olarak kontrol edilebilirdi. Birkaç yıl içinde araştırmacılar, çeşitli optik kontrol yeteneklerine sahip bir floresan protein paleti geliştirmeye başladı (10, 11).



Betzig, bilimsel literatürü incelerken optik olarak kontrol edilebilen floresan proteinler hakkında bir şeyler okudu. Abbe'nin limitini tek moleküller kullanarak aşmaya yönelik 10 yıllık fikrini hayata geçirmek için ihtiyaç duyduğu aracın bu olduğunu fark etti. Fikrinin laboratuvarındaki pratikte geçerli olup olmayacağını test etmek için bu proteinler konusunda uzmanlaşmış gruplardan biriyle (kendi grubum) teması geçti.

Her ne kadar, farklı protein topluluklarının devreye girmesine izin veren fotoaktif edilebilir bir GFP geliştirmiş olsa da (10), bunun STED ve NSOM gibi Abbe kırınım sınırını kırmak için kullanılabileceği akıllara gelmemişti. Betzig konseptini açıkladıktan sonra heyecanla projesine katılım gerçekleşmiştir. Birkaç ay içinde, Mike Davidson'un önemli problemlere katkıda bulunması ve Harald Hess'in yeni aparatın yapımına yardım etmesiyle, fotoaktif edilebilir lokalizasyon mikroskobu (PALM)

ortaya çıkmıştır (12). PALM'de, yoğun bir numunede ışıkla aktive edilebilen moleküllerin çok küçük bir alt kümesini aktive etmek için zayıf bir UV ışığı darbesi kullanılır. Açılan bu moleküllerin çoğu, birbirlerinden Abbe'nin 0.2  $\mu\text{m}$ 'lik kırınım sınırından daha büyük bir mesafeye konumlandırılacak ve konumlarının tam olarak kaydedilmesine olanak tanıyacaktı. Floresansları sona erdiğinde, yeni bir protein alt grubu etkinleştirilebilir ve konumları kaydedilebilir. Bu binlerce kez tekrarlandıktan sonra proteinlerin konumları üst üste bindirilerek kırınım sınırından kat kat daha yüksek çözünürlüğe sahip bir görüntü oluşturulabilir. Belki de yeni keşif araçları (bu durumda foto-dönüştürülebilir sondalar) mevcut olduğunda bilimin önemli ilerlemeler kaydetme eğiliminin bir göstergesi, diğer iki araştırma grubu bağımsız olarak bunu gösterdi. PALM'ye neredeyse aynı zamanda benzer bir yaklaşım, bunların varyasyonlarını stokastik optik yeniden yapılandırma mikroskobu (STORM) (13) ve floresans fotoaktivasyon lokalizasyon mikroskobu (FPALM) (14) olarak adlandırmaktadır. Tek molekül bazlı süper çözünürlüklü görüntülemenin diğer benzer kullanımları ortaya çıkmaya devam etmiştir (15), bu nedenle artık yalnızca hücre yapısının uzay dinamiklerini subdifraktif olarak görselleştirmek değil, aynı zamanda yoğun popülasyonlar içindeki bireysel molekülleri izlemek ve reseptör stokiometrisini tanımlamak da mümkündür. Son yirmi yılda ortaya çıkan tüm bu süper çözünürlük fikirleri artık biyolojik araştırma dünyasında hayati bir rol oynuyor. Hell, Betzig ve Moerner, bu önemli yeni araştırma aracına yaptıkları temel katkılardan dolayı tanınmayı hak ediyorlar. Azimleri ve yaratıcılıkları sayesinde, artık Abbe'nin kırınım sınırlı görüntülerinden bulanık lekelerin yorumlandığı günlere son veren ticari anahtar teslimi süper çözünürlüklü mikroskoplar mevcut. Şimdiki zorluk, nanometre ölçeklerinde ortaya çıktığını gördüğümüz hücresel süreçleri anlamak ve yorumlamaktır.



## KAYNAKLAR

1. Hell SW, Stelzer EH, Lindek S, Cremer C (1994) Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy. *Opt Lett* 19(3):222.
2. Hell SW, Wichmann J (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19(11):780–782.
3. Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egnér A, Hell SW (2000) Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(15):8206–8210.
4. Hell SW (2003) Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* 21(11):1347–1355.
5. Betzig E, Trautman JK (1992) Near-field optics: Microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit. *Science* 257(5067):189–195.
6. Moerner WE, Kador L (1989) Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys Rev Lett* 62(21): 2535–2538.
7. Betzig E, Chichester RJ (1993) Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* 262(5138): 1422–1425.
8. Betzig E (1995) Proposed method for molecular optical imaging. *Opt Lett* 20(3):237–239.
9. Dickson RM, Cubitt AB, Tsien RY, Moerner WE (1997) On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* 388(6640):355–358.
10. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J (2002) A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297(5588):1873–1877.
11. Shcherbakova DM, Sengupta P, Lippincott-Schwartz J, Verkhusha VV (2014) Photocontrollable fluorescent proteins for superresolution imaging. *Annu Rev Biophys* 43:303–329.
12. Betzig E, et al. (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313(5793):1642–1645.
13. Rust MJ, Bates M, Zhuang X (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 3(10):793–795.
14. Hess ST, Girirajan TP, Mason MD (2006) Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J* 91(11):4258–4272.
15. Patterson G, Davidson M, Manley S, Lippincott-Schwartz J (2010) Superresolution imaging using single-molecule localization. *Annu Rev Phys Chem* 61:345–367.