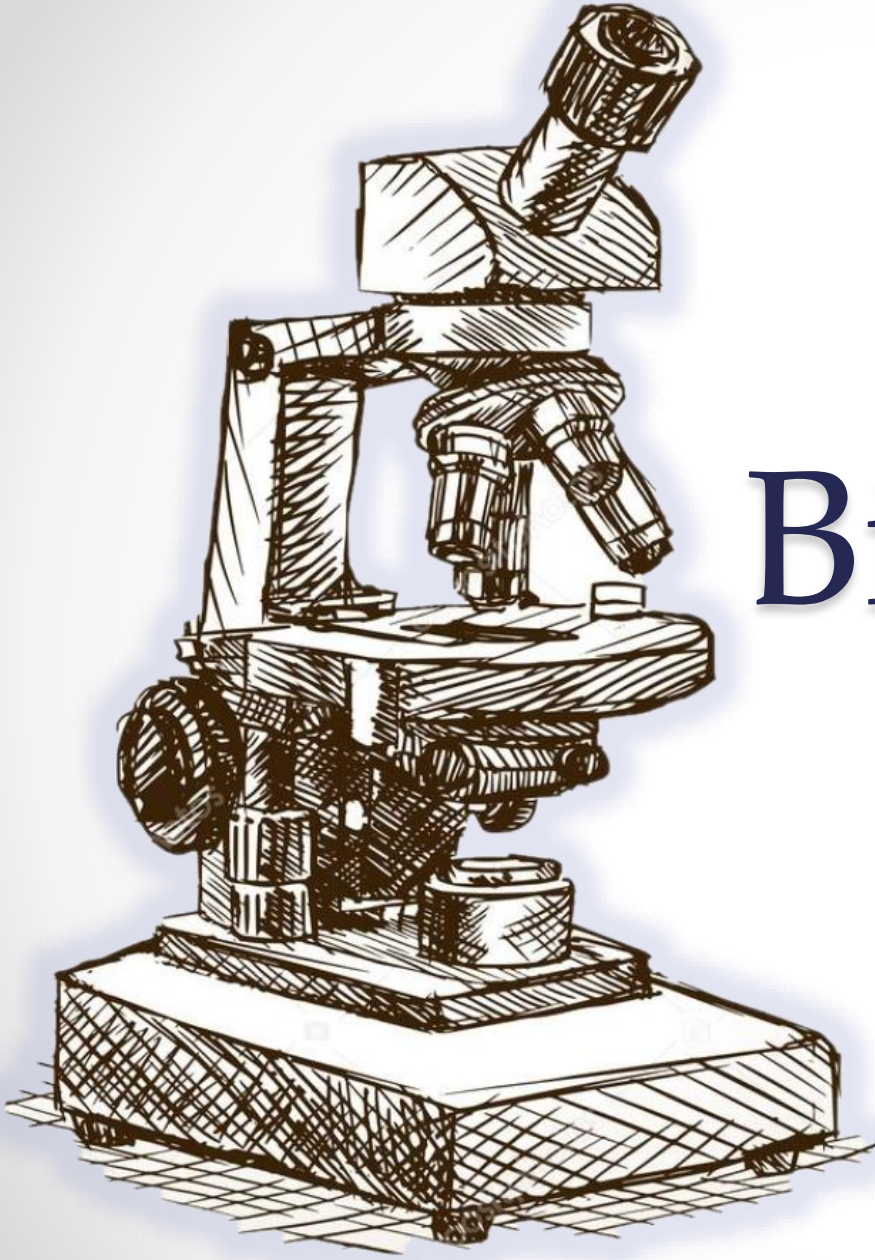




Hücre Biyolojisinin Araçları

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

- Tüm deneysel bilimlerde olduğu gibi, hücre biyolojisi araştırmaları, hücre yapısını ve işlevini incelemek için kullanılabilecek laboratuvar yöntemlerine bağımlıdır.
- Hücreleri anlamaya yönelik bir çok önemli gelişme, direkt olarak yeni araştırma kulvarı açan modern yöntemlerin gelişimini izlemiştir.
- Hücre biyologlarının ellerindeki deney araçlarının değerlendirilmesi, bu çok hızlı gelişen bilim alanının hem güncel konumunun hem de gelecek hedeflerinin anlaşılması açısından önemlidir.

Işık Mikroskopisi

- Hücrelerin çoğu çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük olduklarından, hücre çalışmaları ağırlıklı olarak mikroskop kullanımı gerektirir.



Hücrelerin keşfi mikroskobun geliştirilmesinden doğmuştur:

- ❖ Robert Hook 1665'de basit bir ışık mikroskobu ile, bir şişe mantarı parçasını gözlemleyerek "hücre" sözcüğünü ilk kez kullanmıştır.
- ❖ Antony van Leeuwenhoek 1670'lerde, objeleri gerçek boyutlarının 300 katı kadar büyüten mikroskop kullanarak; sperm, kırmızı kan hücresi ve bakteriler gibi farklı türde çeşitli hücreleri gözleyebildi.

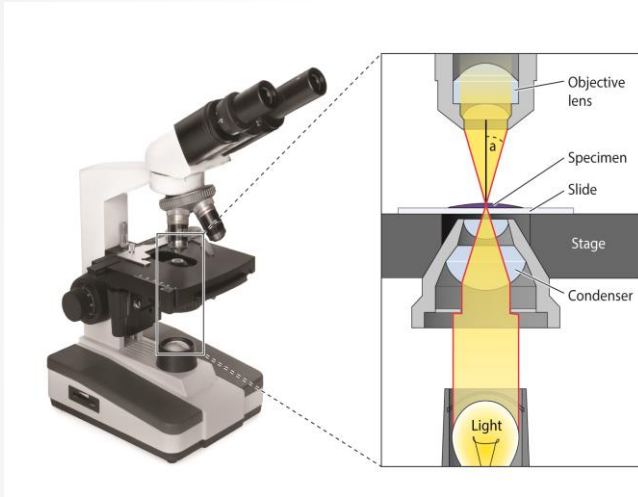
❖ **Hücre teorisinin 1838'de Matthias Schleiden ve Theodor Schwann tarafından ortaya atılması, çağdaş hücre biyolojisinin doğuşu olarak kabul edilebilir.**

Schleiden tarafından bitki dokularının ve Schwann tarafından hayvan dokularının mikroskobik gözlemleri aynı sonuca ulaşmıştır:

Tüm canlılar hücrelerden oluşur.

Bu gelişmelerin hemen ardından, hücrelerin de novo oluşmadıkları, ancak daha önceden var olan hücrelerin bölünmesiyle ortaya çıktıkları anlaşıldı.

- Hücre yapısının gittikçe daha ayrıntılı olarak görüntülenmesine olanak veren teknik gelişmelerle birlikte, ışık mikroskobu hala biyologların temel araçlarından biri olarak kalmıştır.
- Günümüz ışık mikroskopları objeleri yaklaşık bin kata kadar büyütme kapasitesine sahiptir. Çoğu 1 ile 100µm çapında olan hücreler ışık mikroskobu ile gözlenebildiği gibi, nükleus, kloroplastlar ve mitokondriler gibi büyükçe hücre içi organeller de izlenebilir.
- Bununla birlikte, ışık mikroskopları hücre yapısının çok ince ayrıntılarını göstermek için yeterince güçlü değildir.



Işığın kırılması, ışık mikroskobunun çözünürlüğünü yaklaşık 2µm ile sınırlandırmaktadır; birbirine bu mesafeden daha yakın olan iki cisim birbirinden ayırt edilemez, tek bir cisim gibi görünür. Işık mikroskopisinin bu kuramsal sınırlılığını, aşağıdaki eşitlikte görülen iki faktör belirler –görünen ışığın dalga boyu (λ) ve mikroskop merceğinin ışık toplama gücü (nümerik açıklık, NA) aşağıdaki denkleme göre:

$$\text{Rezolüsyon} = \frac{0.61\lambda}{NA}$$

Görünen ışığın dalga boyu 0.4 ile 0.7 µmdir, bu nedenle λ 'nın değeri, ışık mikroskobu için yaklaşık olarak 0.5 µm civarında sabittir. Nümerik açıklık, örnekten geçtikten sonra, mikroskop merceğine giren ışık konisinin büyüklüğü olarak düşünülebilir. Işığın, örnek ile mercek arasında yol aldığı ortamın kırma indeksi n olarak alındığında;

$$NA = n \cdot \sin \alpha \text{ eşitliğiyle belirtilir.}$$

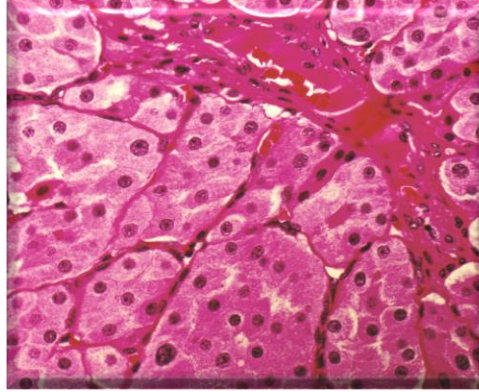
Hava için n değeri 1.0'dır, fakat, örneği bir damla yağ üzerinden incelemek için yağ-immersiyon lensi kullanılarak bu değer yaklaşık 1.4 ile maksimuma çıkarılabilir. Alfa açısı, lens tarafından toplanan ışık konisinin genişliğinin yarısına denktir. Maksimum α değeri 90°'dir. Bu durumda $\sin \alpha = 1$ ve nümerik açıklığın en yüksek olası değeri ise 1.4'dür.

Işık mikroskobunun kuramsal rezolüsyon sınırı, aşağıdaki şekilde hesaplanabilir:

$$\text{Rezolüsyon} = \frac{0.61 \times 0.5}{1.4} = 0.22 \mu\text{m}$$

Işık mikroskoplarında çözünürlüğün teorik sınırlarına ulaşılmıştır. Ancak, yeni yaklaşımlar yeni metodların gelişmesine yol açarak (süper çözünürlüklü mikroskopi) floresan mikroskopisinde, çözünürlük gücünde, bu limitin ötesinde büyük artış sağlanmıştır.

- **Hücre yapısının çeşitli yönleriyle incelenmesinde, birkaç farklı tip ışık mikroskobu rutin olarak kullanılır:**



Benign böbrek tümöründen bir kesit

En basiti, ışığın direkt olarak hücreden geçtiği ve hücrenin farklı bölgelerini ayırt edebilme kapasitesinin, görünen ışığın hücre bileşenleri tarafından soğurulmasından kaynaklanan kontrasta bağlı olduğu, **aydınlık alan mikroskopisidir**. Çoğu zaman, hücreler, hücrelerin farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kontrast farklılıkları oluşturmak üzere proteinlerle ya da nükleik asitlerle tepkime veren boyalarla boyanırlar. Boyama öncesinde, örnekler, yapılarının sağlamlaştırılması ve korunması için genellikle sabitleyicilerle (alkol, asetik asit veya formaldehit gibi) muamele edilirler. Sabitlenmiş ve boyanmış dokuların aydınlık-alan mikroskopisi ile incelenmesi, histoloji laboratuvarlarında doku analizi için standart bir yaklaşımdır.

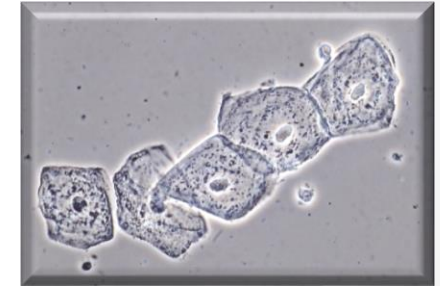
Bu tarz boyama işlemleri hücreleri öldürdüğünden, canlı hücre gözlenmesini gerektiren birçok araştırma için uygun değildir.

Boyama yapılmadığı zaman, ışığın doğrudan dokudan geçmesi hücrenin çoğu bölümlerini ayırt edebilecek kontrastı sağlamaz ve bu durum, aydınlık- alan mikroskopisinin kullanılabilirliğini sınırlar.

Canlı hücreleri görüntülemek için çok yaygın iki yöntem, **faz-kontrast mikroskopisi** ve **diferansiyel interferens-kontrast mikroskopisidir**. Her iki mikroskopide de, hücrenin farklı bölgeleri arasındaki yoğunluk veya kalınlık farklılıklarını, sonuçtaki görüntüde kontrast farklılıklarına dönüştüren optik sistemler kullanılır. Aydınlik-alan mikroskopisinde, saydam yapılar (nukleus gibi) ışığı çok az soğurduklarından, düşük kontrast verirler. Ancak, ışık bu yapılardan geçerken yavaşlar ve çevresindeki sitoplazmadan geçen ışığa kıyasla faz değişikliği olur. Faz-kontrast ve diferansiyel interferens-kontrast mikroskopları, bu faz farklılıklarını kontrast farklılıklarına çevirerek, canlı, boyanmamış hücrelerin daha gelişmiş görüntülerinin elde edilmesini sağlar.



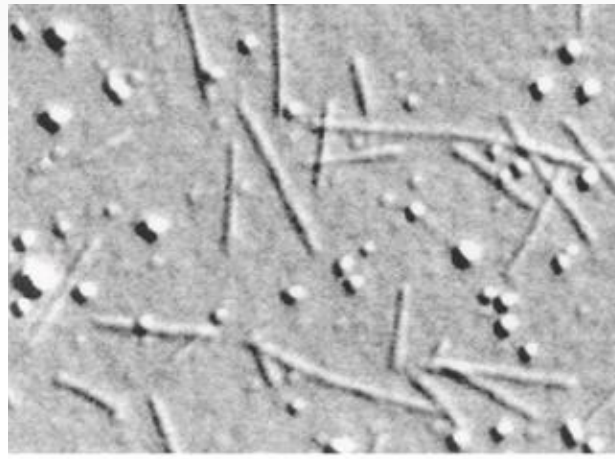
İnsan yanak hücrelerinin Aydınlik-alan mikroskopundaki görüntüsü



İnsan yanak hücrelerinin Faz-Kontrast mikroskopundaki görüntüsü

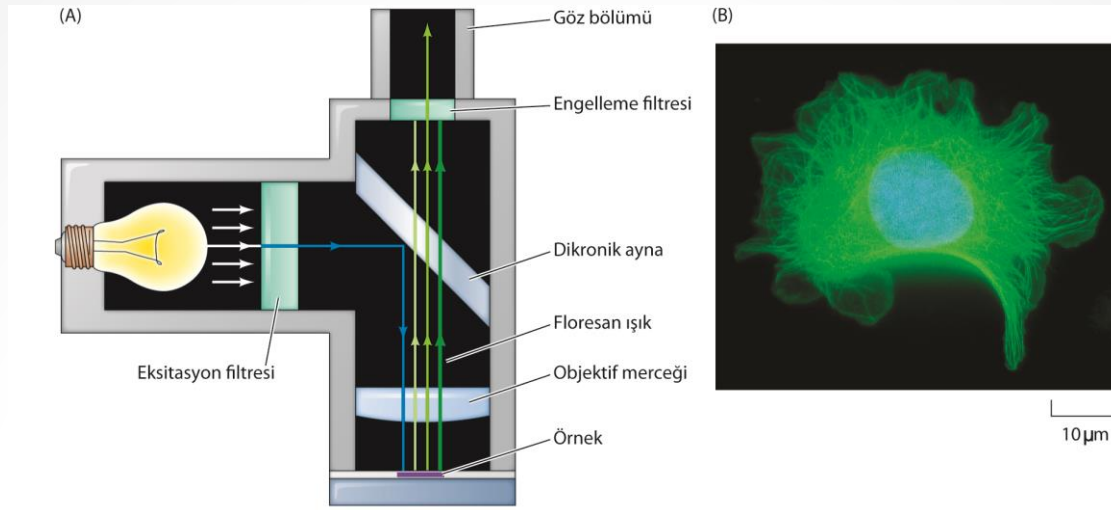


İnsan yanak hücrelerinin Diferansiyel İnterferens- Kontrast mikroskopundaki görüntüsü



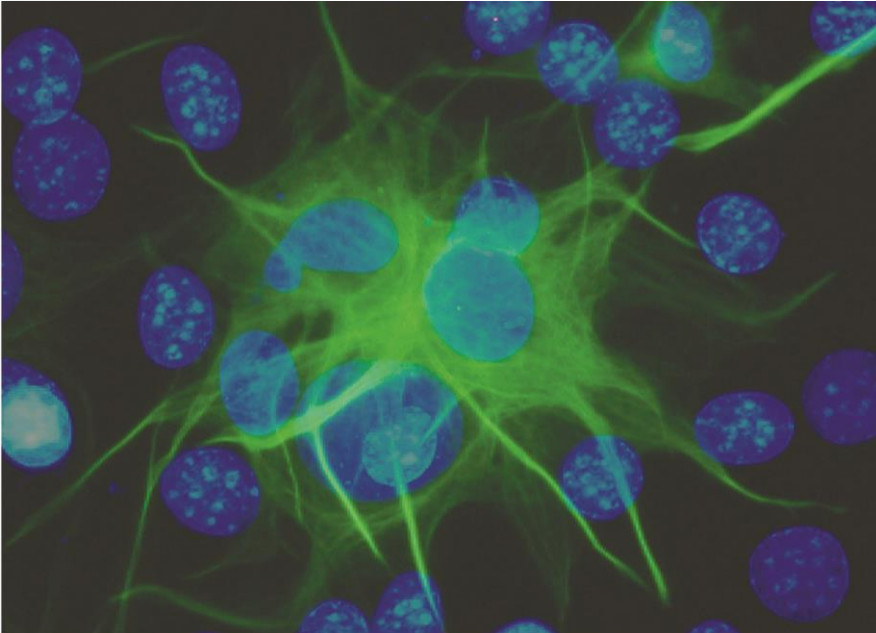
2.5 μm

- Işık mikroskopunun gücü, video kameralar ve görüntü analizi ve işlenmesi için bilgisayarların kullanılması ile önemli ölçüde artırılmıştır.
- Bu gibi elektronik görüntü-işleme sistemleri, ışık mikroskobu ile elde edilen görüntülerin kontrastlığını artırarak, başka türlü saptanamayacak olan küçük objelerin görülebilmesine olanak sağlar. Örneğin; video ile güçlendirilmiş diferansiyel interferens-kontrast mikroskobu, organellerin, yalnızca 0.025 μm çapında bir hücre iskeleti proteini olan mikrotübüller boyunca hareketlerinin görüntülenmesine olanak sağlamıştır.
- Bu güç artışı, ışık mikroskopunun yaklaşık 0.2 μm olan teorik rezolüsyon sınırının üstesinden gelemez. Bu nedenle, video ile güçlendirme, her ne kadar, mikrotübüllerin görülebilmesini sağlamışsa da, mikrotübüller 0.2 μm çapında ve bulanık olarak görünür ve tek bir mikrotübül, yakınındaki yapılar arasında ayırt edilemez.
- Belirli molekülleri hücre içinde görüntüleme amaçlı işaretleme yöntemleri sayesinde, ışık mikroskopisi moleküler analiz düzeyine ulaştırılmıştır. Spesifik genler veya RNA transkriptleri, komplementer dizili nükleik asit problemleri ile hibridizasyon yoluyla, proteinler de uygun antikolar kullanılarak saptanabilir. Nükleik asit problemleri ve antikolar, ışık mikroskobuyla görüntülenebilmeleri ve molekülün hücrenin içerisindeki yerinin belirlenebilmesi için çeşitli takılarla işaretlenebilirler.



- **Floresans mikroskopisi**, moleküllerin hücre içerisindeki dağılımını incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır.
- Canlı veya fikse edilmiş hücrelerin içindeki ilgilenilen molekülü işaretlemek için bir floresan boya kullanılır. Floresan boya, ışığı, bir dalga boyundan absorblayıp, ikinci bir dalga boyunda gönderen bir moleküldür. Bu floresan, incelenecek örneği, floresan boyayı uyaran bir dalga boyundaki ışıkla uyarılıp, boyanın gönderdiği özgün ışığın dalga boyunu yakalayabilen filtreler kullanılarak saptanır.
- Floresan mikroskopisi hücreler içerisinde çeşitli moleküllerin araştırılması amacıyla kullanılabilir.
- Sık uygulamalardan biri, özgül bir proteini hedefleyen antikorları floresan bovalarla işaretleyerek, proteinin hücre içi dağılımının saptanabilmesidir.

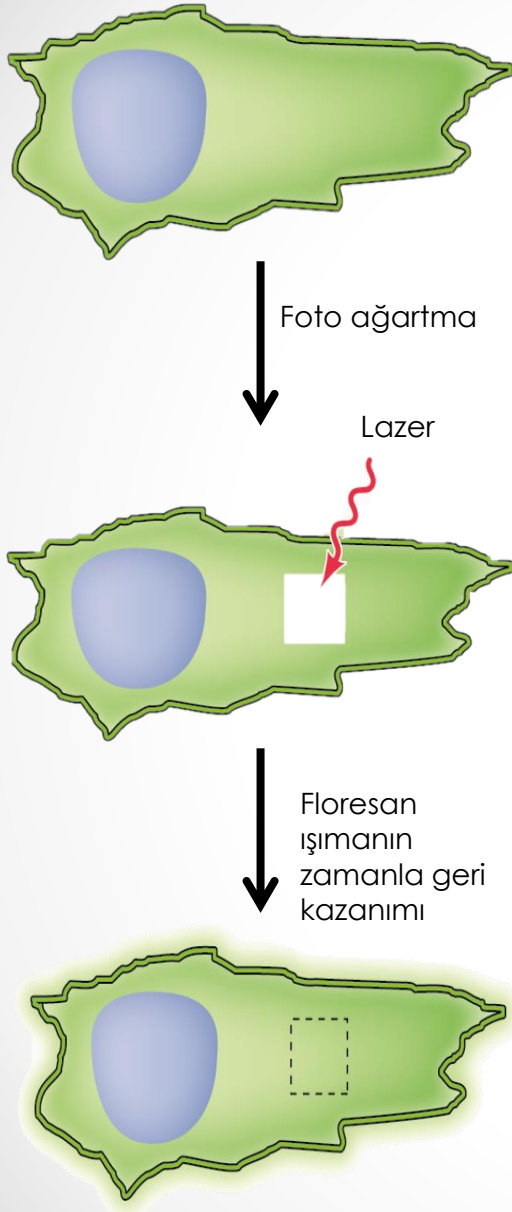
- ❑ Floresans mikroskopisinde önemli bir gelişme, denizanası yeşil floresan proteininin (GFP) canlı hücrelerin içindeki proteinleri görüntülemek için kullanılmasıdır.
- ❑ GFP, standard rekombinant DNA yöntemleri kullanılarak ilgi duyulan herhangi bir proteinle birleştirilebilir ve GFP-eklentili protein hücrede eksprese ettirilerek, proteinlerin antikora belirlenmesinde gerektiği gibi hücreleri sabitleyip boyamaya gerek olmadan, floresan mikroskopisi ile görüntülenebilir.
- ❑ Çok yönlü kullanılabilirliği nedeniyle, hücre biyolojisinde GFP kullanımı son derece yaygınlaşmıştır ve geniş çeşitlilikteki proteinlerin canlı hücreler içerisindeki yerleşimlerinin çalışılması amacıyla kullanılmaktadır.
- ❑ Birbiriyle ilişkili mavi, sarı veya kırmızı emisyonu sahip çeşitli floresan proteinler, farklı proteinlerin eş zamanlı olarak görüntülenmesini mümkün kılarak bu tekniğin daha geniş kapsamlı kullanımına imkan vermektedir.



5 μm

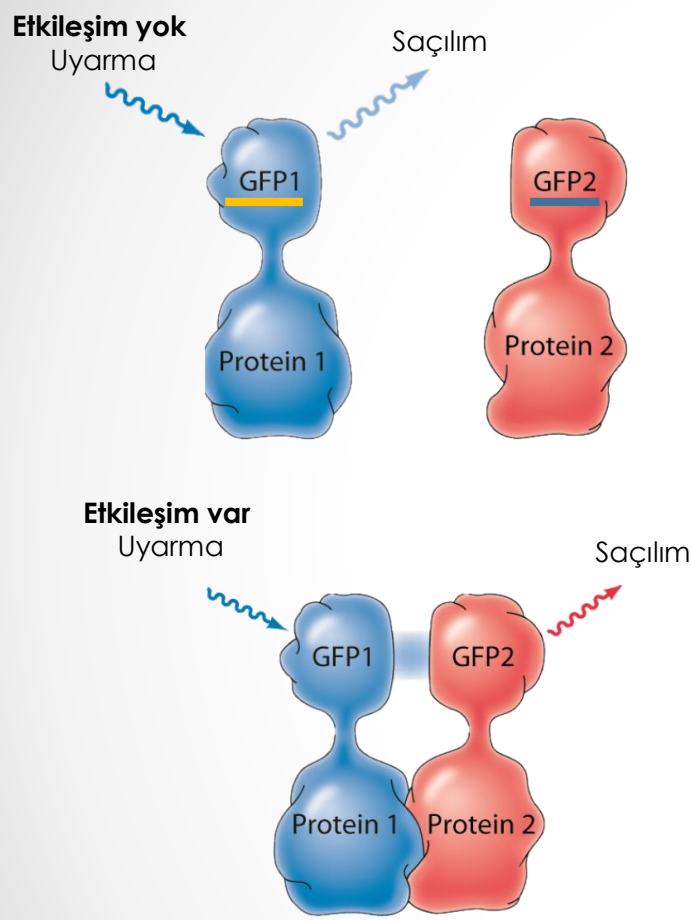
GFP ile işaretlenmiş bir proteinin floresan mikroskopisi.

GFP ile füzyon oluşturmuş bir mikrotübül ilişkili protein fare nöron kültüründeki hücrelere aktarılarak floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir. Çekirdek mavi boyanmıştır.



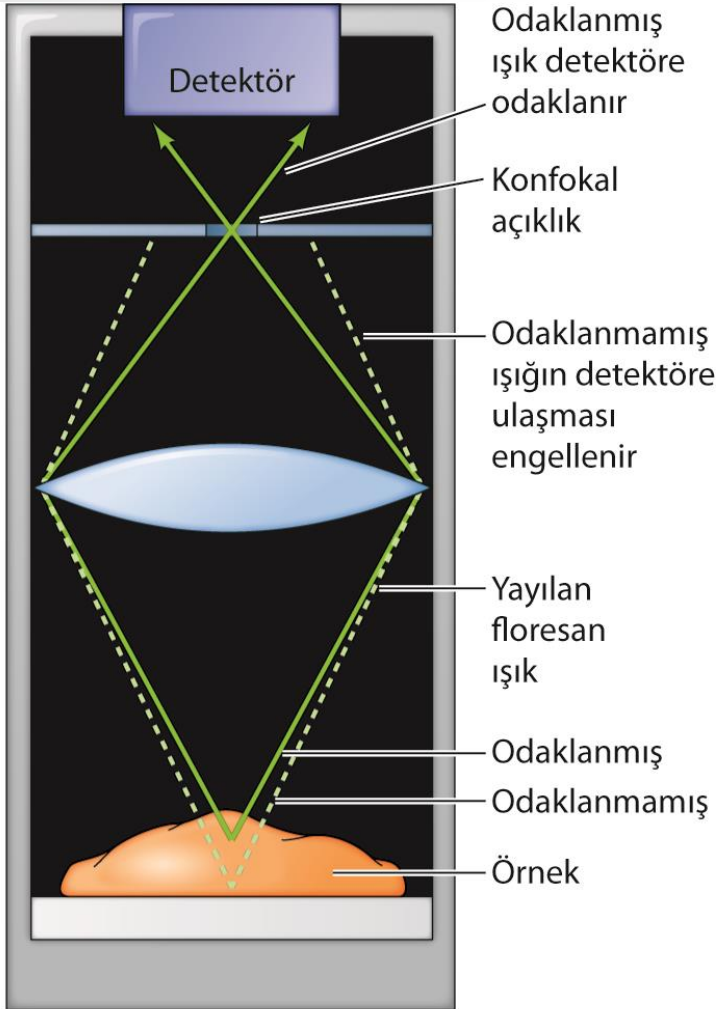
- ❖ Foto-ağartma sonrası floresan ışımının geri kazanımı (Fluorescence Recovery After Photobleaching: FRAP), GFP etiketli proteinlerin hareketlerinin çalışılmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir.
- ❖ Bu teknikte, hücrenin GFP-etiketli protein eksprese edilen ilgilenilen bir bölgesi, yüksek yoğunluklu ışığa maruz bırakılarak ağartılır.
- ❖ Ağırtilmış bölgeye, ağırtilmamış GFP-etiketli proteinlerin zaman içindeki göçü ile floresan ışımının geri kazanılması, hücre içinde ilgili bölgeye protein göç hızının belirlenmesine olanak sağlar.

Bir hücre içindeki iki proteinin bir biri ile etkileşimleri *floresan rezonans enerji transferi (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET)* adı verilen bir teknik ile analiz edilebilir.

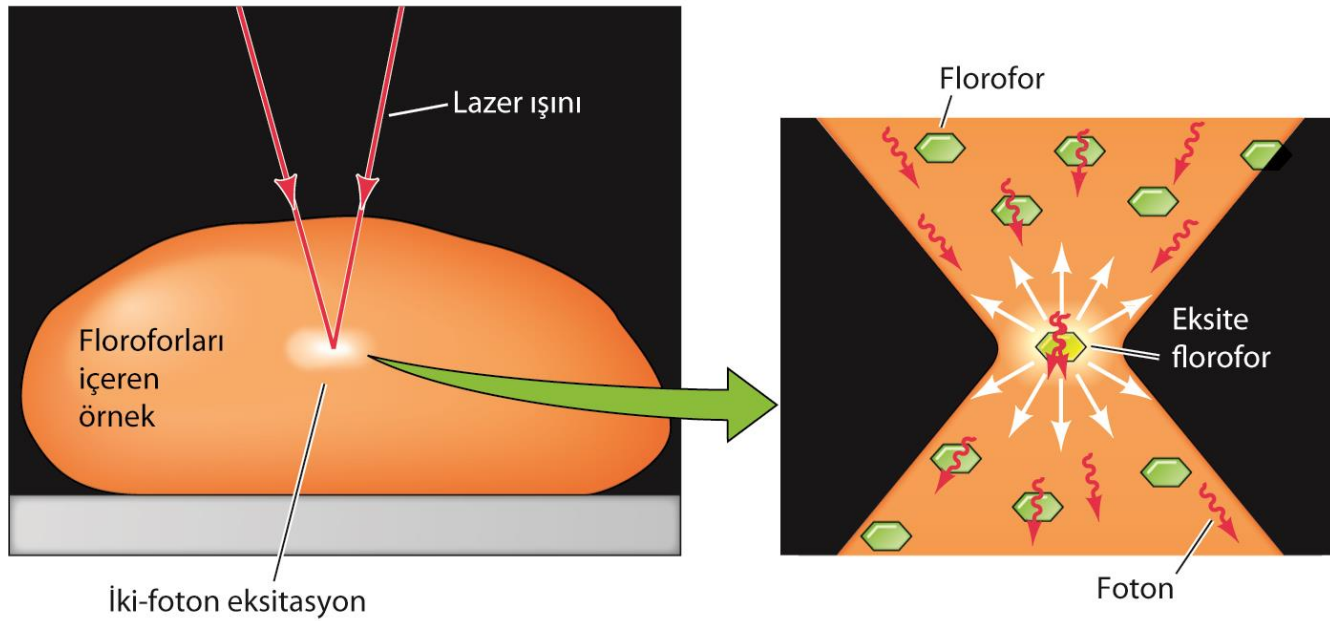


- FRET deneylerinde, ilgilenilen iki protein, GFP'nin iki farklı varyantı gibi farklı floresan boyalarla etiketlenir.
- GFP varyantları farklı dalga boylarındaki ışıkları absorbe etmek ve yaymak üzere seçilirler ve böylece bir GFP varyantı tarafından yayılan ışık ikincisini uyarır.
- İki protein arasındaki etkileşim, birinci GFP varyantını uyaran bir dalga boyundaki ışık ile hücrenin aydınlatması sonrasında hücreden yayılan ışığın dalga boyunun analiz edilmesi ile tespit edilebilir.
- Eğer GFP varyantları ile etiketlenen proteinler hücre içinde etkileşim halindelerse, floresan molekülleri birbirine yakın hale gelirler ve birinci GFP varyantından saçılan ışık ikinci GFP varyantının uyarılmasını sağlayarak, sonuçta ikinci GFP varyantına özgü dalga boyundaki ışık emisyonu gerçekleşir.

Özetle hücreler GFP1'i uyarma özelliğindeki dalga boyuna sahip bir ışığa maruz bırakıldığında ; proteinler etkileşim içinde değilse GFP1 tarafından saçılmış ışık tespit edilir, eğer proteinler etkileşim halindeyse GFP1'den yayılan ışık GFP2'yi uyarır ve buradan yayılan ışık tespit edilir.



- Geleneksel floresan mikroskobu ile elde edilen görüntüler, odak-dışı floresan ışınlar sebebiyle bulanıklaşır. Bu görüntüler, görüntü dekonvolüsyon adı verilen bir bilgisayar yaklaşımı ile geliştirilebilmektedir. Bu sistemde, farklı odak derinliklerinden elde edilen görüntüler bir bilgisayarda analiz edilir ve tek bir odak noktasından beklenenden daha net bir görüntü oluşturulur. Buna alternatif olarak, **konfokal mikroskopisi**, örnekteki tek bir noktadan elde edilen floresanı analiz ederek yüksek kontrastlı ve detaylı görüntülere imkan verir.
- Genellikle bir lazer ile sağlanan küçük bir ışık noktası, incelenecek örnek üzerinde, belirli derinlikte odaklanır. Yayılan floresan ışık, video kamera gibi bir detektör vasıtasıyla toplanır. Ancak, yayılan ışık detektöre ulaşmadan önce, tam olarak, örneğin seçilen derinliğinden gelen ışığın odaklandığı noktaya yerleştirilen bir iğne deliği açıklığından (bir konfokal açıklığı olarak adlandırılır) geçmesi gerekir.
- Sonuç olarak, sadece odaklanılan düzlemden gönderilen ışık detektöre ulaşabilir. İncelenen örneğin baştan sona taranması ile, odaklanan düzlemin, standard floresan mikroskopisi ile elde edileden çok daha keskin bir iki boyutlu görüntüsü elde edilir.
- Bunun da ötesinde, örneğin üç-boyutlu bir görüntüsünü kurgulamak için, farklı derinliklerden elde edilen bir dizi görüntüden yararlanılabilir.



Multi-foton eksitasyon (uyarı) mikroskopisi, canlı hücrelerin incelenmesinde konfokal mikroskopiye alternatiftir.

İncelenecek örnek, tek bir dalga boyundaki ışık ile aydınlatılır, öyle ki, floresan boyanın eksitasyonu için eşzamanlı olarak iki veya daha fazla fotonun absorpsiyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

İki fotonun aynı anda floresan boyayı uyarma olasılığı, sadece, örneğin içerisine giren lazer ışınının odaklandığı noktada anlamlıdır, böylece floresan yalnızca giren ışığın odaklanmış olduğu düzlemde yayılır. Bu çok iyi sınırlanan eksitasyon sayesinde, yayılan ışığın konfokal mikroskopisindeki gibi bir iğne deliği açıklığından geçirilmesine gerek kalmaz. Ayrıca, uyarının lokalizasyonu örneğe verilecek hasarı en aza indirerek canlı hücrenin üç boyutlu görüntüsünün elde edilmesine imkan verir.

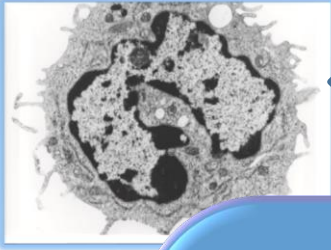
Elektron Mikroskopisi

- Işık mikroskopunun çözünürlüğünün sınırlı oluşu, hücre yapısının daha ayrıntılı analizi için, 1930'larda geliştirilen ve biyolojik örnekler üzerinde ilk kez Albert Claude, Keith Porter ve George Palade tarafından 1940'larda ve 1950'lerde kullanılan elektron mikroskobu gibi, daha güçlü mikroskopik yöntemlerin kullanımını gerektirmiştir.
- Elektronların dalga boyu ışığından daha kısa olduğu için, elektron mikroskobu ışık mikroskobuna göre çok daha yüksek çözünürlüğe ulaşabilmektedir.
- Bir elektron mikroskopunda elektronların dalga boyu 0.004 nm kadar kısa olabilir, ki bu, görünen ışığın dalga boyundan yaklaşık 100,000 kez daha kısadır. Teorik olarak bu dalga boyunun 0.002 nm çözünürlük sağlaması gerekir, ancak, çözünürlük sadece dalga boyuyla değil aynı zamanda mikroskop merceğinin nümerik açıklığıyla da belirlendiğinden, pratikte bu çözünürlük elde edilemez. Elektromanyetik merceklerin doğası, açıklık açılarını yaklaşık 0.5 derece ile sınırladığı ve bu da sadece 0.01 kadar bir nümerik açıklığa denk geldiği için, elektron mikroskopisinde nümerik açıklık sınırlayıcı faktördür. Böylece, optimum koşullarda, elektron mikroskopunun çözme gücü 0.2 nm kadardır. Bunun da ötesinde, biyolojik örneklerle elde edilebilen çözünürlük, doğal kontrast eksiklikleri nedeniyle daha da sınırlıdır.

Elektron Mikroskopisi

- Sonuç olarak, biyolojik örnekler için elektron mikroskobunun pratikteki limiti 1-2 nm'dir. Her ne kadar bu çözünürlük elektronların dalga boyuna göre hesaplanandan çok daha az ise de, ışık mikroskoplarının çözücü gücünün yüz misli üzerinde bir ilerlemeyi simgeler.
- **Elektron mikroskopisinin iki tipi -transmisyon ve tarama elektron mikroskopisi- hücreleri incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır.**
- Prensip olarak, transmisyon elektron mikroskopisi, boyanmış hücrelerin aydınlık-alan mikroskobu ile gözlenmesine benzer. Örnekler sabitlenip, saçılan elektronlar ile kontrast veren ağır metal tuzları ile boyanır. Daha sonra, bir elektron demeti örnekten geçirilip, floresan bir ekran üzerinde görüntü oluşturmak üzere odaklanır. Örnekten geçerken ağır metal iyonu ile karşılaşan elektronlar sapar ve son görüntüde payları olmaz ve böylece örneğin boyanan bölümleri karanlık görünür.

Transmisyon elektron mikroskobu ile incelenmek istenen örnekler negatif veya pozitif boyama ile hazırlanabilir.



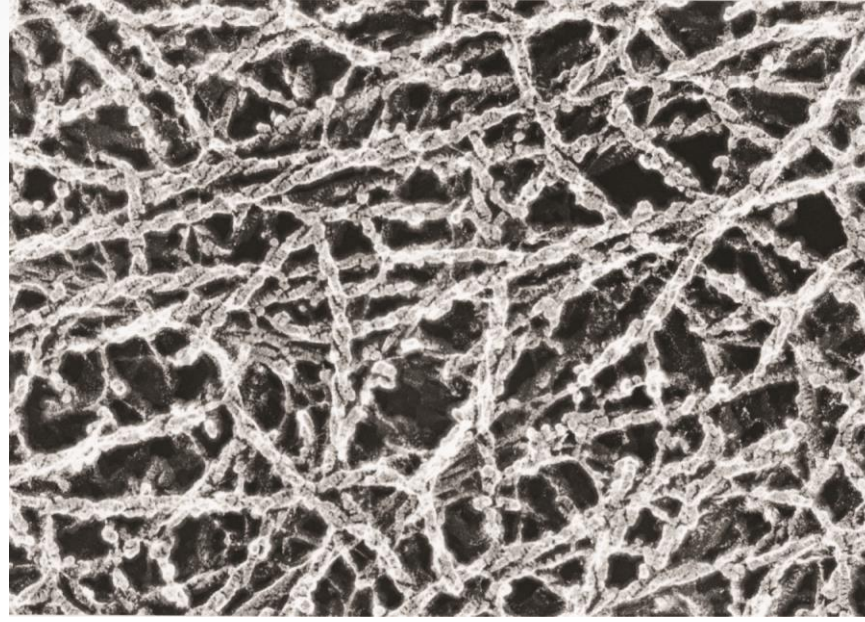
**Pozitif
Boyama**

- Doku örnekleri ince kesitler halinde kesilir, lipidler, proteinler ve nükleik asit ile reaksiyona girebilen ağır metal tuzları (osmium tetroksit, uranil asetat ve kurşun sitrat gibi) ile boyanır. Bu ağır metal iyonları, son görüntüde karanlık gözükecek olan çeşitli hücre yapılarına bağlanırlar.
- Alternatif pozitif boyama yöntemleri de hücrelerdeki belirli makro molekülleri saptamak amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin, elektron-yoğunluklu ağır metallerle (altın parçacıkları gibi) işaretlenmiş antikolar, elektron mikroskobunda spesifik proteinlerin hücre içi yerleşimlerini belirlemek amacı ile kullanılmaktadır. Bu yöntem, floresan mikroskopisinde, floresan boyalar ile işaretlenmiş antikoların kullanımına benzemektedir. Yapıların 2-10 nm çözünürlükteki üç boyutlu görüntüleri elektron tomografi metodu kullanılarak da elde edilebilmektedir. Bu üç boyutlu görüntü, görüntüleme yönünün üzerindeki sınırlardan alınan çok sayıdaki iki boyutlu görüntünün bilgisayar analizi ile oluşturulmaktadır.



**Negatif
Boyama**

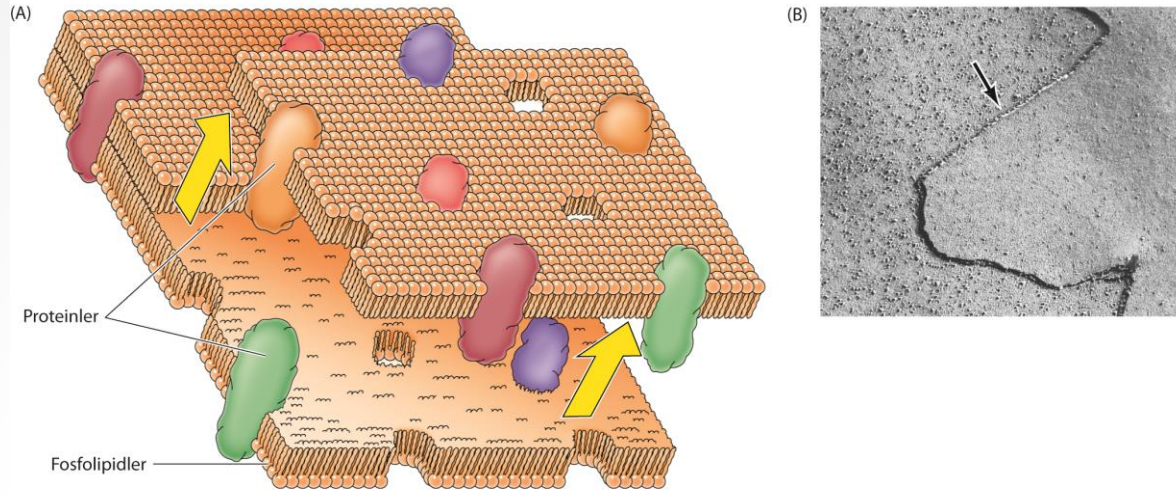
- Bakteriler, izole edilmiş hücre içi organeller ve makro moleküller gibi bütün halindeki biyolojik yapıların görüntülenmesi için kullanılır.
- Bu yöntemde, biyolojik örnek destekleyici bir ince tabaka üzerine konur ve bir ağır metal boyanın, bu örneğin yüzeyi etrafında kuruması sağlanır. Boyanmamış örneğin çevresi, elektron yoğunluklu bir boya tabakası ile kaplanır ve bu sayede karanlık arka plan üzerinde örnek aydınlık görünür.



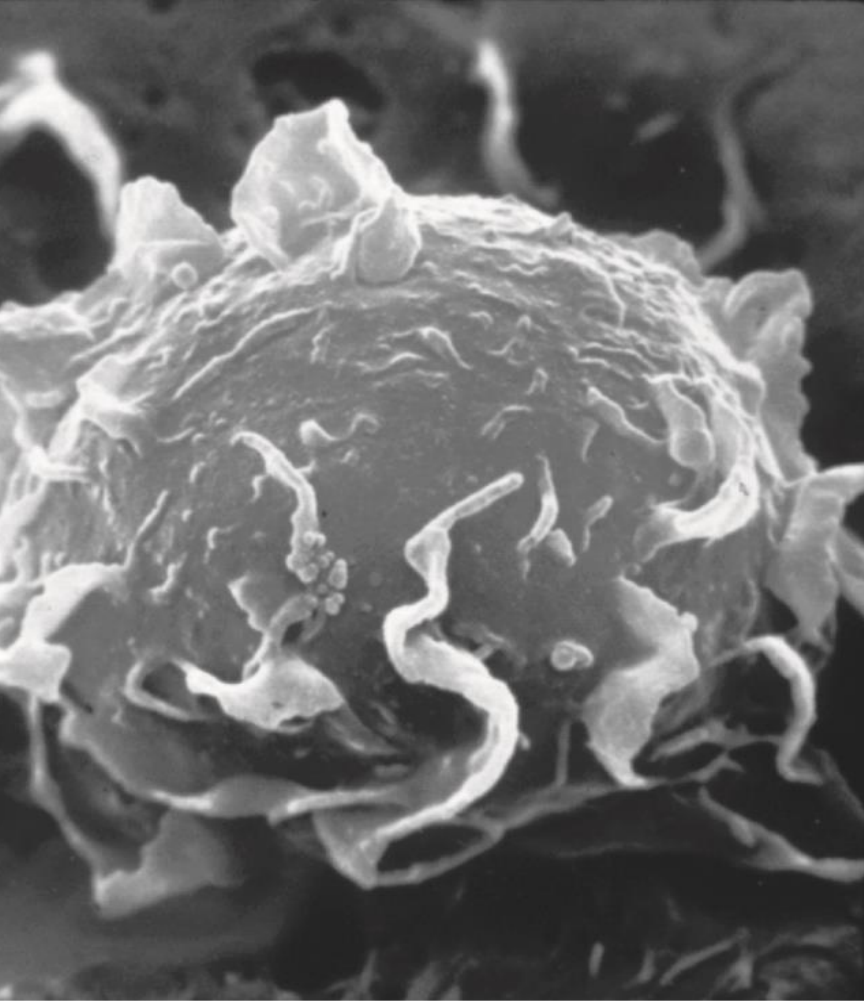
Metal gölgeleme ile hazırlanan hücre iskeleti aktin/miyozin flamanlarının elektron mikroskop görüntüsü

Metal gölgeleme yöntemi izole edilmiş hücre içi yapıların veya makromoleküllerin yüzeylerinin transmisyon elektron mikroskopunda görüntülenmesinde kullanılan diğer bir tekniktir.

Örnek, platin gibi, buharlaştırılan ince bir metal katmanı ile kaplanır. Metal, buharlaştırılan metal moleküllerinin kaynağına bakan örnek yüzeyinin diğer taraflardan daha yoğun metal kaplanacağı bir açıdan örnek üzerine püskürtülür. Bu farklı kaplama bir gölge etkisi yaratır, böylece örneğin elektron mikroskop görüntüleri üç boyutlu gözükür.



Örneklerin, metal gölgelemesi ile kombine olarak **dondurup-çatlatma (freze fracture) yöntemi** ile hazırlanması özellikle zar yapılarının araştırılmasında önem kazanmıştır. Örnekler sıvı azot içerisinde (-196°C) dondurulur ve daha sonra bir bıçak ağzıyla çatlatılır. Bu işlem genellikle, hücre zarının iç yüzeyini açığa çıkaracak şekilde, lipid çift tabakayı ikiye ayırır. Daha sonra örnek platin ile gölgelenir, biyolojik materyal asit ile çözülerek, örnek yüzeyinin metal kalıbı elde edilir. Bu kalıplar elektron mikroskopunda incelendiğinde, lipid çift tabakayı kat eden proteinlere uyan birçok yüzey çıkıntısı görülür. Dondurup-çatlatma yönteminin, **dondurup-şekil çıkartma** olarak isimlendirilen değişik bir tipi, hücre zarlarının iç yüzlerine ek olarak dış yüzeylerinin de görüntülenmesini sağlar.



5 μm

Tarama elektron mikroskopisinde elektron demeti, örneğin içinden geçmez. Bunun yerine, hücrenin yüzeyi ağır bir metal ile kaplanır ve bir elektron demeti kullanılarak, örnek baştanbaşa taranır. Elektron demeti hücre boyunca hareket ederken, örnek yüzeyinden geri gelen ya da saçılan elektronlar, üç boyutlu görüntü oluşturmak üzere toplanır.

Süper Çözünürlüklü Işık Mikroskopisi

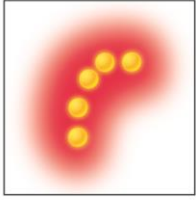
- **Elektron mikroskopisi, ışık mikroskopisinden daha yüksek çözünürlük sunmasına rağmen çeşitli dezavantajları vardır.**
 - Elektron mikroskopisi pahalı ve kullanımı teknik olarak zordur.
 - Elektron mikroskopisinde ihtiyaç duyulan fiksasyon ve boyama prosedürleri artifakt üretebilmektedir ve elektron mikroskobu canlı dokuların incelenmesinde kullanılamamaktadır.
- Son yıllardaki heyecan verici bir gelişme olan süper çözünürlüklü ışık mikroskopi tekniği kırılma engelini aşarak floresan mikroskobunun çözünürlüğünün sınırlarını 10-100 nm'ye yükseltmiştir: Işık mikroskobunun teorik kırılma limitinden yaklaşık 10 kat daha az.

2014 Kimya Nobel Ödülü yüksek çözünürlüklü ışık mikroskobunun keşfinden dolayı Eric BETZING, Stefan HELL ve William MOENER'e verilmiştir.

- Çözünürlüğü, görünür ışıkların dalga boyundan moleküler düzeye değiştiren floresan prob kullanımına dayalı çeşitli süper çözünürlüklü ışık mikroskopi yöntemleri geliştirilmiştir. Bu duruma verilebilecek en iyi örnek, yaklaşık 20 nm çözünürlüğe sahip olan ve 2006 yılında **geliştirilen STORM (Rasgele optik yeniden yapılandırma mikroskobu: stochastic optical reconstruction microscopy)** yöntemidir.
- STORM ve ilişkili yöntemler, binlerce veya milyonlarca bireysel floresan molekülün bir araya getirilmesi ile yüksek çözünürlüklü görüntü oluşturmaları prensibi ile çalışmaktadır. Standart bir floresan mikroskopide, bir örnekteki bütün floresan problemler aynı zamanda floresan ışığı yaymaktadır. Her bir molekülün floresan görüntüleri üst üste binerek, ışığın kırılması ile sınırlandırılmış çözünürlükte bulanık bir görüntü verirler.
- **STORM**, karanlık ve floresan durumlar arasında geçiş yapan floresan problemleri kullanır. Her hangi bir zamanda, floresan probun yalnızca küçük tesadüfi bir fraksiyonu ışımaya yapar, öyle ki, bireysel floresan molekül bir diğerinden gelmiş olabilir. Zaman içerisinde bu şekilde çok sayıda görüntünün yakalanması bir seri anlık resim verir, her resimde farklı bireysel moleküller ışımaya yapmaktadır. Bu çok sayıdaki görüntü, kompozit bir resim oluşturmak üzere bir araya getirilebilir, ki bu görüntünün çözünürlüğü, ışın kırılmasından ziyade, yerleştirilen her bir floresan molekülün hassasiyeti ile sınırlıdır.

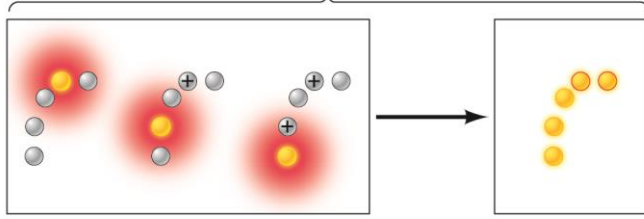
Süper çözünürlüklü mikroskopi metodunun kapsamı; üç boyutlu görüntü, çok sayıda farklı molekülün farklı renkte floresan problemleri kullanılarak eş zamanlı görüntülenmesi ve canlı hücrelerin süper çözünürlüklü görüntülenmesi alanlarını kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Hücre iskeleti yapısına ek olarak, süper çözünürlüklü mikroskopi; çekirdek, kromatin, hücre yapışma bölgeleri ve plazma zarının ince detaylarının görülmesini sağlamıştır. Gelecekteki araştırmaların, hücre içindeki moleküler olayların görüntülenmesine imkân verecek, günümüzdeki mevcut metodlardan dahi daha yüksek çözünürlükteki metodları geliştirmesi muhtemeldir.

Geleneksel
floresan



Moleküllerin tamamı
floresan verir - ayırmak
için çok yakınlar

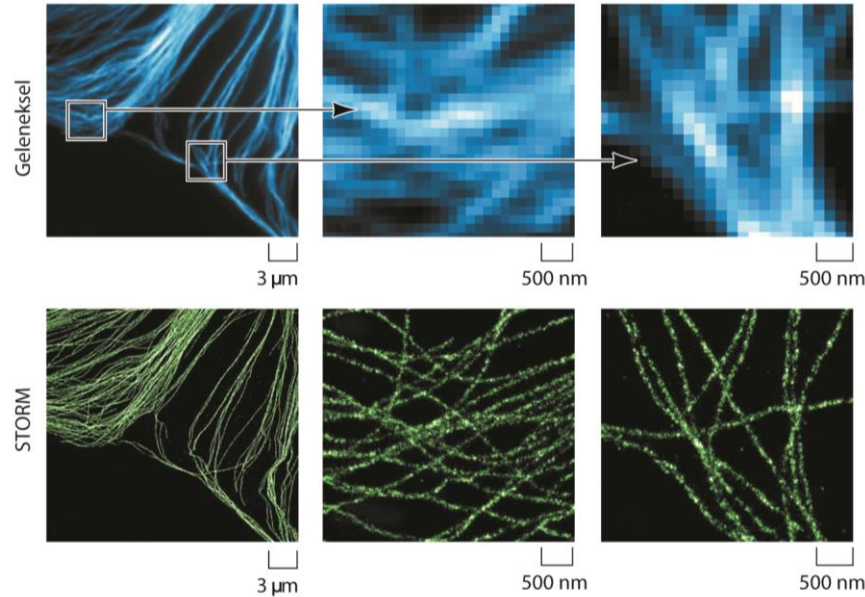
STORM



Her bir floresan molekülün rastgele
aktivasyonu...

...süper çözünürlükte görüntü
oluşması ile
sonuçlanır

Konvaksiyonel floresans mikroskoplarında, örnekteki bütün floresan moleküller aynı anda ışımaya yapar ve bulanık görüntü verirler. STORM'da problemin yalnızca küçük rastgele kısmı herhangi bir zaman içinde rastgele ışımaya yapar. Bu, her bir floresan molekülünden zaman içerisinde elde edilen çok sayıda görüntü birbirinden çözülür ve süper çözünürlüklü görüntü bileşenleri oluşturulur.



Mikrotübüllerin mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması

Hücreyi Alt Bileşenlerine Ayırma

- Elektron mikroskobu, hücre yapısının ayrıntılı görüntülenmesine olanak sağlamasına karşın, ökaryot hücrelerin çeşitli bileşenlerinin işlevlerinin tanımlanması için mikroskop tek başına yeterli değildir.
- Hücre içi organellerin fonksiyonları ile ilgili birçok sorunun yanıtlanabilmesi için, ökaryotik hücrelerin organellerini, biyokimyasal çalışmalarda kullanılabilecek şekilde, izole etmek gerektiği kanıtlanmıştır.
- Bu, genellikle, 1940 ve 1950'li yıllarda Albert Claude, Christian de Duve ve arkadaşları tarafından, hücrelerin bileşenlerini boyut ve yoğunluklarına göre ayırmak amacıyla geliştirilmiş olan **diferansiyel santrifügasyon yöntemiyle** sağlanır.

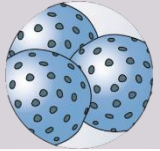
İlk adım, hücrenin iç bileşenlerine zarar vermeden plazma zarının parçalanmasıdır.

Bunun için, sonikasyon (yüksek frekansta sese maruz bırakma), mekanik homojenizatör ile öğütme veya yüksek hızda blender uygulaması gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

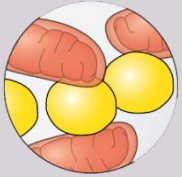


Lizozomlar, peroksizomlar ve zar parçaları gibi hücre alt elemanlarını içeren parçalanmış hücre süspansiyonu

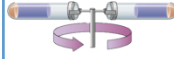
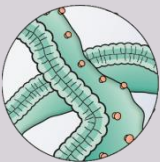
Çekirdek çözeltisi



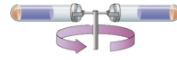
Mitokondri, lizozom ve peroksizom çözeltisi



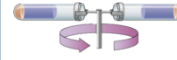
Süpernatanın daha da hızlı devirde santrifüjlenmesi ile plazma zarı ve endoplazmik retikulum parçaları



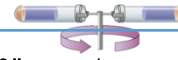
Santrifüj 800 x gravite
10dk



Süpernatanın
santrifüjü 15000 x
gravite
10dk



Süpernatanın
santrifüjü 100000x
gravite
60dk

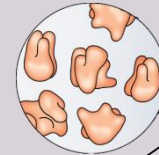


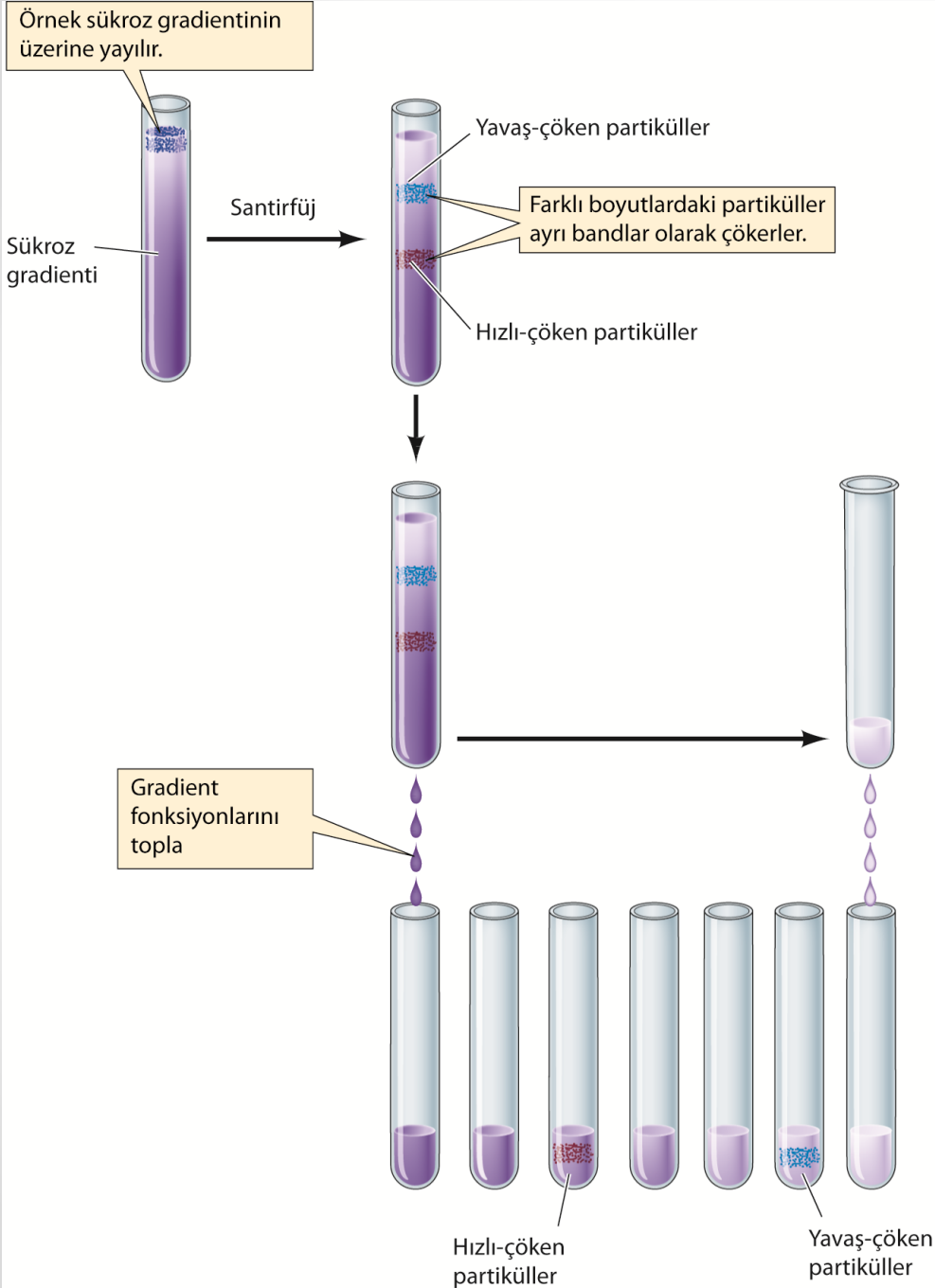
Süpernatanın
santrifüjü 200000x
gravite
3saat

Parçalanmış hücre süspansiyonu (lizat ya da homojenat olarak adlandırılır), yerçekiminden 500,000 kat daha büyük bir kuvvet oluşturmak için, örnekleri çok yüksek hızlarda (1 00,000 rpm üzeri) çeviren bir ultrasantrifugasyon yardımıyla, bir dizi santrifügasyonla bileşenlerine ayrılır. Bu kuvvet, hücre bileşenlerinin büyüklüklerine ve yoğunluklarına bağlı olarak, en büyük ve en ağır olan en hızlı çökecek şekilde, santrifüj tüpünün dibine doğru hareket etmelerine ve bir çökelti oluşturmalarına (sedimentasyon denilen bir olay) sebep olur.

Hücre homojenati genellikle, düşük bir devirde santrifüjlenir, böylece, sadece parçalanmamış hücreler ve nükleuslar gibi en büyük hücre içi organeller çöker. Bu şekilde düşük hızdaki bir santrifüjle oluşan çökeltiden zengin bir nükleus fraksiyonu elde edilirken, diğer hücre bileşenleri süpernatanda (geri kalan çözelti) asılı durumda kalır.

Daha da hızlı bir devirde santrifüjleme ile ribozomlar çöker ve geride, sitoplazmanın çözünen kısmı (sitozol) kalır.

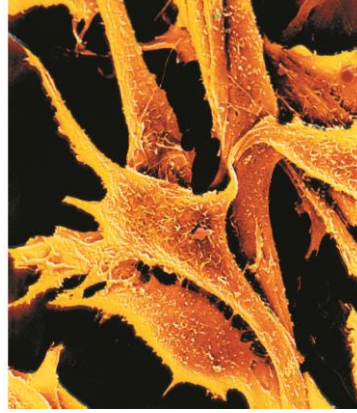




Diferansiyel santrifüj ile, zenginleşmiş fakat hala saf olmayan organel fraksiyonları elde edilir. Daha ileri düzeyde bir saflaştırma, organellerin, sükroz gibi yoğun bir maddenin gradienti içerisinde geçirilerek çöktürüldüğü, **yoğunluk-gradient santrifügasyonu** ile elde edilebilir. Hız santrifügasyonunda, başlangıç materyali, sükroz gradientinin üzerine, tabaka oluşturacak biçimde eklenir. Farklı büyüklükteki partiküller, gradient içerisinde geçerken farklı hızda çökerler ve ayrı bandlar halinde yürürler. Santrifügasyondan sonra belirli gradient fraksiyonlarının toplanmasıyla, mitokondriler, lizozomlar ve peroksizomlar gibi, benzer büyüklükteki organelerin ayırt edilmesi sağlanır.

- Yoğunluk gradientlerinde **denge santrifügasyonu**, hücre altı bileşenlerinin, büyüklük ve biçimlerinden bağımsız olarak, yüzme (buoyant) yoğunluğu temeline göre ayrıştırılması amacıyla kullanılabilir. Bu işlemde örnek, yüksek konsantrasyonlu sükroz ya da sezyum klorid gradientinde santrifuj edilir.
- Çökme hızlarına göre ayırmaktan ziyade, örnek partiküller, yüzme yoğunlukları kendilerini çevreleyen sükroz veya sezyum klorid konsantrasyonu ile denge konumuna ulaşana kadar santrifüj edilirler.
- Denge santrifüjü değişik tiplerdeki zarların birbirinden ayrılmasında kullanılabilirdiği gibi, farklı izotoplarla işaretlenmiş makro molekülleri ayırt edebilecek kadar da duyarlıdır.
- Klasik bir örnek, ağır ve hafif azot izotopları (^{15}N ve ^{14}N) içeren DNA moleküllerinin, DNA replikasyonunun analizi amacıyla, sezyum kloridli denge santrifügasyonu ile ayrılmasıdır.

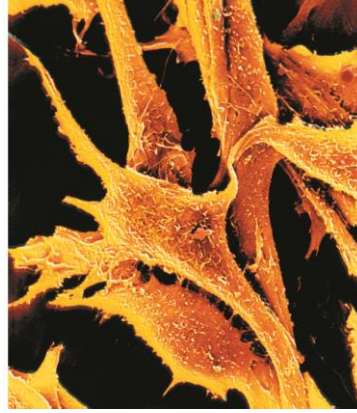
Hayvan Hücrelerinin Kültürde Üretilmesi



Bir kültür kabının yüzeyine tutunmuş insan fibroblastlarının taramalı mikroskop görüntüsü

- ❖ Hayvan hücre kültürleri, bir parça dokuyu hücrelerine ayırıp, besi ortamı içeren kültür kabına süspansiyon halinde ekleyerek başlatılır. Fibroblastlar ve epitel hücreleri gibi birçok hayvan hücre tipi, hücre kültürü için kullanılan kabın plastik yüzeyine tutunarak çoğalır. Hızla çoğalan hücreler içermeleri sebebiyle, **embriyolar ve tümörler başlangıç materyali olarak sıklıkla kullanılırlar. Embriyo fibroblastları kültürde oldukça iyi üremeleri nedeniyle, en yaygın olarak kullanılan hayvan hücresi tiplerindendir.**
- ❖ Bununla birlikte, uygun koşullar altında, birçok farklı hücre tipi de kültürde çoğaltılabilir ve böylece, kontrollü deneysel koşullarda farklılaşan özellikleri incelenebilir. **Embriyonik kök (ES) hücreler** özellikle değinilmesi gereken bir örnektir. Erken embriyodan alınarak kültürü hazırlanan bu hücreler, erişkin organizmalarda mevcut tüm hücre tiplerine farklılaşabilme özelliklerini korurlar. Sonuç olarak, embriyonik kök hücreler, fare gelişiminde görevli çeşitli genlerin işlevlerinin araştırılmasında önemli rol oynamışlardır. İnsan hastalıklarında, transplantasyon uygulamaları için doku kaynağı sağlayarak, tedaviye katkıda bulunabilme olanağı

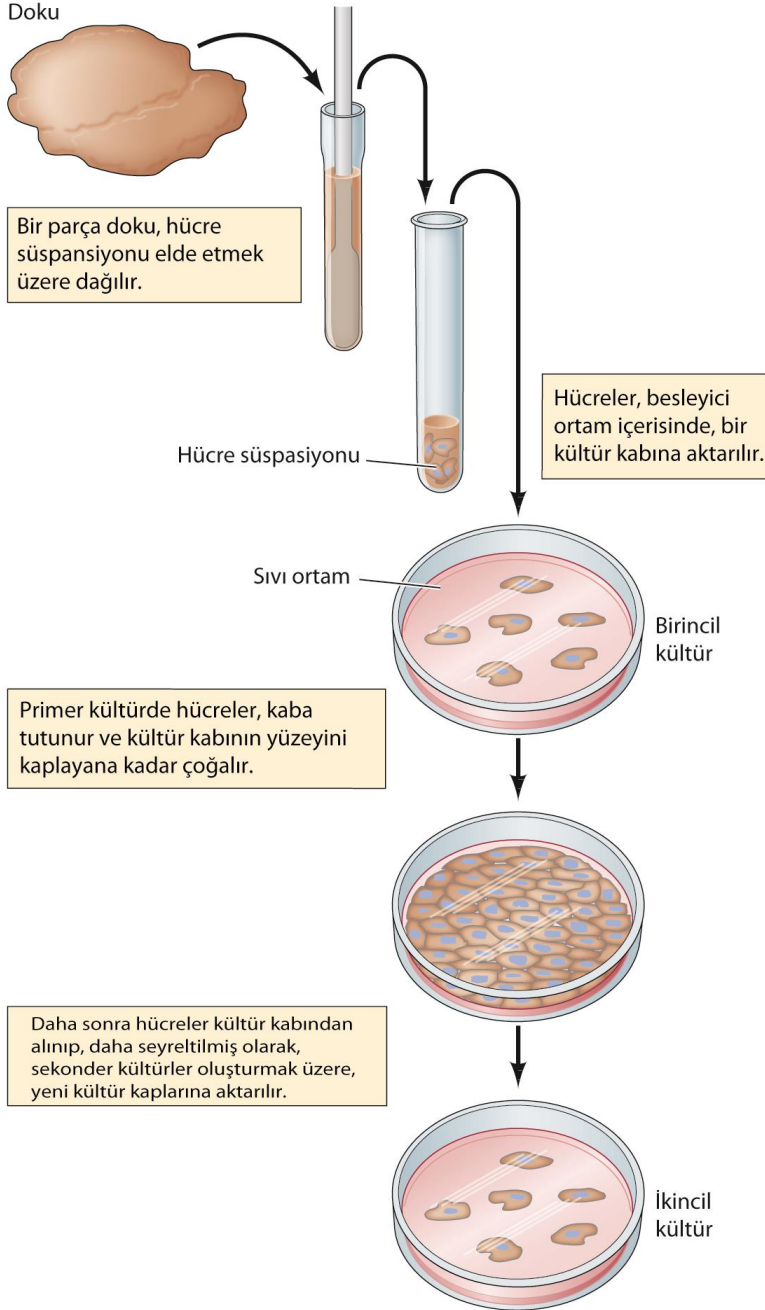
Hayvan Hücrelerinin Kültürde Üretilmesi



Bir kültür kabının yüzeyine tutunmuş insan fibroblastlarının taramalı mikroskop görüntüsü

- ❖ Hayvan hücrelerinin çoğalması için gerekli kültür ortamı, bakteri ve mayaların çoğalmasını sağlamak için yeterli olan minimal ortamdan çok daha karmaşıktır. Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan ortam, tuzlara ve glukoza ek olarak, hücrelerin kendilerinin yapamadığı çeşitli amino asitleri ve vitaminleri de içerir. Kültürdeki hayvan hücrelerinin büyüme ortamı, hücre bölünmesini uyarmak için gerekli polipeptid büyüme faktörlerinin kaynağı olan serum içerirler. Bu büyüme faktörlerinden birkaçı tanımlanmıştır. Çok hücreli organizmalarda, farklı hücrelerin birbiriyle iletişim kurmasını sağlayan sinyaller oluşturarak hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının önemli düzenleyicisi görevini yaparlar.,

Örneğin, hayvan deri fibroblastlarının önemli bir fonksiyonu, bir kesilme ya da yaralanma sonucu oluşan hasarı onarmak üzere çoğalmalarıdır. Kanın pıhtılaşması sırasında plateletlerden salınan büyüme faktörü, hasarlı doku yakınındaki fibroblastların çoğalmasını uyarak, bölünmelerini başlatır. Farklı büyüme faktörlerinin tanımlanması, çeşitli hücrelerin serumsuz ortamlarda (ilgilenilen hücrenin çoğalabilmesi için gerekli büyüme faktörünün, serum yerine kullanıldığı ortam) çoğaltılmasına olanak sağlamıştır.



Bir dokudan hazırlanan başlangıç hücre kültürlerine **BİRİNCİL KÜLTÜRLER** denir.

Birincil kültürdeki hücreler, genellikle, kültür kabının yüzeyini kaplayıncaya kadar çoğalır. Daha sonra, kültür kabından alınır ve seyreltilerek, ikincil kültürleri oluşturmak üzere, tekrar kültür kaplarına konur. Bu işlem defalarca tekrarlanabilir, ancak normal hücrelerin çoğu kültürde sonsuza kadar çoğaltılamaz. Örneğin, normal insan fibroblastları genellikle, 50 ile 100 kez popülasyonu ikiye katlar, sonra üremeyi durdurur ve ölürler. Buna karşın, embriyonik kök hücreler ve tümörlerden alınan hücreler çoğunlukla, kültürde süresiz çoğalır ve **sürekli ya da ölümsüz hücre hatları olarak** tanımlanırlar. Buna ilave olarak, normal kemirgen fibroblast kültüründen çok sayıda ölümsüz hücre hattı izole edilmiştir. Benzerlerinin çoğunun yaptığı gibi ölmek yerine, bu kültürlerdeki birkaç hücre sınırsız olarak çoğalmayı sürdürür ve tümörlerden elde edilenlere benzeyen hücre hatları oluştururlar. Bu tür sürekli hücre hatları, kullanışlı, klonlanabilen ve laboratuvarında sonsuz çoğaltılabilen, sürekli ve tek tip hücre kaynağı sağladıklarından, bir çok deneyde özellikle kullanılmıştır.

- **Oluşturulan ilk insan hücre hattı, 1951'de serviks kanserinden izole edilen ve binlerce laboratuvarıda insan hücre biyolojisinin çalışılması için kullanılmış olan HeLa hücreleridir.**
- Optimal koşullar altında dahi, aktif olarak çoğalan çoğu hayvan hücresi 20 saat aralarla bölünür, ki bu, mayanın bölünme süresinden 10 kat daha uzundur. Bu nedenle, hayvan hücre kültürleriyle araştırma yapmak, bakteri ve mayalara göre daha zordur ve daha fazla zaman alır. Örneğin; tek hücreden üretilen E. coli veya maya kolonileri bir gecede ortaya çıktıysa halde, tek bir hayvan hücresinin görülebilir koloni oluşturması en az bir hafta, hatta daha fazla sürer. Yine de, hücre yapısını ve fonksiyonlarını anlayabilmemiz için, kültürdeki hayvan hücrelerini genetik olarak manipüle etmemiz kaçınılmazdır.

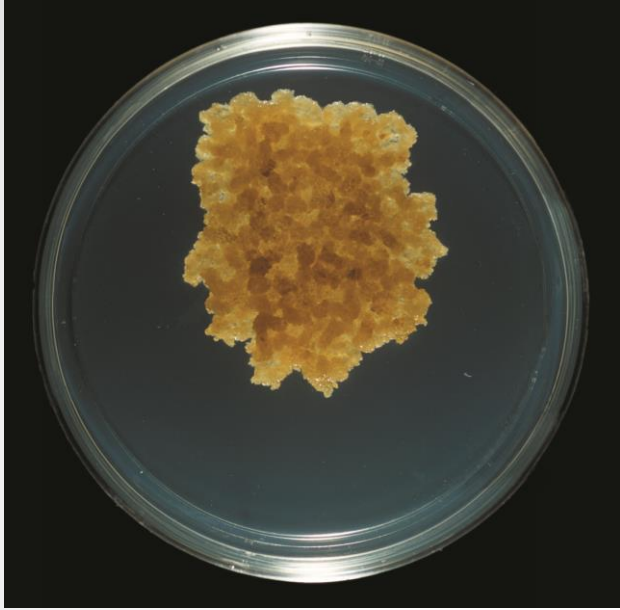
HeLa Hücreleri

- İlk hücre kültürleri, deneysel incelemeler için uygun olmaktan çok uzak bir kültür sistemi olan, doku fragmanlarından alınan ve plazma pıhtısı içine gömülen hücrelerin çoğalması şeklindeydi.
- En büyük ilerleme, 1940'ların sonlarında, izole edilmiş hücrelerin kültür kaplarının yüzeylerine tutunarak çoğaldıkları hücre hatlarının geliştirilmesiydi. Bu hücrelerin ilki, 1942 yılında oluşturulan ve L hücreler olarak adlandırılan fare hücre hatlarıydı. Ancak, kanser araştırmalarında model olarak çok fazla istenmesine rağmen, insan orijinli hücre hatlarının oluşturulması oldukça zor olmuştur.
- İlerleme 1951'de George Gey ve arkadaşlarının servikal kanserler dokusundan ilk insan hücre hattını, HeLa hücreleri, oluşturmaları ile elde edildi.
- HeLa hücreleri, Şubat 1951'de Henrietta Lacks isimli 30 yaşındaki bir kadından alınan servikal biyopsiden kültüre edildi.

HeLa Hücreleri

- Bu hücre hattının arkasındaki hikaye ve erken hücre kültürü çalışmalarının arkasındaki hikayelerin büyük bir bölümü Rebecca Skloot tarafından kaleme alınan " The Immortal Life of Henrietta Lack's, 2010" da anlatılmıştır.
- **HeLa hücreleri, kanser araştırmalarında ve diğer insan hücre biyolojisi çalışmalarında en yaygın kullanılan hücre hattı olmuştur. Poliovirüslerin HeLa hücrelerinin içinde kolaylıkla çoğalabilmesinden dolayı, HeLa hücrelerinin kullanıldığı en önemli ilk çalışma polio aşısının geliştirildiği çalışma olmuştur. HeLa hücreleri günümüzde de; DNA replikasyonu, gen ekspresyonu, hücre bölünmesi, viroloji, kanser ve hücre haberleşmesi gibi insan moleküler ve hücre biyolojisinin neredeyse bütün alanlarında kullanılmaya devam edilmektedir. Öneminin bir göstergesi olarak, HeLa hücreleri 70.000' den fazla yayınlanmış araştırma makalesinde kullanılmıştır. Bunun ötesinde, çok sayıda diğer insan hücre hattı oluşturulmuştur ve bu hücre hatları günümüz insan hücre biyolojisi çalışmalarının temelini oluşturmaktadır.**

Bitki Hücresi Kùltürleri



- Bitki hücreleri de, uygun büyüme düzenleyici molekülleri içeren besi ortamı içerisinde büyütülebilir. Hayvan hücrelerinin çoğunun üremesini düzenleyen polipeptit büyüme faktörlerinin aksine, bitki hücrelerinin büyüme regülatörleri, bitki hücre duvarından geçebilen küçük moleküllerdir. Bu büyüme düzenleyici moleküllerin uygun karışımının sağlandığı koşulda, bir çok bitki hücre tipi kültürde çoğalır ve **kallus** adı verilen farklılaşmamış bir hücre kümesi oluşturur.

Bitki Hücresi Kùltürleri

Bitki hücrelerinin çoğunun, sonunda bitkinin tümünü oluşturmak için gerekli olacak, farklı hücre ve doku tiplerinden her birini oluşturabilme yetisinde olduklarını belirtmek gerekir. Sonuç olarak, besinlerin ve büyüme düzenleyici moleküllerin uygun kullanımıyla, kültürdeki farklılaşmamış bitki hücreleri, kökler, gövdeler ve yapraklar gibi çeşitli bitki dokularını oluşturmak üzere uyarılabilir. Çoğu zaman, kültürdeki tek bir hücreden bütün bir bitki geliştirilebilir. Kültürde tek hücreden yeni bir bitki oluşturabilmesi, teorik yararının yanı sıra, bitkilerde genetik değişiklikler yapılmasını kolaylaştırır ve tarımsal genetik mühendislikte önemli olanaklar sağlanır.